ULLYANOV BEZERRA TOSCANO DE MENDONÇA

**Análise de mutações do gene KIT em pacientes com
melanoma de mucosa de cabeça e pescoço e relação
clínica retrospectiva**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Claudio Roberto
Cernea

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mendonça, Ulyyanov Bezerra Toscano de

Análise de mutações do gene KIT em pacientes com melanoma de mucosa de cabeça e pescoço e relação clínica retrospectiva / Ulyyanov Bezerra Toscano de Mendonça. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Clínica Cirúrgica.

Orientador: Claudio Roberto Cernea.

Descritores: 1.Melanoma 2.Mucosa nasal 3.Mucosa bucal 4.KIT 5.Proteínas proto-oncogênicas c-kit 6.Mutação

USP/FM/DBD-238/15

Dedico esta obra, especialmente, ao meu pai, Dr. Manoel Elpídio Toscano de Mendonça, assim como eu, era médico, dedicou toda a sua vida aos mais carentes. Hoje chego ao final dessa estrada graças a ele. Infelizmente, você nos deixou antes do tempo, mas sei que, de onde você estiver, você estará comemorando comigo.

À minha mãe, Sônia, que me ensinou os valores necessários para que eu pudesse alcançar sucesso e felicidade na vida pessoal e profissional.

A minha esposa e companheira, Cristiane, pela compreensão, me apoiando nas longas jornadas de trabalho e me estimulando a procurar sempre o melhor.

A meu filho, Rafael, que, apesar do pouco tempo de vida, me ensinou a batalhar pela vida.

Aos meus irmãos, Gavroche, Sandino, Ludmylla, pelos momentos felizes da nossa infância.

A minha sogra, Maria de Fátima, pelo carinho e pela presteza com a minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Claudio Roberto Cernea, pela amizade, pela orientação, pelo apoio e pela compreensão durante a realização deste trabalho.

Aos Drs. Roberto Araújo Lima, José Roberto Netto Soares, Fernando Luiz Dias, Emílson de Queiroz Freitas, Isabela Costa Santos, Terence Pires de Farias, Walber Jurema, Mauro Marques Barbosa, Pedro Medeiros e Fernando Botelho (*in memoriam*), pelos ensinamentos durante a minha residência médica em Cirurgia de Cabeça e Pescoco, e agora, pela troca frequente de ideias e opiniões na nossa rotina de trabalho.

Ao Dr. Jacob Kligerman, pelos conselhos dados na minha vida profissional.

Ao Prof. Dr. Lenine Garcia Brandão, pela oportunidade de cursar esta pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Claudio Gustavo Stefanoff, por abrir-me as portas do Banco de Tumores do INCA, possibilitando toda parte prática desta tese.

Ao Dr. Daniel Herchenhorn, pela incansável busca do saber, sem ele, não teria dado início a essa tese.

Aos pacientes e familiares que participaram deste estudo e que continuam a ser acompanhados no INCA.

Aos componentes da Banca de Qualificação desta Tese, Prof. Dr. Vergilius Jose Furtado de Araujo Filho, Prof. Dr. Leandro Luongo de Matos, Dr. Andre Bandeira de Oliveira Santos, Dr. Marcelo Benedito Menezes, pelas sugestões e orientações para melhora deste trabalho.

NORMALIZAÇÃO ADOPTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS

LISTA E FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	2
2 OBJETIVOS	7
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	9
3.1 Melanoma maligno de mucosa de cabeça e pescoço	9
3.1.1 Aspectos gerais	9
3.1.2 Aspectos históricos	11
3.1.3 Incidência.....	12
3.1.4 Características clínicas e diagnóstico	15
3.1.5 Tratamento.....	18
3.1.6 Prognóstico	22
3.2 Via <i>MAPK</i>.....	23
3.2.1 Aspectos gerais	23
3.2.2 Sinalização <i>MAPK</i>	25
3.2.3 Correlações clínicas da Via <i>MAPK</i>	30
3.3 Proto-oncogene <i>KIT</i>.....	32
3.3.1 Aspectos gerais	32
3.3.2 Associação de <i>KIT</i> e progressão tumoral	33
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	49
4.1 Casuística	49
4.1.1 Critérios de inclusão	49
4.1.2 Critérios de exclusão	49
4.1.3 Dados epidemiológicos	49
4.1.4 Variáveis clínicas-patológicas	49

4.1.5 Seguimento	50
4.2 Métodos	50
4.2.1 Metodologia da extração do DNA	51
4.2.2 Análise de mutação em <i>KIT</i>	51
4.2.3 Análise estatística	53
5 APROVAÇÕES PELAS COMISSÕES DE ÉTICAS	56
6 RESULTADOS	58
6.1 Variáveis epidemiológicas	60
6.1.1 Sexo (Gráfico 1)	60
6.1.2 Idade (Gráfico 2)	60
6.1.3 Etnia (Gráfico 3)	61
6.1.4 Tabagismo, etilismo, dentição precária e prótese (Gráfico 4)	62
6.2 Variáveis clínicas	62
6.2.1 Localização do tumor primário (Gráfico 5)	62
6.2.2 Sintomatologia (Gráficos 6 e 7)	63
6.3 Distribuição estadiamento TNM (Gráfico 8)	64
6.4 Variáveis histopatológicas	65
6.4.1 Grau de diferenciação histológica do tumor (Gráfico 9)	65
6.4.2 Índice mitótico (Gráfico 10)	65
6.4.3 Presença da melanina (Gráfico 11)	66
6.5 Análise da mutação de <i>KIT</i>	67
6.5.1 Incidência e distribuição da mutação	67
6.5.2 Análise de variáveis clínicas e mutação de <i>KIT</i> (Tabela 5)	69
6.6 Sobrevida Global e Sobrevida Livre de Doença	70
6.6.1 Relação da mortalidade e parâmetros clínicos (Tabela 6)	71
6.6.2 Relação da mortalidade com TNM e adjuvância (Tabela 7)	72
6.6.3 Relação da mortalidade e variáveis histopatológicas (Tabela 8)	74
6.6.4 Relação da SLD com parâmetros clínicos (Tabela 9)	76
6.6.5 Relação da SLD com TNM e adjuvância (Tabela 10)	76
6.6.6 Relação da recidiva com variáveis histopatológicas (Tabela 11)	77
6.6.7 Sobrevida global e sobrevida livre de doença e presença da mutação de <i>KIT</i> (Tabelas 12 e 13)	80
7 DISCUSSÃO	83
7.1 Variáveis epidemiológicas	84

7.1.1 Idade	84
7.1.2 Sexo	84
7.1.3 Etnia	84
7.2 Variáveis clínicas	85
7.2.1 Localização do tumor primário	85
7.2.2 Sintomatologia	85
7.3 Distribuição do estadiamento TNM	86
7.4 Variáveis histopatológicas	87
7.4.1 Índice mitótico	88
7.4.2 Presença de melanina	88
7.4.3 Grau de diferenciação celular	89
7.4.4 Invasão vascular, disseminação angiolinfática e disseminação perineural	89
7.5 Tratamento	90
7.5.1 Cirurgia	90
7.5.2 Radioterapia	91
7.6 Mutação de <i>KIT</i>	92
7.6.1 Incidência e localização	92
7.6.2 Associação de mutações de <i>KIT</i> com características clínico- patológicas	94
7.6.3 Valor prognóstico da mutação de <i>KIT</i>	95
7.6.4 Perspectivas futuras	95
8 CONCLUSÃO	98
9 ANEXOS	100
Anexo A – Aprovações das Comissões de Ética	100
Anexo B – Aprovação no Exame de Qualificação	104
10 REFERÊNCIAS	107

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
BRAF	v-Raf Murine Sarcoma viral Oncogene Homolog B1
cAMP	<i>cyclic AMP</i>
AKT	<i>Serine-Threonine Specific Protein Kinase</i>
BCL-2	<i>B-Cell Lymphoma 2</i>
B-Raf	Proteína Produzida pelo Gene BRAF
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CEP/INCA	Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer
CD117	<i>Mast Stem Cell Growth Factor Receptor</i> (Receptor do Fator de Crescimento)
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinases</i>
CDKN2A	<i>Acyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>
CDK41	Sinônimo do CDKN2A
c-KIT	<i>Mast Stem Cell Growth Factor Receptor</i> (Receptor do Fator de Crescimento)
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EGFR	Expressão do Receptor de Fator de Crescimento Epitelial
ERK	<i>Extracellular Regulated Kinase</i>
EMA	Antígeno Epitelial de Membrana
<i>et al.</i>	e outros
FLT3	Receptor Tirosina Quinase 3 semelhante a FMS
FISH	<i>Fluorescent in situ Hybridization</i>
GIST	Tumores do Estroma Gastrointestinal
GTPase	Enzima Guanosina Trifosfato
HMB-45	Anticorpo Monoclonal
IFN-alfa	Interferon
IL-2	Interleucina 2

<i>in situ</i>	no local
<i>in vitro</i>	em vidro
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INK4A	Sinônimo do CDKN2A
JNK	<i>c-Jun N-Terminal Kinases (Quinase c-Jun N-Terminal)</i>
KIT	Receptor Tirosina Quinase
<i>KIT</i>	Gene KIT
KRAS	Homólogo Oncogene Viral de Sarcoma de Kirsten
MAA	Melanomas Malignos Acrais Amelanóticos
<i>MAPK</i>	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
<i>MAPK</i>	Via Proteína Quinase Mitógeno Ativada
MEK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MC	Melanoma Cutâneo
MGF	Fator de Crescimento de Mastócitos
MITF	<i>Microphthalmia-Associated Transcription Factor</i>
MTS1	Sinônimo do CDKN2A
MMCP	Melanoma Maligno de Mucosa de Cabeça e Pescoço
MO	Melanoma Primário da Mucosa Oral
NRAS	Homólogo do Oncogene Viral RAS do Neuroblastoma
PCR	Reação de Cadeia Polimerase
PDGFR	<i>Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha</i>
p-ERK	ERK Fosforilada
PET	Tomografia por Emissão de Pósitrons
<i>PI3K</i>	<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>
pRB	Gene do Retinoblastoma
RAF	<i>Proto-Oncogene Serine-Threonine Protein Kinase</i>
RAS	Homólogo do Vírus RAS (rat sarcoma)
RTK	Receptores Tirosina Quinase
SG	Sobrevida Global
SLD	Sobrevida Livre de Doença
SOX10	Gene SOX10

TRK	Receptor de Tirocino Quinase
WESTOP	<i>Western Society of Teachers of Oral Pathology</i>
WT	Sigla em inglêc para <i>Wild Type</i> (selvagem)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
<	Menor que
>	Maior que
=	Igual a
®	Marca Registrada
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
BaP	Benzo[a]pireno
DAB	3,3 Diaminobenzidine
EDTA	Ácido Etilenodiamino Etra-Acético
HCl	Ácido Clorídrico
KCl	Cloreto de Potássio
kDa	Kilodaltons
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimol
ng	Nanograma
<i>p</i>	Nível Descritivo
pb	Pares de Bases
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol	Picomol
TBE	Tampão Tris, Borato, EDTA
TE	Tampão Tris, EDTA
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UI	Unidades Internacionais
κ	Kappa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	MAPK cascata de sinalização24
Figura 2	Cascata da MAP quinases na célula.26
Figura 3	Representação esquemática da via de transdução de sinal da MAP quinase ERK 1/2.....30
Figura 4	Vias de sinalização dos receptores KIT e e PDGFRA no GIST33
Figura 5	Cromatograma evidenciando mutação no éxon 11 do gene <i>KIT</i> / L576P de um caso representativo (caso 26).....68
Figura 6	Eletroferograma evidenciando a perda de heterozigose do gene <i>KIT</i> (Marcador HK 8810) (análise pelo bioanalisador Agilent 2100).69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação entre melanoma maligno de cabeça e pescoço.	10
Tabela 2	Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes <i>KIT</i>	53
Tabela 3	Sumário dos casos tratados no Instituto Nacional de Câncer (INCA)	59
Tabela 4	Distribuição da mutação de <i>KIT</i> . Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.	68
Tabela 5	Variáveis clínicas e sua correlação com a mutação de <i>KIT</i> . Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.	69
Tabela 6	Relação entre parâmetros clínicos e o óbito. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.	72
Tabela 7	Relação entre TNM e adjuvância e com óbito. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.	73
Tabela 8	Relação entre variáveis histopatológicas e óbito. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.	74
Tabela 9	Relação entre SLD e parâmetros clínicos. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.	76
Tabela 10	Relação entre SLD com estadiamento e adjuvância. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.	77
Tabela 11	Relação entre SLD com variáveis histopatológicas. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.	78
Tabela 12	Relação entre SLD e a presença da mutação de <i>KIT</i> . Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.	80

Tabela 13	Relação entre o óbito e a presença da mutação de <i>KIT</i> . Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.....	81
Tabela 14	Súmario da mutações de <i>KIT</i>	93

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Distribuição de sexo	60
Gráfico 2	Distribuição de idade	61
Gráfico 3	Distribuição de etnia	61
Gráfico 4	Distribuição de hábitos e costumes	62
Gráfico 5	Localização do tumor primário.....	63
Gráfico 6	Duração dos Sintomas	63
Gráfico 7	Distribuição dos sintomas.....	64
Gráfico 8	Estadiamento clínico conforme a AJCC – 2002. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.....	64
Gráfico 9	Distribuição do grau de diferenciação celular	65
Gráfico 10	Distribuição do índice mitótico	66
Gráfico 11	Avaliação histopatológica da presença de melanina). Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.....	66
Gráfico 12	Incidência da mutação de <i>KIT</i> . Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA	67
Gráfico 13	Sobrevida global. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.....	70
Gráfico 14	Sobrevida Livre de doença. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA	71
Gráfico 15	Curva de sobrevida global comparando adjuvância e óbito. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA	73
Gráfico 16	Curva de sobrevida global relacionando invasão vascular e óbito. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.....	75

Gráfico 17	Curva de sobrevida global relacionando disseminação angiolinfática e óbito. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.....	75
Gráfico 18	Curva de sobrevida livre de doença relacionando índice mitótico. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA	78
Gráfico 19	Curva de sobrevida livre de doença relacionando invasão vascular. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.....	79
Gráfico 20	Curva de sobrevida livre de doença relacionando disseminação angiolinfática. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.....	79
Gráfico 21	Curva de sobrevida livre de doença relacionando a disseminação perineural. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA	80

RESUMO

Mendonça UBT. *Análise de mutações do gene KIT em pacientes com melanoma de mucosa de cabeça e pescoço e relação clínica retrospectiva* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2015.

Introdução: O melanoma mucoso de cabeça e pescoço (MMCP) é mais agressivo do que o melanoma cutâneo, marcadores prognósticos desta patologia não foram completamente esclarecidos devido a sua raridade. Em recentes estudos, algumas vias moleculares foram descritas na fisiopatologia destes tumores. Entre estas vias, existe a via da *MAPK* (*Mitogen Activated Protein Kinase*). Esta via de sinalização está envolvida no controle do crescimento celular, proliferação e migração, com um papel no desenvolvimento e progressão do melanoma. Além disso, a mutação do gene *KIT* foi identificada em melanomas, indicando a possibilidade de benefícios terapêuticos com o uso dos inibidores de tirosino-quinase.

Objetivos: descrever a prevalência e características de mutações ativadoras do gene *KIT* em 28 pacientes com MMCP tratados no Instituto Nacional do Câncer-INCA; avaliar a relação entre a presença de mutação ativadora do gene *KIT* e evolução clínica dos pacientes tratados em relação ao estadiamento, sobrevida livre de doença e sobrevida global.

Métodos: Estudo retrospectivo de coorte, foram incluídos 28 pacientes com MMCP tratados no INCA, entre 1998 e 2009. Foram analisados: estadiamento, tratamento primário, sobrevida livre de doença (SLD) e sobrevida global (SG). As curvas de sobrevida foram analisados utilizando o método de Kaplan-Meier, com software SPS 11.0.

Análise KIT: O DNA foi extraído a partir de tecido incluído e fixado em parafina. O procedimento consiste de múltiplas etapas de desparafinização com xilol. Os restos celulares são precipitados por centrifugação e o DNA, no sobrenadante é utilizado nas reações de PCR (direto ou diluído). A análise mutacional do gene foi realizada utilizando-se a amplificação por PCR seguida pelo sequenciamento genômico. As análises são iniciadas pelo éxon 11, seguidas do éxon 9, 17 e 13.

Resultados: Os pacientes eram predominantemente do sexo feminino (57%). A idade de apresentação variou de 27 a 85 anos. A região nasossinusal foi o sítio primário mais frequente (75%). Todos os pacientes foram submetidos a ressecção cirúrgica. Dezesete pacientes receberam radioterapia adjuvante (37%). As recorrências ocorreram em 82% dos pacientes. Presença de mutação de *KIT* foi encontrada em 7 casos (25%), três no éxon 9, 3 no éxon 11 e 1 no éxon 13. Fatores preditivos de recorrência foram índice mitótico ($p = 0,05$), invasão vascular ($p = 0,043$), e a disseminação perineural ($p = 0,034$). Não houve diferenças significativas na SLD e SG de acordo com a mutação *KIT*.

Conclusão: A presente série incluiu 28 casos tratados. Sete casos (25%)

tinham mutações ativadoras *KIT*. Esta descoberta sugere que existe um grupo de pacientes que poderiam se beneficiar com a terapia-alvo adequado com inibidores de tirosino-quinase.

Descritores: Melanoma; Mucosa nasal; Mucosa bucal; KIT; Proteínas proto-oncogênicas c-kit; Mutação.

ABSTRACT

Mendonça UBT. *Mutation analysis of gene KIT in patients with head and neck mucosal melanoma and retrospective clinical correlation* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Unlike their cutaneous counterparts, head and neck mucosal malignant melanomas (HNMM) behave much more aggressively and their prognostic markers have not been fully elucidated. In recent studies, some molecular pathways have been found to be involved in the pathogenesis of melanomas. Among these, there is a proliferative MAPK pathway ("Mitogen Activated Protein Kinase"). This signaling pathway is involved in controlling cell growth, proliferation and migration, with a role in the development and progression of melanoma. In addition, KIT gene mutation has been identified in melanomas, indicating that there may be potential therapeutic benefits of tyrosine kinase inhibitors. Objectives: Evaluation of KIT mutation prevalence in a subset of 28 patients with HNMM treated at a single institution, establishing the relationship between different mutations and outcome (DFS and OS). The primary end-point of the study was to define the incidence of KIT mutations in HNMM, including the relationship between KIT mutations with disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) in HNMM. Secondary end-points were correlation among therapeutic options, histopathological findings, demographic data and clinical response. Methods: This retrospective study comprised data of 28 patients with HNMM treated at Brazilian National Cancer Institute (INCA) between 2000 and 2011. Clinical analysis included patients characteristics, staging, primary and palliative treatments, disease free survival and overall survival. Progression-free survival and overall survival were analyzed using the Kaplan-Meier method, with SPS 11.0 software. KIT analysis: paraffin blocks were selected following analyses of histologic preparations, enabling DNA extraction. Different DNA concentrations were employed in PCR amplifications, based on DNA integrity. PCR amplification of exon, 9, 11, 13 and 17 was performed. Results: Patients were predominantly females (57%). The age of presentation ranged from 27 to 85 years. The sinonasal region was the most frequent primary site (75%). All patients underwent surgical resection. Seventeen patients received adjuvant radiotherapy (37%). Recurrences occurred in 82% patients. Oncologic mutations in KIT were found in 7 (25%) of seven tumors, 3 in exon 9, 3 in exon 11 and 1 in exon 13. Predictive factors for recurrence were mitotic rate ($p=0.05$), vascular invasion ($p=0.043$), and perineural spread ($p=0.034$). There were no significant differences in DFS and OS according to KIT mutation. Conclusion: HNMM remains a rare disease. The present single-institution series includes 28 cases treated in single institution. Seven cases (25%) had activating KIT mutations, which is an increased prevalence of activating KIT mutations in

this specific subset of mucosal melanomas. This finding suggests that there is a group of patients who might benefit with appropriate targeted therapy with kinase inhibitors

Descriptors: Melanoma; Nasal mucosa; Buccal mucosa; KIT; Proto-oncogene proteins c-kit; Mutation.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O melanoma maligno cutâneo representa um grande problema de saúde para muitos países. Desde a década de 60, a incidência de melanoma maligno aumenta 3 a 8% ao ano. Apesar deste achado, houve melhora significativa das taxas de sobrevida, graças, principalmente, ao diagnóstico precoce (Thompson *et al.*, 2005). Embora a maioria dos melanomas malignos em estágios iniciais seja curada com o tratamento cirúrgico, o prognóstico de pacientes com doença avançada ainda é ruim devido ao padrão de resistência aos esquemas de quimioterapia disponíveis. A identificação de alvos moleculares para o diagnóstico e tratamento destes pacientes é de importância particular e representa grande parte dos projetos de pesquisa sobre melanoma maligno.

O melanoma maligno de mucosa de cabeça e pescoço (MMCP) é uma entidade clínica rara que representa menos de 1% dos melanomas malignos nos países do Ocidente e menos de 10% dos melanomas malignos de cabeça e pescoço, contribuindo com 25% a 33% dos casos de melanoma maligno no Japão (Conley & Pack, 1974, Andersen *et al.*, 1992; Brandwein *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1998). A idade mediana dos pacientes com melanoma maligno de mucosa é 60 anos, e os sítios primários mais comuns incluem cavidade nasal, seios paranasais e cavidade oral (Mendenhall *et al.*, 2005). A maior parte dos pacientes se apresenta ao diagnóstico com doença restrita ao sítio primário, 10 a 30% apresentam linfonodomegalia cervical e, aproximadamente, 15% têm doença disseminada (Mendenhall *et al.*, 2005). A probabilidade de acometimento à distância varia de acordo com o sítio primário, com 11% de acometimento linfonodal em pacientes com sítio primário nasossinusal e 47% em pacientes com sítio primário em orofaringe (Temam *et al.*, 2005). Os achados histopatológicos do melanoma maligno de mucosa de cabeça e pescoço são variáveis. As células tumorais podem apresentar características plasmocitoides, sarcomatoides ou epitelioides, e o

conteúdo de melanina oscila entre tumores amelanóticos e lesões altamente pigmentadas (Brandwein *et al.*, 1997). As técnicas de imuno-histoquímica podem distinguir o melanoma maligno de mucosa de outros cânceres, evidenciando reações a *S100*, vimentina e *HMB45* usualmente positivas, e contra *EMA* e citoqueratinas, negativas. O tratamento dos pacientes com melanoma maligno de mucosa de cabeça e pescoço com doença localizada consiste em ressecção cirúrgica associada ao esvaziamento cervical, nos casos em que há metástase cervical. A indicação de linfadenectomia cervical em pacientes sem evidência clínica ou por métodos de imagem de metástases cervicais, bem como o uso de radioterapia pós-operatória (Mendenhall *et al.*, 2005) são aspectos controversos.

O conhecimento obtido por meio de pesquisa translacional em oncologia é fundamental para a compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese de doenças pouco frequentes, como o melanoma maligno de mucosa originado em cabeça e pescoço, e o direcionamento para realização de estudos clínicos subsequentes.

As principais vias de sinalização intracelular relacionadas à patogênese do melanoma maligno são a *MAPK* (*Mitogen Activated Protein Kinase*), a *PI3K* (phosphatidylinositol 3-kinase) e o cAMP (cyclic AMP). A via *MAPK* é ativada por grande número de fatores de crescimento e é fundamental nos processos de sinalização intracelular envolvidos com sobrevivência celular, crescimento celular e diferenciação (Dhillon *et al.*, 2007). A ativação da via *MAPK* é iniciada por receptores de tirosina kinase de superfície celular transmembrana, com um domínio de ligação extracelular e um domínio de tirosina kinase intracelular. Após a ação do ligante, a maioria dos receptores dimeriza, levando à ativação do receptor e autofosforilação dos resíduos de tirosina. Estes resíduos de tirosina fosforilados funcionam como sítios de ligação para proteínas adaptadoras responsáveis pela ativação de diversas moléculas, dentre elas, as *GTPases* da família *Ras*. *Ras* representa um *link* crítico, permitindo a sinalização extracelular à *ERK* (*Extracellular Regulated Kinase*) (Mckay & Morrison, 2007). Uma vez ativado, o *Ras* recruta a *Ras* kinase, tornando-a ativada. *Raf* fosforila e ativa uma nova proteína kinase

chamada *ERK Kinase*, que, em seguida, ativa a *ERK*, responsável pela regulação da cascata de fatores de transcrição que regulam expressão gênica, mudanças do citoesqueleto e metabolismo (Thompson *et al.*, 2005). A via de sinalização *MAPK* regula a proliferação de melanócitos após a ação de agonistas como fator de crescimento de fibroblasto, fator de crescimento do hepatócito, fator de crescimento de epiderme e *stem cell factor*. As mutações encontradas na via de sinalização *MAPK* representam um grande avanço no conhecimento da biologia molecular do melanoma maligno e a possibilidade de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Outros fatores importantes são implicados na patogênese do melanoma maligno, como local de acometimento, apresentação clínica inicial e exposição à luz solar. A exposição à radiação ultravioleta é aceita como fator causal maior, mas os mecanismos envolvidos não estão completamente elucidados. Pessoas de pele clara representam o grupo mais acometido por melanoma maligno e os tumores aparecem, mais comumente, em áreas de exposição intermitente ao sol, como tronco, braços e pernas, ao invés de áreas de exposição crônica, como a face. Uma menor parcela de melanoma maligno aparece em locais aonde não há exposição à luz solar, como palmas e plantas (melanoma maligno acral) e melanoma maligno originado em mucosas (Marks, 2000; Whiteman *et al.*, 2001, Curtin *et al.*, 2005). Genes frequentemente mutados, como B-Raf e N-Ras, encontrados em melanoma maligno não apresentam sinais (*fingerprints*) de mutações induzidas por luz solar (Albino *et al.*, 1989; Davies *et al.*, 2002).

A heterogeneidade do melanoma maligno em relação ao sítio de acometimento, grau de exposição solar e características histológicas, provavelmente, é causada por subtipos de melanoma maligno biologicamente distintos, que precisam ser abordados de forma individualizada. A análise de diferenças do número de cópias de DNA realizada pela técnica de hibridização genômica comparativa de 126 melanomas malignos primários classificados de acordo com o sítio de acometimento e grau de exposição solar permitiu discernir alterações distintas de sinalização intracelular de acordo com o subtipo de melanoma

maligno. No grupo de melanomas malignos de pele sem sinais de exposição crônica ao sol, foram encontradas mutações em *B-Raf* (59%) ou *N-Ras* (20%), o que não ocorreu nos grupos de melanoma maligno acral, melanoma maligno de mucosa e melanoma maligno originado em pele com sinais crônicos de exposição solar. A análise de um segundo grupo de pacientes utilizando hibridização genômica comparativa em pacientes dos diferentes subtipos de melanoma maligno identificou, entre os grupos estudados, uma amplificação gênica no *4q12*, e possíveis genes candidatos foram estudados, evidenciando mutação ou aumento do número de cópias de *KIT* em 39% dos melanomas malignos de mucosa, 36% dos melanoma maligno acral, 28% dos melanomas malignos com lesão crônica de pele induzida pelo sol e em 0% dos melanomas malignos de pele sem sinais de lesão crônica pelo sol (Curtin *et al.*, 2005).

Mutações no gene do *KIT* são descritas em pacientes com *GIST* (tumores do estroma gastrointestinal), levando à transcrição de receptor de tirosina kinase ativo independente da ação do ligante. A maior parte (90%) destas mutações está localizada no éxon 11 do gene *KIT* que codifica o domínio justa-membrana intracelular do receptor de tirosina kinase (Hirota *et al.*, 1998).

A identificação de mutações ativadoras no gene *KIT* em pacientes com melanoma maligno de mucosa possibilita o melhor conhecimento da biologia tumoral, e possibilita o delineamento de protocolos de pesquisa clínica e tratamento com o imatinib (Hirota *et al.*, 1998).

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

O trabalho tem como objetivos:

- 1 Descrever a prevalência e características de mutações ativadoras do gene *KIT* em 28 pacientes com melanoma maligno de mucosa de cabeça e pescoço tratados no Instituto Nacional do Câncer;
- 2 Avaliar a correlação entre a presença de mutação ativadora do gene *KIT* e evolução clínica dos pacientes tratados em relação ao estadiamento, sobrevida livre de doença e sobrevida global.

3 Revisão da Literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Melanoma maligno de mucosa de cabeça e pescoço

3.1.1 Aspectos gerais

A palavra melanoma maligno provém do Grego melas, que significa escuro, negro, e o sufixo oma, tumor. O melanoma maligno é uma neoplasia agressiva de origem melanocítica, que se desenvolve a partir de lesões melanocíticas benignas pré-existentes ou de melanócitos normais da pele, mucosa e, eventualmente, da coróide e leptomeninges do sistema nervoso central (Gu *et al.*, 2003; Mendenhall *et al.*; WHO; Wagner *et al.*, 2008). Os melanócitos são células que produzem e contêm no citoplasma o pigmento melanina, localizadas na camada basal da epiderme, infundíbulo e região bulbar dos folículos pilosos, na coróide, em leptomeninges e em mucosas. As células precursoras dos melanócitos são os melanoblastos, que são células de origem neuroectodérmica, que migram a partir da crista neural do embrião para a pele, retina, meninges, mucosas oronasal e respiratória, entre a 12ª e 14ª semanas de vida intrauterina (Alonso *et al.*, 2004, Demierre *et al.*, 2008). Uma vez na derme, os melanoblastos sofrem maturação, dando origem a células precursoras de melanócitos (pré-melanócitos precoces e intermediários), que, na epiderme, diferenciam-se completamente para melanócitos (Alonso *et al.*, 2004; Carlson *et al.*, 2009).

O melanoma maligno de mucosa de cabeça e pescoço (MMCP) é uma condição rara que compreende menos de 1% de todos os melanomas malignos no Ocidente; e menos de 10% dos melanomas malignos de cabeça e pescoço (Mendenhall *et al.*, 2005; Tas & Keskin, 2013). Além de raro, o MMCP apresenta um padrão de comportamento diferente do melanoma maligno cutâneo (Tabela 1) (MC) (Tas & Keskin, 2013).

Tabela 1 - Comparação entre melanoma maligno de cabeça e pescoço.

	Melanoma cutâneo	Melanoma de mucosa
Tecido de origem	Pele	Superfícies mucosas
Idade média	55 anos	65 anos
Aparência amelanótica	1.8%–8.1%	20%–25%
Fatores de risco	Exposição solar	Desconhecido
Raça	Branca: 94%/Negra:0,8%	Branca: 85%/Negra: 7%
Papel do tratamento radioterápico no tumor primário	Normalmente, não há papel.	Radiação para o leito tumoral geralmente Recomendada
Ativação da mutação do gene <i>KIT</i>	Menor que 5%	15%–22%

FONTE: Seetharamu *et al.*, 2010

Mendenhall *et al.* (2005) afirmaram que a idade média dos pacientes com MMCP é de, aproximadamente, 60 anos, com uma grande variação entre 20 e 90 anos. Existe uma preponderância para o gênero masculino. Os sítios primários mais comuns incluem a cavidade nasal, seios paranasais e cavidade oral. Dentro desses sítios, a cavidade nasal, o rebordo alveolar e o palato duro são, mais frequentemente, envolvidos.

Estudos recentes indicam que as taxas de sobrevida de pacientes com melanoma maligno nos Estados Unidos continuam a aumentar, sobretudo devido ao sucesso do tratamento em pacientes diagnosticados precocemente, quando a doença ainda está em estágio inicial (Xing *et al.*, 2012; Tas & Keskin, 2013). No entanto, até 50% desses pacientes podem ter uma recidiva, mais comum nos primeiros anos após o diagnóstico. Estima-se que 20% de todas as primeiras recidivas sejam locais, 50% ocorram nos linfonodos regionais, e 30% em locais distantes (Xing *et al.*, 2012).

Apesar dos conhecidos benefícios da detecção precoce, ainda não existem diretrizes de vigilância, prevenção e tratamento do MMCP.

3.1.2 Aspectos históricos

Mendenhall *et al.* (2005) afirmaram que o surgimento histológico de MMCP é variável. As células tumorais podem ser: plasmocitoides; sarcomatoides; ou epitelioides. O teor de melanina também pode variar de tumores fortemente pigmentados para aqueles que são amelanóticos.

Demierre *et al.* (2008) propuseram critérios clínico-patológicos detalhados para o diagnóstico e prognóstico do melanoma maligno, publicados na revista *Cancer* por Allen e Spitz, em 1953, base científica sobre a qual o conhecimento atual sobre melanoma maligno se norteia. Allen e Spitz observaram o impacto prognóstico desfavorável de ulceração e do índice mitótico elevado. Na verdade, a ulceração se tornou um fator prognóstico independente do melanoma maligno em 2001, por meio da publicação da *American Joint Commission on Cancer Staging System* (Comissão Conjunta Americana sobre Sistema de Estadiamento do Câncer). A relevância da taxa mitótica foi confirmada e, posteriormente, estendida para prever o *status* do linfonodo sentinela. Allen e Spitz reportaram uma melhor expectativa de sobrevida para mulheres com melanoma maligno em relação aos homens, observação que tem resistido ao longo dos anos. Durante o período de 1969 a 1999, a mortalidade global por melanoma maligno aumentou, aproximadamente, em 50%, a partir de 2 óbitos por 100 mil para 3 óbitos por 100 mil, mas o aumento foi desproporcionalmente superior para homens com idade ≥ 65 anos (um aumento de 157%, ou seja, três vezes maior do que a taxa para mulheres na mesma idade). Além disso, os tumores com espessura de 4mm ou mais aumentaram sua incidência significativamente em homens com idade de 60 anos, e, em homens mais idosos, esses tumores são mais frequentemente diagnosticados com o subtipo nodular de melanoma maligno. Embora várias hipóteses tenham aparecido e ganhado força, incluindo as diferenças sexuais na percepção da pele, nenhuma delas explica totalmente porque os homens apresentam um risco desproporcional para desenvolver melanomas malignos espessos (Demierre *et al.*, 2008).

Hsieh (2012) afirmou que, em 1995, durante a reunião anual da *Western Society of Teachers of Oral Pathology* (WESTOP), foi proposta uma classificação histológica específica para as lesões primárias da cavidade oral, que compreendia uma divisão das lesões em melanoma maligno *in situ*, melanoma maligno invasivo, melanomas malignos combinados – *in situ* e invasivos, e proliferação melanocítica atípica, incluindo qualquer tipo de lesão que apresentasse histopatologia atípica, como núcleos hipercromáticos e angulados, e atividade mitótica.

No ano de 2004, Prasad *et al.* apresentaram os seguintes critérios de estadiamento de MMCP (Hsieh, 2012):

- Nível I: melanoma maligno *in situ*: sem evidência de invasão ou com apenas microinvasão (definido como invasão individual ou pequenos ninhos com menos de 10 melanócitos atípicos próximos à junção epitélio/lâmina própria);
- Nível II: invasão limitada à lâmina própria;
- Nível III: invasão de planos profundos (músculo, osso, cartilagem, tecido adiposo).

A divisão de níveis apresentada por Prasad *et al.* (2004) representava os micro-comportamentos separados por barreiras teciduais que podiam ser facilmente identificadas por meio de microscopia óptica (Hsieh, 2012).

3.1.3 Incidência

O estudo realizado por Chudnovsky *et al.* (2005) demonstrou que o melanoma maligno cutâneo se desenvolve a partir da transformação maligna de melanócitos situados na camada basal da epiderme na pele humana. Reconhecido como câncer de pele comumente fatal, a incidência de melanoma maligno tem aumentado em 15 vezes nos últimos 40 anos, nos Estados Unidos, demonstrando um índice mais rápido do que qualquer outro

câncer. A cada hora, um americano vai morrer de melanoma maligno, e continua a ser um dos tipos mais comuns de câncer entre os jovens adultos. Além disso, segundo as estatísticas americanas para 1973-1997, o aumento no índice de mortalidade por melanoma maligno em indivíduos com 65 anos de idade ou mais, especialmente os homens, foi o segundo maior entre todos os tipos de cânceres.

Como ocorre em muitos tipos de câncer, tanto a predisposição genética como a exposição a agentes ambientais são os fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma maligno. Estudos de caso-controle têm identificado vários fatores de risco em populações suscetíveis ao desenvolvimento de melanoma maligno (Chudnovsky *et al.*, 2005).

O melanoma maligno afeta, principalmente, pessoas de pele clara, aquelas que se queimam facilmente quando expostas ao sol, e têm um histórico de queimaduras graves (Chudnovsky *et al.*, 2005).

Aproximadamente, 1-8% de todos os melanomas malignos surgem na mucosa oral e são responsáveis por 0,5% de todas as neoplasias malignas orais. Os sítios bucais mais frequentemente afetados são o palato e a gengiva superior. A idade dos pacientes que relataram a presença desse tipo de melanoma maligno variou entre 20 e 80 anos. A neoplasia é mais comum no Japão e na África do que nos países ocidentais (Sharma, 2012).

Mathur (2011) afirmou que o MMCP é uma condição relativamente rara, representando 8-15% de todos os melanomas malignos da região da cabeça e do pescoço, e menos de 1% de todos os melanomas malignos. Os melanomas malignos da mucosa apresentam um comportamento muito mais agressivo em relação ao melanoma maligno da pele, com metastatização frequente em sítios regionais ou distantes, resultando em elevados índices de recidiva e mortalidade.

No relatório do Banco de Dados do Câncer dos Estados Unidos, em 1998, reunindo mais de 84.000 casos de melanomas malignos, apenas 1,3% desenvolveram-se a partir de mucosas. Destes, 55% estavam localizados na região da cabeça e pescoço (Kerr *et al.*, 2012).

O MMCP tem um pico de incidência em pacientes com idade entre 60-80 anos. Poucos casos foram relatados em crianças (Mathur, 2011). Alguns autores relataram uma ligeira predominância para o sexo masculino (Mendenhall *et al.*, 2005; Demierre *et al.*, 2008).

Devido à sua localização (mucosa cabeça e pescoço), os MMCP, geralmente, são diagnosticados em um estágio clínico avançado, com uma taxa de recidiva; 5-48% regional; e 4-14% com disseminação à distância (Owens *et al.*, 2003).

A cavidade nasal é o local, mais comumente, acometido na área nasossinusal. A origem exata da doença no trato nasossinusal é, muitas vezes, de difícil determinação, devido às proximidades anatômicas e ao estágio avançado na apresentação da doença, com a participação de vários sub-sítios (Demierre *et al.*, 2008; Mathur, 2011).

Sortino-Rachou *et al.* (2009) realizaram um estudo epidemiológico a partir de dados do “The Cancer Incidence in Five Continents volume IX”. Segundo essa base, no período de 1998 a 2002, foram notificados 124.436 casos de câncer de boca sendo que 319 eram de melanomas malignos orais (MO). Esses dados foram cedidos por 67 registros nacionais de câncer localizados em cinco regiões geográficas: Oceania, América do Norte, América Latina, Europa e Ásia. Dos 319 casos, 174 foram diagnosticados em homens e 145 em mulheres (1.2:1). A idade observada durante o diagnóstico foi bastante variável, com grupos de idade precoce (10 a 14 anos) a grupos de idade avançada (85 anos ou mais), com média de idade de 67 anos. Com relação à localização, o sítio mais acometido foi o palato (150 casos ou 47%) seguido pela gengiva (88 casos ou 27,6%). Alguns casos foram classificados como outros ou em partes não específicas da boca (59 casos ou 18,5%). A língua (13 casos ou 4,1%) e o assoalho de boca (nove casos ou 2,8%) foram os sítios menos acometidos.

Ariyoshi *et al.* (2008) realizaram um estudo epidemiológico de tumores malignos da região oral e maxilofacial de 1.809 pacientes durante o ano de 2002 em 148 instituições certificadas pela sociedade japonesa de cirurgiões orais e maxilofaciais. Foram avaliados 1816 tumores. Dos pacientes

analisados, 1.071 (59,2%) eram homens e 738 (40,8%) mulheres, com uma relação homem/mulher de 1,45: 1. A idade de acometimento variou de 12 a 99 anos, com média de 67 anos. Dos tumores, 730 (40,2%) se desenvolveram em língua, 594 (32,7%) na gengiva (223 na superior e 371 na inferior), 184 (10,1%) em mucosa jugal e 164 (9%) no assoalho bucal. No exame histopatológico, 1.611 (88,7%) eram carcinomas de células escamosas, seguido pelo carcinoma adenoide cístico com 39 casos (2,1%) e carcinoma mucoepidermoide, com 31 casos (1,7%). Com relação aos tumores não epiteliais, o MO foi o mais comum, com 13 casos (0,7%).

Mathur (2011) observou que, dentro da cavidade nasal, a doença se apresentava, mais comumente, na porção anterior do septo nasal, seguida pelo corneto médio, e o corneto inferior. Por outro lado, o melanoma maligno era praticamente inexistente na concha superior, na região olfativa, ou no seio etmoidal. Palato e gengiva alveolar eram os locais mais comuns na cavidade oral. Outros locais relatados incluíam a mucosa labial superior e inferior, mucosa bucal e língua. Raramente este tipo de melanoma maligno ocorria na faringe, laringe, ou esôfago superior.

A prevalência de MMCP parece variar de acordo com a raça. O melanoma maligno da mucosa, em especial na cavidade oral, é relativamente comum no Japão. Em Uganda, 10% de todos os melanomas malignos estão localizados nas cavidades oral ou nasal. Os melanomas malignos da cavidade nasal respondem por 2,6% dos melanomas malignos em todos os sítios (Mendenhall *et al.*, 2005; Demierre *et al.*, 2008; Mathur, 2011).

3.1.4 Características clínicas e diagnóstico

O sistema ABCD de avaliação clínica do melanoma maligno, que é comumente usado na identificação de MC, também pode ajudar no diagnóstico do MMCP (Meleti *et al.*, 2007). Quando não for possível diagnosticar uma lesão pigmentada como benigna por meio dos achados

clínicos, uma biópsia é indicada para exclusão de malignidade (Bong *et al.*, 2002; Younes *et al.*, 2004). Exames radiológicos por meio da tomografia computadorizada e ressonância magnética podem ser úteis para avaliação dos limites do tumor primário e metástases regionais e a distância (Gu *et al.*, 2003; Meleti *et al.*, 2007)

Femiano *et al.* (2008) afirmaram que o melanoma maligno oral primário é um tumor maligno raro que se origina a partir da proliferação de melanócitos. Esses tumores podem estar presentes em qualquer local da cavidade oral, no entanto, afeta com mais frequência o palato duro e a mucosa alveolar. O melanoma maligno oral primário é, geralmente, assintomático nas fases iniciais e apresenta-se, normalmente, como uma mancha pigmentada ou como uma massa com um índice de crescimento rápido. Nos estágios avançados, pode apresentar ulceração, edema, sangramento, e rápido crescimento e extrusão de elementos dentários.

Devido ao frequente atraso em seu diagnóstico, os tumores são, muitas vezes, diagnosticados quando a doença está avançada, quando comparados com a média do melanoma maligno cutâneo. O prognóstico é extremamente reservado, sobretudo em estágios avançados. Portanto, lesões pigmentadas de origem indeterminada devem ser, rotineiramente, submetidas a um exame de biópsia.

A maioria dos pacientes de melanoma maligno de mucosa nasossinusal apresenta obstrução nasal unilateral, epistaxe, ou uma combinação desses dois sintomas. Outros sintomas, como lacrimejamento excessivo, dor facial e inchaço são comuns nos casos avançados (Mathur, 2011).

A apresentação clínica mais comum dos tumores dentro da cavidade oral é uma massa indolor, mas ulceração e sangramento também podem estar presentes. Determinar se um melanoma maligno é uma lesão de mucosa primária ou metastática é, muitas vezes, difícil, porque o melanoma maligno cutâneo pode metastatizar amplamente, incluindo as membranas mucosas (Mathur, 2011).

Gonzáles-García *et al.* (2005) descreveram as seguintes características do melanoma maligno primário da mucosa oral:

- Acometimento frequente do palato e gengiva;
- Lesões pigmentadas mais frequentes (69%);
- Mucosa sobrejacente ulcerada;
- Atividade juncional;
- Invasão do epitélio;
- Invasão vascular e perineural são incomuns;
- Invasão de pequenos ductos das glândulas salivares;
- Lesões melanocíticas preexistentes em um terço dos casos (37%).

A metástase do melanoma maligno na mucosa oral apresenta as seguintes características (Gonzáles-García *et al.*, 2005):

- Acometimento do palato e gengiva é incomum;
- Frequente no assoalho da boca;
- Lesões pigmentadas são menos frequentes (20%);
- Mucosa sobrejacente não ulcerada;
- Ausência de atividade juncional;
- Ausência de invasão do epitélio;
- Linfócitos infiltrados em banda.

A manifestação clínica e histológica do melanoma maligno na mucosa oral, a presença de atividade tumoral na lesão e a impossibilidade de demonstrar um melanoma maligno em qualquer outro local são condições necessárias para fazer um diagnóstico adequado (Gonzáles-García *et al.*, 2005).

Os pacientes com histórico de melanoma maligno cutâneo e ocular ou nevos que regrediram devem ser avaliados para melanoma maligno metastático em vez de melanoma maligno de mucosa primário (Mathur, 2011).

As características mais importantes na distinção entre uma lesão primária de uma lesão metastática são: local envolvido; presença ou ausência de pigmento, que recobre a ulceração da mucosa; a extensão ao longo dos ductos das glândulas salivares, e a invasão vascular e perineural (Mathur, 2011).

Em relação aos exames de imagem para o diagnóstico de melanoma maligno, Xing *et al.* (2012) afirmaram que a ultrassonografia é o exame mais sensível e específico para a detecção de metástases linfáticas, enquanto que a tomografia por emissão de pósitrons (PET) foi a mais sensível e específica para a detecção de metástases distantes.

Liu *et al.* (2012) afirmaram que melanomas malignos de mucosa nasossinusal das regiões de cabeça e pescoço são neoplasias raras e agressivas. Embora possam afetar pacientes de qualquer etnia, elas são mais numerosas em pacientes chineses. O diagnóstico e o tratamento desses tumores pode ser um desafio.

Estudos recentes têm relatado que SOX10 é um marcador melanocítico sensível para melanoma maligno cutâneo (Nonaka *et al.*, 2008). Além disso, a mutação genética CD117 (*c-KIT*) foi identificada nos melanomas malignos, indicando que pode haver benefícios terapêuticos potenciais com o uso de inibidor de tirosina quinase, como *Imatinib* (Nonaka *et al.*, 2008).

3.1.5 Tratamento

O consenso atual na maioria das instituições é que a ressecção com margem ampla com reconstrução é o tratamento padrão e deverá ser realizado sempre que possível. Infelizmente, ressecção completa com margens adequadas é, frequentemente, de difícil alcance pela proximidade de estruturas anatômicas importantes.

Não há estudos aleatorizados que tenham comparado formas de tratamento, tais como cirurgia, radioterapia, ou quimioterapia

especificamente no melanoma maligno mucoso. A ressecção cirúrgica é o tratamento de escolha e pode resultar na cura. Semelhante ao melanoma maligno cutâneo, a ressecção cirúrgica é justificada para o controle local eficaz, devido à falta de opções eficazes de tratamento sistêmico, embora a maioria dos pacientes com melanoma maligno da mucosa já possa ter micrometástases no momento do diagnóstico do tumor primário (Bridger, 2005).

Controvérsias no tratamento de melanomas malignos de cabeça e pescoço incluem: linfocintilografia com biópsia do linfonodo sentinela, dissecação nodal, tamanho da margem, o papel da radioterapia e reconstrução. Um desafio é que o melanoma maligno de mucosa tende a se disseminar radialmente e envolver grandes áreas da mucosa (Mathur, 2011).

O esvaziamento cervical terapêutico é indicado para metástase linfonodal no pescoço, ao passo que a indicação do esvaziamento eletivo ainda é controversa. A biópsia do linfonodo sentinela tem tido aceitação crescente no tratamento do melanoma maligno cutâneo, mas não tem sido empregada no tratamento de melanoma maligno de mucosa (Mathur, 2011).

O papel da radioterapia no tratamento do melanoma maligno de mucosa não está claramente definido, e o melanoma maligno tem sido, tradicionalmente, considerado relativamente insensível à radiação, mas alguns estudos sugeriram um benefício real. Gilligan e Slevin (1991) realizaram um estudo retrospectivo de 28 casos de melanoma maligno de mucosa da cavidade nasal e seios paranasais tratados por radioterapia definitiva. A regressão completa inicial foi observada em 22 dos 28 casos (79%). O controle local pela radioterapia somente foi alcançado em 17 dos 28 casos (61%), mas o acompanhamento era limitado em muitos casos, devido à morte prematura do paciente por causa da doença metastática. A sobrevida livre de doença foi observada em 49% dos pacientes em 3 anos de acompanhamento. A abordagem de tratamento com radioterapia radical para melanoma maligno de mucosa pode ser justificada com base no controle do local atingido, na baixa morbidade do tratamento em pacientes que são, geralmente, idosos e na propensão para disseminação da doença.

A forma de administração da radioterapia necessária para alcançar o controle local não está estabelecida, bem como, a influência da dose por fração.

Mathur (2011) afirmou que o tratamento é, geralmente, mais bem-sucedido com doses mais elevadas de radioterapia. Apesar de seu efeito benéfico, a radioterapia é, normalmente, considerada como uma modalidade adjuvante reservada para as margens cirúrgicas positivas, recorrência local, ou como cuidado paliativo. Entretanto, ainda não há evidência de alto nível de que a cirurgia com radioterapia adjuvante possa melhorar a sobrevida global dos pacientes com melanoma maligno mucoso de cabeça e pescoço.

Alguns autores recomendam radioterapia adjuvante para os sítios primários e cadeias de drenagem linfonodal. Ensaios clínicos são claramente necessários para avaliar a eficácia de tratamentos adjuvantes locais e sistêmicos em diminuir a recorrência e melhorar a sobrevida. Embora o interferon-alfa 2b seja, frequentemente, oferecido a pacientes com melanoma maligno da mucosa como terapia sistêmica adjuvante, ainda não foi formalmente estudado. Com os dados emergentes nas *KIT* mutações/superexpressão no melanoma maligno da mucosa e da eficácia de inibidores de tirosina quinase de *KIT* em tratar melanomas malignos metastáticos mucosos, seria aconselhável avaliar o papel destes agentes na terapia adjuvante (Seetharamu, 2010).

A quimioterapia/imunoterapia, geralmente, é utilizada como adjuvantes ou com intenção paliativa. Os agentes quimioterápicos mais usados são: dacarbazina; análogos de platina; nitrosourea, e as toxinas microtubulares. A imunoterapia mostrou-se eficaz apenas em uma pequena porcentagem dos pacientes com melanoma maligno. O aumento da taxa de resposta foi observado quando a Interleucina 2 (IL-2) e Interferon (IFN-alfa) foram usados com cisplatina (Mathur, 2011).

Numa série de 141 pacientes tratados com MMCP no *Institut Gustave-Roussy* na França, 39 casos foram tratados com cirurgia seguida de radioterapia adjuvante. Apesar de uma proporção significativamente maior de T3 e T4 pacientes no grupo de radioterapia adjuvante ($p = 0,02$), o

controle local da doença aumentou. Observou-se uma taxa de controle locorregional (62% *versus* 26%, $p = 0,05$). No entanto, a adição de radioterapia adjuvante não previniu o surgimento de metástases a distância e não teve relação com sobrevida livre (Temam *et al.*, 2005).

Um estudo incluindo dados de nove centros no Norte do Japão, perfazendo 66 pacientes com MMCP, vinte e um casos foram tratados com radioterapia para o tumor primário, sem cirurgia prévia. Houve uma taxa de resposta completa de 29% e a taxa de sobrevida específica em 3 anos foi de 33%. Na análise univariada, observou-se que uma dose elevada por fração (≥ 3 Gy) ofereceu melhor controle local e sobrevida, porém sem significância estatística na análise multivariada (Wada *et al.*, 2004).

Estudos sobre bioquimioterapia, que é combinação de quimioterapia e imunoterapia, para pacientes com MMCP, são escassos. Foi relatada a experiência no tratamento de 15 pacientes com MMCP avançado no Centro de Câncer MD Anderson. A taxa de resposta global na série foi de 47%. A taxa de resposta completa foi de 27%. A sobrevida global mediana de 22 meses foi relatada. Os autores do estudo recomendaram o uso de bioquimioterapia não apenas para a doença metastática, mas também como terapia neoadjuvante em pacientes com a doença locorregional ou extensiva recorrência (Bartell *et al.*, 2008).

Um interesse crescente nos marcadores moleculares de melanoma maligno tem sido observado nos últimos anos. Alguns marcadores moleculares têm mostrado resultados promissores como potenciais indicadores de prognóstico. Nenhum destes marcadores ainda pode ser recomendado para uso na prática clínica. Seu valor no tratamento MMCP ainda precisa ser comprovado. Entretanto, eles podem representar uma nova perspectiva de tratamento (Rivera *et al.*, 2008).

3.1.6 Prognóstico

A taxa de mortalidade nos pacientes com MMCP em 3 anos é superior a 50%. As margens cirúrgicas negativas e o tamanho da lesão primária parecem ser preditivos de resultado. As taxas de sobrevida de 5 anos variam de 15%-30%, com um tempo médio de sobrevida de 25 meses. O melanoma maligno gengival tem uma taxa de sobrevida ligeiramente superior a 5 anos (18%) do que o melanoma maligno de palato (11%) com um tempo de sobrevida médio mais longo (46 meses versus 22 meses) (Mathur, 2011). As dificuldades para a obtenção de margens cirúrgicas livres, devido a uma tendência acentuada para invadir em profundidade, além da metastatização hematogênica precoce, são fatores que podem explicar o seu mau prognóstico.

Chan *et al.* (2012) afirmaram que os melanomas malignos da cavidade oral são mais propensos a ter um envolvimento nodal na apresentação. O prognóstico de MMCP continua reservado. As evidências atuais ainda suportam a cirurgia como melhor chance de cura. O papel da radioterapia adjuvante é controverso e não parece melhorar a sobrevida global. Do mesmo modo, o papel do esvaziamento cervical ainda não está bem definido.

Sharma (2012) afirmou que o MO é uma neoplasia rara. Os tumores tendem a metastatizar ou invadir o tecido localmente mais rapidamente do que os outros tumores malignos da cavidade oral. A sobrevida dos pacientes com MC é menor do que daqueles com MC. O tamanho do tumor e volume da metástase estão diretamente relacionados com o prognóstico da doença. A detecção precoce é importante.

Guimarães *et al.* (2003) afirmaram que melanomas malignos de fossa nasal são tumores raros, de prognóstico ruim, que apresentam sintomatologia tardia e inespecífica. Geralmente, são unilaterais em sua fase inicial, e os sintomas principais são a obstrução nasal e a epistaxe. Não guardam relação com o sexo, acometendo pacientes a partir da sexta década de vida.

O diagnóstico histopatológico é feito, na maioria das vezes, em estágios avançados da doença. O tratamento de primeira escolha é a cirurgia, desde que não contraindicada. Existem discussões quanto à eficácia do tratamento radioterápico, sendo que alguns autores defendem a sua utilização apenas como medida paliativa que amenizaria danos estéticos e funcionais (Guimarães *et al.*, 2003).

Em geral, o prognóstico é reservado. No estudo AFIP, a sobrevida em 5 anos foi de 11% e 20 anos de sobrevida foi de 0,5% (Guimarães *et al.*, 2003). Existem discussões quanto à eficácia do tratamento radioterápico, sendo que alguns autores defendem a sua utilização apenas como medida paliativa, que amenizaria danos estéticos e funcionais (Guimarães *et al.*, 2003).

3.2 Via *MAPK*

3.2.1 Aspectos gerais

O desenvolvimento do melanoma maligno é um clássico exemplo de uma neoplasia que progride passando por diferentes estágios reconhecidos por meio de suas características clínicas e histológicas. Entretanto, o evento molecular chave que desencadeia a progressão desta neoplasia ainda não foi esclarecido, o que explica porque não há terapia específica e porque quase nenhum benefício clínico de novos tratamentos foi claramente demonstrado em pacientes com melanoma maligno desde a década de 70 (Winnenpenninckx *et al.*, 2006).

A descoberta das mutações ativadoras do *BRAF* ampliou o leque de alterações genéticas conhecidas que ativam a via *MAPK*, evidenciando, desta forma, a importância desta via no câncer. O interesse do estudo do gene *BRAF* em oncologia resulta da observação da presença de mutações ativadoras deste gene em diversos tipos de neoplasias malignas.

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

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

Terapias sistêmicas convencionais, incluindo dacarbazina como agente único e temozolamida, produziram taxas inferiores a 10% de resposta, e não melhoraram a sobrevida. Recentemente, no entanto, o tratamento do melanoma maligno tem sido revolucionado por terapias que visem a proteínas quinase ativadas por mitógenos (*MAPK*) ativado RAF-MEK-ERK. Esta via é constitutivamente ativada na maioria dos melanomas malignos (Figura 1, por meio de mutações oncogênicas em *BRAF* quinase ou em seu regulador a montante, N-RAS) (Dong *et al.*; Omholt *et al.*, 2003; Gowrishankar *et al.*, 2013).

FONTE: (Gowrishankar *et al.*, 2013)

Figura 1- MAPK cascata de sinalização

3.2.2 Sinalização *MAPK*

A sinalização em nível celular é o mecanismo pelo qual sinais que estão presentes na região extracelular são conduzidos e interpretados pela célula. O comando inadequado das vias de sinalização pode desencadear muitas doenças, incluindo o câncer. Em vários tipos de neoplasias que acometem os seres humanos, são observadas, frequentemente, alterações da via *MAPK* por meio da ativação constitutiva (Abeloff *et al.*, 2008).

As *MAPKs* constituem uma rede de transmissão de sinais de estímulos induzidos em cascata que, em condições normais, controlam o desenvolvimento celular, sobrevivência e migração por meio de transdução de sinais proliferativos originados pelos receptores da superfície celular e elementos de sinalização citoplasmática para o interior do núcleo por meio de episódios de fosforilação (Smalley, 2010).

A proteína Ras é ativada mediante fosforilação do receptor tirosina kinase. Ras ativa, então, a proteína kinase Raf-1, que ativa a MEK1/2, que, por sua vez, ativa ERK1/2. A ERK pode, então, ativar alvos citoplasmáticos ou nucleares que regulam proliferação celular e promovem sobrevivência (Figura 2). Como exemplo, a ERK é capaz de regular a atividade e os níveis das proteínas pró-apoptóticas BIM e a antiapoptótica MCL-1 (Balmanno & Cook, 2009).

FONTE: Silva *et al.*, 2009.

Figura 2 - Cascata da MAP quinases na célula.

As *MAPKs* (EC 2.7.12.2) compreendem um amplo número de proteínas, tais como ERK1-ERK3 (quinase regulada por sinal extracelular), JNK1-JNK3 (quinase c-Jun N-terminal), p38 α , p38 β , p38 γ , p38a, ERK5 e ERK7. A composição tridimensional de ERK2 (código PDB: 1gol, resolução 2,80Å) revelou dois comandos. O domínio N-terminal é composto, especialmente, por fitas-beta e duas hélices, a hélice-alfa C e a hélice-alfa L16. O domínio C-terminal consiste, sobretudo, de hélices-alfa, além de quatro fitas-beta curtas, que contêm muitos dos resquícios envolvidos na catálise (Zhang *et al.*, 1994).

A via de sinalização *MAPK* requer fosforilação de resíduo de tirosina e treonina, as duas catalisadas por MEK (quinase ativadora da MAP quinase), para se virarem ativas. Em resultado, essas quinases são inativadas pelos três maiores grupos de fosfatases: todas as que movem fosfato de serina/treonina ou de tirosina, e as fosfatases dual-específicas, que removem fosfato de serina, treonina e tirosina (Cobb, 1999).

As mutações dos genes *BRAF* e *NRAS* têm sido mostrados em 53% a 66% e 9% a 29% de todos os melanomas malignos, respectivamente. Mutante *BRAF* e *NRAS* pode ativar a jusante MEK1/2-ERK1/2 oncogênico via de transdução de sinal de forma independente. Curiosamente, a maioria

dos melanomas malignos tem ou *BRAF* ou *ARN* mutações, mas não ambos (Davies *et al.*, 2002).

O gene *CDKN2A*, também chamado como *INK4A*, *CDK4I* e *MTS1*, é um gene supressor de tumor que tem como função codificar a proteína designada p16. A p16 é analisada como inibidora específica das quinases dependentes de ciclina, *CDK4* e *CDK6*, constituindo estas as principais *CDKs* que se ligam às ciclinas D, contribuindo na influência da transição da fase G1 para S. Deleções ou mutações do gene codificador da p16 têm sido evidenciadas em linhagens celulares de melanoma maligno, indicando a acuidade desse gene no acréscimo da referida neoplasia. A identificação das mutações de *CDKN2A* em células germinativas de indivíduos com melanoma maligno familiar concebe prova da importância da proteína por ele codificada na predisposição ao melanoma maligno (Hayward, 2003).

A pRb é considerada supressora de tumor e normalizadora do ciclo celular, controlando a progressão de G1 para S. A regulação ocorre em consequência da repressão da celeridade do fator de transcrição responsável por promover a proliferação celular. Respondendo aos estímulos mitogênicos, a atividade supressiva do desenvolvimento da pRb é cancelada pela sua fosforilação no final da fase G1. Esse processo é dependente dos complexos ciclina D/*CDKs*. A perda de sua função, por mutações, coopera para ambas as formas de câncer, familiar e esporádico (Lukas *et al.*, 1999). No melanoma maligno, a influência do ciclo celular sofre falha na atividade da pRb; entretanto, sabe-se que essa falha não ocorre devido à falta ou mutação da proteína (Roesch *et al.*, 2005).

O gene inicialmente encontrado com mutação em melanomas malignos cutâneos foi o *NRAS* (homólogo do oncogene viral *RAS* do neuroblastoma), em 15 a 25% das linhagens celulares de melanoma maligno e tumores primários. Constituíram mutações descobertas em *NRAS* em 56% nevo congênito, 33% de tumores primários e 26% dos tumores metastáticos.

A mutação de *NRAS* foi detectada em 20% dos melanomas malignos primários, a maior parte das lesões com mutação *RAS* foi em sítios expostos ao sol, sugerindo que a irradiação ultravioleta causou a mutação (Chin *et al.*,

2006). As mutações do *BRAF* são corriqueiras em melanomas malignos cutâneos decorrentes da exposição solar intermitente (59%), como tronco e braços, confrontados com apenas 23% de melanomas malignos acrais e 11% de melanomas malignos das mucosas, exceto em melanoma maligno uveal. A variação mais comum em *BRAF*, a qual contabiliza mais de 90% dos acontecimentos de câncer abrangendo este gene, é a permuta de ácido glutâmico para valina na disposição 600 (V600E), classicamente nevo congênito não está agregada a danos induzidos por radiação ultravioleta (Chudnovsky, 2005).

Embora mutações somáticas *BRAF* tenham sido relatadas em uma frequência muito alta em nevos e melanoma maligno, e com uma frequência menor em muitas neoplasias humanas, o gene *BRAF* não parece desempenhar qualquer papel na susceptibilidade ao melanoma maligno. No entanto, os resultados negativos podem sugerir que outros genes na via da quinase RAS-RAF-MAP possam desempenhar um papel na susceptibilidade ao melanoma maligno e devam ser testados para a mutação da linha germinativa em famílias propensas a desenvolverem melanoma maligno (Laud, 2003).

A ERK é um regulador de sinalização extracelular, também envolvida na regulação da melanogênese por meio da estimulação MITF de degradação. Quando ativada, a ERK fosforilada (p-ERK) induz a fosforilação de MITF e provoca a sua degradação, levando à inibição da melanogênese. A inibição da via ERK é ativada para aumentar a atividade do promotor TRK e aumentar a melanogênese. Assim, é bem documentado que a via ERK está intimamente relacionada com a melanogênese MITF-mediada (Englaro, 1998).

No melanoma maligno, a atividade do ERK está aumentada tanto nas fases iniciais como nas fases avançadas da doença. Uma teoria é que a mutagênese de NRAS ou *BRAF*, a qual ocorre antes ao ERK, é, primariamente, causada pela ativação do ERK notada. Contudo, mutação de *BRAF* tem sido mostrada em nevos e ERK ainda é ativada apenas na minoria desses exemplares, outro mecanismo regulador precisa ser no lugar

de minimizar estimulação da *MAPK* inoportuna. Entretanto, intensa evidência sustenta o argumento de que mutações do *BRAF* oncogênicas ocorrem na superativação de MEK/ERK, o qual alimenta o fenótipo transformado em melanoma maligno (Jarell *et al.*, 2007). Raf-1, analisada como um dos fundamentais componentes do mecanismo de ativação de ERK, é também um dos fatores mais influentes na prevenção da apoptose. Estudos mostraram que Bcl-2 pode direcionar Raf-1 para a mitocôndria e que Raf-1 ativo ligado às sequências-alvo das proteínas da membrana externa da mitocôndria protege a célula contra apoptose (Figura 3). As ERK são ativadas em resposta aos estímulos dos fatores de crescimento, o que é essencial para a proliferação e diferenciação celular, além disso, outros trabalhos comprovaram que a ativação dos mecanismos de sinalização das ERK está relacionada à sobrevivência das células (Xia *et al.*, 1995).

FONTE: Araújo *et al.*, 2001.

Figura 3 - Representação esquemática da via de transdução de sinal da MAP quinase ERK 1/2. Quando um agonista (como o TNF- α , por exemplo) liga-se ao receptor tirosina quinase, ocorre uma autofosforilação e cooptação de um complexo de proteínas (Shc/Grb2/Sos) que ativa Ras próximo à membrana. Ras ativa c-Raf-1, ou MAP, que, por sua vez, fosforila a próxima quinase do módulo, MEK 1/2 (MAP quinase quinase). MEK 1/2 forma um complexo citoplasmático com ERK 1/2 (MAP quinase) inativada; quando MEK fosforila ERK, as duas se separam, e ERK ativada transloca-se rapidamente para o núcleo, em que fosforila substratos, tais como fatores de transcrição (FT), incrementando a transcrição de genes envolvidos em processos como contração de musculatura estriada e lisa, inflamação e edema, controle do tônus vascular, sobrevivência e função do miocárdio. A fosfatase MKP-1 defosforila e desativa ERK 1/2, que, novamente, forma um complexo com MEK1/2.

3.2.3 Correlações clínicas da via MAPK

Mutações no gene *BRAF* foram detectadas em estudo que utilizou sequenciamento de DNA capturado por meio de microdissecção a laser em 18 melanomas malignos *in situ*, 64 melanomas malignos primários invasivos e 51 nevos. Os nevos mostraram a maior frequência de mutações *BRAF* (82%). Em melanomas malignos invasivos, mutações foram identificadas em 29% dos casos e em apenas 5,6% dos melanomas malignos *in situ*. A

maioria das mutações foi encontrada em melanomas maligno primários do subtipo disseminação superficial, bem como em lesões de áreas com exposição solar intermitente. Mutações também ocorreram com maior frequência em tumores associados a um nevo contíguo, apesar de este não ter sido observado em todos os melanomas malignos mutados. Esses dados apoiam a evidência de que a cascata RAS/RAF/MAPK está ativada em uma grande proporção de lesões melanocíticas, mas essas mutações não são suficientes para a transformação maligna. Os autores sugerem que mutações no gene *BRAF* contribuem para o desenvolvimento de lesões melanocíticas benignas, mas, no caso de melanomas malignos, contribuem apenas em conjunto com outras mutações (Poynter *et al.*, 2006).

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

Apesar de a via de sinalização celular do EGF não ter sido completamente elucidada, dois importantes ramos são bem conhecidos: a via de sinalização intracelular fosfatidilinositol 3 quinase (AKT) e a via proteína quinase mitógeno ativada (MAPK). Estas vias podem ser responsáveis pela atividade da via de sinalização EGFR.

Dados de outras neoplasias sugerem que suas expressões podem ser independentes do padrão de expressão de EGFR e dados pré-clínicos em melanoma maligno sugerem que, na inibição do EGFR, a persistência da ativação de uma dessas vias pode ser determinante de resistência a inibidores de EGFR (Meira *et al.*, 2009).

Biomarcadores são características objetivamente mensuráveis de processos biológicos normais ou patológicos e de resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica (*Biomarkers Definitions Working Group*, 2001), com complexidade metodológica potencialmente muito ampla, variando de imuno-histoquímica a lâminas com microarranjos de DNA, passando pela reação de cadeia polimerase (PCR) e *fluorescent in situ hybridization* (FISH).

3.3 Proto-oncogene *KIT*

3.3.1 Aspectos gerais

O proto-oncogene *KIT* apresenta 21 éxons e codifica uma proteína transmembrana de peso molecular de 145.000 kD (Rubin *et al.*, 2001). Essa proteína é, estruturalmente, dividida em três regiões: uma região de ligação extracecular, uma região transmembrana e uma região intracelular que contém os domínios justamembrana e o de tirosina quinase (Rubin *et al.*, 2001). O receptor *KIT* é um membro da família dos receptores de tirosina quinase subclasse III que inclui dois outros membros, FLT3 e PDGFR. A interação do ligante (Fator de Crescimento de Células-Tronco – *stem cell factor*) ao receptor *KIT* resulta em autofosforilação nas tirosinas localizadas na região intracelular, seguida pela fosforilação de proteínas comprometidas com várias vias de sinalização responsáveis pelos mecanismos de proliferação celular (Rubin, *et al.*, 2001, Corless *et al.*, 2004). Esse receptor *KIT* continuamente ativado não necessita da ligação ao Fator de Crescimento de Células-Tronco para dimerização e autofosforilação, logo, há um desequilíbrio no ciclo celular, impedindo a apoptose e estimulando a proliferação celular (Rubin *et al.*, 2001, Corless *et al.*, 2004). A Figura 4 ilustra os mecanismos relacionados à via de sinalização dos receptores *KIT*.

A proteína *c-KIT* (CD117) é uma tirosina quinase transmembrana que atua como receptor para o fator de crescimento de mastócitos – *stem factor* ou *KIT ligant*. O receptor *c-KIT* sinaliza apenas em resposta ao seu ligante, o

stem cell. As mutações no gene que codifica o *c-KIT* fazem com que seu ligante específico não seja mais necessário, resultando em proteínas constitutivamente ativas e o *c-KIT* passa a sinalizar independentemente de seu ligante (Jung *et al.*, 2010).

Figura 4 - Vias de sinalização dos receptores *KIT* e PDGFRA no GIST (Braggio, 2010)

3.3.2 Associação de *KIT* e progressão tumoral

A progressão tumoral está fortemente associada com a atividade de receptores tirosina quinase (RTK) e suas vias de transdução de sinais intracelulares, que regulam diversas funções celulares, incluindo a proliferação, apoptose, motilidade, adesão e angiogênese. Estudos

estruturais e funcionais detalhados de RTK, incluindo o gene *KIT*, revelaram a complexidade desses sistemas receptores e contribuíram para o desenvolvimento de abordagens clínicas específicas, com importância para o prognóstico e tratamento (Satzger *et al.*, 2008)

A via de sinalização *KIT* tem sido objeto de intensa pesquisa e estratégias farmacêuticas para identificar novas abordagens baseadas em evidências para o tratamento do câncer. A evidência de que a sinalização *KIT* para a proliferação e sobrevivência celular, em conjunto com a frequência em que esta via é fortemente ativada no câncer, suporta os atuais esforços para identificar abordagens para a sua eficaz inibição. Mutações em *KIT* são associadas com várias neoplasias em seres humanos, tais como: tumores estromais gastrointestinais, leucemia de mastócitos e melanoma maligno

Jung *et al.* (2010) relataram, em seu estudo, que a expressão *KIT* em neoplasias malignas é de grande interesse por se tratar de um inibidor de tirosina quinase, o mesilato de *imatinib* (STI571, Glivec®). No caso de melanomas malignos, a mutação mais comumente descrita é a L576P no éxon 11, contudo, essa mutação está presente em, no máximo, 2% dos melanomas malignos (Jung, 2010).

Went *et al.* (2004) avaliaram a incidência da expressão *KIT* em 39 tipos de melanomas malignos, sendo que 14 (35%) apresentaram resultado *KIT* positivo. Dois casos de melanomas malignos positivos foram, posteriormente, avaliados por PCR e o melanoma maligno foi a única neoplasia, além dos GISTs (tumores estromais do trato gastrointestinal), que apresentaram a mutação L576P no estudo. Os autores concluíram que o achado da mutação no éxon 11 em um dos dois melanomas malignos avaliados parece superestimar a verdadeira incidência dessa. Os resultados do estudo sugerem que a expressão *c-KIT* não é prevalente na maioria das neoplasias e que, com exceção dos GISTs, as mutações do gene *KIT* são raras em tumores que apresentam positividade imuno-histoquímica.

Curtin *et al.* (2006) afirmaram que melanomas malignos de mucosas, acrais e cutâneos com dano crônico induzido pelo sol apresentam aberrações genéticas que afetam o *c-KIT*. Foram analisados dados da

matriz de hibridação genômica comparativa de 102 melanomas malignos primários (38 de mucosa, 28 acral e 18 cutâneos sem dano causado pelo sol, e 18 cutâneos com dano crônico induzido pelo sol). Foi encontrada a amplificação estreita no 4T12 e foram analisados os genes candidatos dentro dela. As mutações oncogênicas em *KIT* foram encontradas em três dos sete tumores com amplificações e/ou aumento de cópias de *KIT* em 39% dos melanomas malignos de mucosa, 26% acral, 28% dos melanomas malignos cutâneos cronicamente danificados pelo sol, mas não foram observados em melanomas malignos cutâneos sem danos crônicos causados pelo sol. Setenta e nove por cento dos tumores com mutações e 53% dos tumores com várias cópias do *KIT* demonstraram aumento dos níveis de proteína *KIT*. Os autores concluíram que o *KIT* é um oncogene importante no melanoma maligno, porque a maior parte das mutações *KIT* encontrada no melanoma maligno também ocorre em cânceres de outros tipos que respondem a *imatinib*. Portanto, o *imatinib* pode oferecer um benefício terapêutico imediato para uma proporção significativa de melanomas malignos.

Um estudo realizado com o objetivo de investigar se o *KIT* regula a proliferação normal de melanócitos em humanos e se ele desempenha alguma função em melanomas malignos, mostrou que melanócitos humanos normais respondem ao fator de crescimento de mastócitos (MGF), o ligante do *KIT*, que estimula a fosforilação de resíduos de tirosina do próprio *KIT* e induz a fosforilação sequencial de resíduos de tirosina em diversas outras proteínas, e identificou a *MAPK* como uma das proteínas intermediárias fosforiladas nesta cascata. Foi observado que o MGF não induziu nem a proliferação nem a cascata de fosforilação de proteínas ou a ativação da *MAPK* na maioria das culturas de células de melanomas malignos nodulares primários e metastáticos que cresceram *in vitro*, independente de fatores exógenos, o que mostra que *c-KIT* não é responsável pela proliferação autônoma da maioria dos melanomas malignos. Os autores concluíram que, embora a *c-KIT* quinase seja um potente regulador de melanócitos humanos

normais, sua atividade não está associada com transformação maligna (Funasaka *et al.*, 1992).

Beadling *et al.* (2008) identificaram, recentemente, uma mutação *KIT* no éxon 11, em um melanoma maligno anorretal de um paciente que teve uma excelente resposta ao tratamento com *imatinib*. Para determinar a frequência de mutações *KIT* e os subtipos, os autores pesquisaram uma grande série de tumores. Foram analisados 189 melanomas malignos quanto a mutações em *KIT* nos éxons 11, 13 e 17. O número de amplificações *KIT* foi avaliado por PCR quantitativa. Um subconjunto de casos foi avaliado para mutações *BRAF* e *NRAS*. A imuno-histoquímica foi realizada para avaliar a expressão *KIT* (CD117). Os resultados mostraram que mutações *KIT* foram detectadas em 23% (3 de 13) dos melanomas malignos acral; 15,6% (7 em 45) dos melanomas malignos de mucosa; 7,7% (1 de 13) dos melanomas malignos do tecido conjuntivo, 1,7% (1 de 58) de melanomas malignos cutâneos, e 0% (0 de 60) de melanoma maligno de coróide. Quase todas as mutações *KIT* eram sensíveis ao *imatinib*. Não houve sobreposição com mutações *NRAS* (11,1% acral e 24,3% dos tumores de mucosas) ou com mutações *BRAF* (ausente nos tumores de mucosa). Aumento do número de cópias do *KIT* foi detectado em 27,3% (3 de 11) dos melanomas malignos acral, e 26,3% (10 de 38) dos melanomas malignos de mucosa, mas foi menos comum entre o melanoma maligno cutâneo (6,7%; 3 de 45), conjuntivo (7,1%; 1 de 14), e melanomas malignos da coróide (0 de 28). A expressão CD117, presente em 39% dos 105 tumores representando todos os tipos de melanoma maligno, não se correlacionou com qualquer estado de mutação do *KIT* ou amplificação do *KIT*. Os resultados do estudo confirmaram que as mutações *KIT* são mais comuns em melanoma maligno de mucosa e acral, mas não necessariamente se correlacionam com o número de cópias *KIT* ou expressão CD117. A triagem de mutações *KIT* pode abrir novas opções de tratamento para pacientes com melanoma maligno.

Satzger *et al.* (2008) afirmaram que dados recentes têm sugerido um aumento da frequência de aberrações no gene *KIT* em melanomas malignos

de mucosa, enquanto que *KIT*, na maioria dos tipos de melanomas malignos cutâneos, não parece ser de importância patogênica. Contudo, os estudos bem fundamentados que investigaram o estado do gene *KIT* correlacionado a pacientes com melanoma maligno de mucosa ainda são escassos. Os autores avaliaram 44 amostras de históricos de 39 pacientes diagnosticados com melanomas malignos de mucosa de diferentes locais. A expressão da proteína *c-KIT* foi determinada por imuno-histoquímica, as mutações do gene *KIT* foram analisadas por amplificação por PCR e sequenciamento de DNA éxons 9, 11, 13, 17 e 18. A expressão *c-KIT* foi observada em 40 de 44 amostras (91%) de tumores de pelo menos 10% das células tumorais. Em 6 dos 37 pacientes (16%), foram encontradas mutações do gene *KIT*, sendo que 5 foram no éxon 11; e 1 no éxon 18. A presença de mutações no éxon 11, correlacionada com uma significativa expressão imuno-histoquímica da proteína *c-KIT* ($p=0,015$). Entre os 6 pacientes com mutações, 2 pacientes apresentaram tumor primário localizado na região da cabeça e pescoço; em 3 pacientes, o tumor estava localizado no trato geniturinário; e 1 pacientes na região anal/retal. Os autores concluíram que as mutações no gene *KIT* podem ser encontradas em um subconjunto de pacientes com melanomas malignos de mucosa, independentemente do local do tumor primário. Os dados do estudo encorajam tentativas terapêuticas com inibidores de tirosina quinase nesses pacientes.

Willmore-Payne *et al.* (2005) pesquisaram em 100 casos de melanomas malignos (74 metastáticos, 12 primários e quatro *in situ*) a presença de mutações de *KIT*. Previamente, todos os casos foram submetidos a exame imuno-histoquímico e apenas os casos com alguma positividade para CD117 foram avaliados por meio de PCR e sequenciamento para identificação de mutações ativas no gene. Foi observado que a maioria dos melanomas malignos invasivos e metastáticos não apresenta expressão imuno-histoquímica do *c-KIT*, embora todas as lesões *in situ* e o componente funcional das lesões invasivas foram fortemente positivos, sugerindo que a maioria dos melanomas malignos perde a expressão do *c-KIT* durante a progressão tumoral. Dois casos de

melanomas malignos metastáticos (2%) com positividade imuno-histoquímica forte e difusa apresentaram uma mutação ativa do *KIT*, a L576P, resultado de uma troca de pares de bases T → C no éxon 11. Nenhum alelo normal esteve presente nestes casos, sugerindo que essa mutação foi ou homozigota ou hemizigota e o isolamento do DNA de tecido normal destes dois casos não apresentou alteração. Nenhuma outra mutação do *KIT* verificada nos éxons 9, 13 e 17 foi observada, e esses dois casos positivos não apresentaram mutações *BRAF*, também pesquisada nesse estudo. Estes dois casos corresponderam a lesões metastáticas cujas lesões primárias correspondentes não foram avaliadas (Willmore-Payne *et al.*, 2005).

Em estudo subsequente, o mesmo grupo de pesquisadores acima avaliou 53 casos adicionais de melanomas malignos e encontrou mais um caso com a mutação L576P. Avaliação do sequenciamento do DNA desses três casos mostrou predominância do alelo mutante, o que indica perda seletiva do alelo normal. Para determinar o número de cópias do *c-KIT*, hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) foi realizada. Um caso mostrou amplificação do gene e os outros dois casos se apresentaram em estado diploide, mas não amplificados, o que sugere que eles sejam homozigotos para o gene mutante. Devido aos resultados obtidos nesta análise, os autores sugeriram que, em melanomas malignos, a mutação L576P é oncogênica apenas quando o seu produto proteico atinge uma concentração anormalmente alta (Willmore-Payne *et al.*, 2005).

Ashida *et al.* (2009) afirmaram que estudos recentes mostraram que aberrações do gene *KIT* num número substancial de melanomas malignos cutâneos, de mucosa e acral sugerem efeito terapêutico positivo de inibidores de tirosina quinase, tais como o *imatinib*. Os autores estudaram a expressão e as mutações do gene *KIT* em quatro melanomas malignos metastáticos de mucosa e acral primários. A análise imuno-histoquímica revelou expressão da proteína *c-KIT* moderada ou forte em 13 (48%) dos tumores. A análise da sequência revelou mutações K642E e D820Y em duas metástases. A amplificação de *KIT* foi identificada por PCR em tempo

real em quatro tumores, incluindo um que tinha mutação K642E. A análise *Western blot* mostrou a fosforilação do receptor *KIT* em 8 (62%) de 13 amostras criopreservadas, indicando a ativação patológica frequente do receptor *in vivo*. A fosforilação da proteína *KIT* foi detectada em 2 tumores portadores de mutações *KIT*, bem como em um tumor com amplificação do gene *KIT*. Por outro lado, 5 tumores sem alterações do gene *KIT* detectáveis apresentaram fosforilação do receptor *KIT*. O fator de expressão de células estaminais em células de melanoma maligno, bem como as células estromais, sugere ativação autócrina e parácrina SCF/*KIT* nestes tumores. Por fim, os autores verificaram o crescimento de efeitos supressivos significativos de sunitinibe em duas linhas de células de melanoma maligno acral, um portador da mutação D820Y e outra apresentando a ativação SCF/*KIT*. Os resultados demonstraram a ativação patológica do gene *KIT* em um número significativo de tumores de melanomas malignos metastáticos de mucosa e acral, e sugerem um potencial benefício terapêutico do uso de sunitinibe para esses melanomas malignos.

Smalley *et al.* (2009) afirmaram que, à medida que a terapia-alvo do melanoma maligno é pesquisada, as tentativas se voltam para um subgrupo de tumores com base na condução de suas mutações oncogênicas, com a esperança de desenvolver esquemas terapêuticos verdadeiramente personalizados. O *c-KIT* é um receptor tirosina quinase cuja ativação aberrante está implicada na progressão de tumores do estroma gastrointestinal e de algumas leucemias mieloides agudas. O papel de *c-KIT* na sinalização do melanoma maligno tem sido controverso, embora a atividade de *c-KIT* ser crítica para o desenvolvimento de melanócitos, a sua expressão tende a ser perdida na maioria dos melanomas malignos. Alguns estudos têm demonstrado que mesmo a reexpressão de *c-KIT* induz apoptose em linhas celulares de melanoma maligno. A recente publicação do estudo que mostra a presença de mutações de ativação de *c-KIT* em melanomas malignos de mucosa e acral, bem como melanomas malignos na pele com danos crônicos causados pelo sol, renovou o interesse no *c-KIT*

de sinalização nos casos de melanoma maligno. Um estudo recente publicado no laboratório de Smalley *et al.* demonstrou a identificação com a atividade constitutiva de sinalização *c-KIT* resultante da superexpressão do receptor *c-KIT*. Embora os ensaios clínicos iniciais do inibidor de *c-KIT*, mesilato de *imatinib* em melanoma maligno, tenham sido negativos, algumas respostas dramáticas têm sido observadas em pacientes com alta expressão de *c-KIT* e/ou mutações ativadoras documentadas, promovendo a crença de que estudos focados em pacientes selecionados à base do estado mutacional de *c-KIT* produzirão resultados mais positivos.

Torres-Cabala *et al.* (2009) afirmaram que o papel da imuno-histoquímica na avaliação do estado *KIT* em melanomas malignos, sobretudo, melanomas malignos metastáticos de mucosa e acral, ainda não é bem estabelecido. Embora a prevalência de mutações *KIT* em melanomas malignos metastáticos de mucosa e acral seja relativamente baixa, a detecção de mutações do gene *KIT* pode ter implicações terapêuticas profundas. Os autores avaliaram a eficácia da imuno-histoquímica para prever mutações *KIT*. O estudo foi realizado em 173 tumores, compreendendo melanomas malignos primários e metastáticos (141 melanomas malignos lentiginoso de mucosa/acral, 5 nodular, 4 lentiginosos malignos, 3 superficiais se espalhando, 2 uveais, 1 melanoma maligno de partes moles, 8 metástases primárias não classificadas e 9 metástases primárias desconhecidas foram pesquisadas). A expressão imuno-histoquímica do *c-KIT* usando um anticorpo anti-CD117 e a análise de mutação *KIT* por sequenciamento, éxons 11, 13 e 17, foram realizadas. Os resultados mostraram que 81% dos melanomas malignos lentiginoso de mucosa/acral primários e metastáticos apresentaram expressão *KIT* em, pelo menos, 5% das células tumorais. A frequência global de mutações ativadoras do gene *KIT* em melanomas malignos lentiginosos de mucosa/acral foi de 15% (14 dos 91 casos), sendo a mutação L576P no éxon 11 a mais frequentemente detectada (4 de 14 casos). Casos que mostram menos do que 10% de células tumorais positivas foram negativos para mutações *KIT*. Os resultados mostraram, ainda, que 82% (12 de 14)

dos casos positivos para mutação *KIT* apresentaram expressão *KIT* em mais de 50% das células. Uma associação entre a expressão imuno-histoquímica de *KIT* e o estado de mutação foi observada ($p=0,007$). A expressão imuno-histoquímica de *KIT* em menos de 10% das células do componente invasivo dos melanomas malignos lentiginosos de mucosa/acral parece ser um forte indicador negativo de mutação *KIT* e, portanto, potencialmente, podem ser usadas para triagem dos casos para genotipagem *KIT* adicional.

Handolias *et al.* (2010) afirmaram que as mutações do gene *KIT* são mais frequentes em subtipos específicos e a resposta a inibidores de tirosina quinase é provável dependendo da mutação identificada. Os autores avaliaram 32 pacientes com melanoma maligno acral e de mucosa metastático, que foram triados para mutações no gene *KIT*, éxons 11, 13 e 17. As mutações no gene *KIT* foram observadas em 38% dos pacientes com melanoma maligno de mucosa; e 3 em 6% dos pacientes com melanoma maligno acral. Três pacientes foram tratados com mesilato de *imatinib* e um com tosilato de sorafenibe. Todos os quatro pacientes responderam ao tratamento, mas em 3 pacientes, houve metástase para o cérebro. Os autores concluíram que as respostas clínicas observadas apoiam uma investigação mais aprofundada dos inibidores de tirosina quinase em melanoma maligno metastático, selecionados de acordo com o estado de mutação do gene *KIT*.

Satzger *et al.* (2010) afirmaram que, em estudos anteriores, um aumento na frequência de aberrações *KIT* em melanomas malignos de mucosa foi relatado, enquanto que *KIT*, na maioria dos tipos de melanomas malignos cutâneos, não parece ser de importância patogênica. O *imatinib* tornou-se o padrão de tratamento em outros tipos de câncer com mutações *KIT*, tais como tumores estromais gastrointestinais. Recentemente, 12 casos de melanoma maligno metastático e com mutações *KIT* foram tratados com sucesso com inibidores de *c-KIT*, como *imatinib*, sunitinib, dasatinib ou sorafenib. Nesse estudo, os autores relataram que um de seus pacientes com mutação *KIT* em melanoma maligno metastático de mucosa anal apresentou resposta completa ao tratamento com *imatinib*.

Seetharamu *et al.* (2010) afirmaram que o melanoma maligno de mucosa é um tipo raro de câncer que é claramente distinto de sua contraparte cutânea em biologia, curso clínico e prognóstico. Estudos recentes têm mostrado diferenças importantes nas frequências de várias alterações genéticas em diferentes subtipos de melanoma maligno. As mutações de ativação do gene *KIT* são detectadas em número significativo de pacientes com melanoma maligno de mucosa.

Carvajal *et al.* (2011) avaliaram os efeitos clínicos do mesilato de *imatinib* em pacientes com melanoma maligno que apresentaram alterações no gene *KIT*. O estudo de fase 2, em centros acadêmicos de oncologia de uma comunidade em 5 estados nos Estados Unidos, com um único grupo, aberto, contou com 295 pacientes com melanoma maligno, dentre os quais foram selecionados 51 pacientes com presença de mutações *KIT*. O estudo foi realizado no período de 23/04/2007 a 16/04/2010. Um total de 51 casos com mutações do gene *KIT* foram identificadas, e 28 destes pacientes foram tratados, pois apresentavam melanoma maligno em estágio avançado. Os principais parâmetros foram: resposta radiográfica, com pontos finais secundários, incluindo o tempo para progressão, sobrevida global e correlação de alterações moleculares, e resposta clínica. Os autores concluíram que, entre os pacientes com melanoma maligno avançado que apresentaram mutações no gene *KIT*, o tratamento com mesilato de *imatinib* apresentou repostas clínicas significativas em um subgrupo de pacientes. As repostas podem ser limitadas aos tumores portadores de alterações *KIT*, com relevância funcional comprovada.

Yun *et al.* (2011) afirmaram que melanomas malignos de mucosa e acral demonstraram diferentes alterações genéticas e no comportamento biológico comparado com melanomas malignos cutâneos mais comuns. Recentemente, foi relatado que o ganho de função das mutações *KIT* e o aumento no número de cópias são mais comuns em melanomas malignos de mucosa e acral. Assim, os autores estudaram a frequência e o padrão de aberrações do *KIT* em melanomas malignos de mucosa e acral na Coreia. Foram analisados 97 pacientes que foram confirmados patologicamente com

melanoma maligno de mucosa ou acral, entre 1997 e 2010, pelo Samsung Medical Center. Dos 97 pacientes com melanoma maligno, 92 foram selecionados para mutações *KIT* nos éxons 11, 13, 18 e 18, genes *BRAF* e *NRAS*. A amplificação de *KIT* foi quantitativa, avaliada por PCR em tempo real. Dos 97 pacientes, 55 (56,7%) eram de mucosa, 40 (41,2%) foram melanoma maligno acral, e 2 melanomas malignos de origem primária desconhecida. Entre os 7 casos com mutação *KIT*, 5 (60,0%) ocorreram no éxon 11, 1 (20,0%) no éxon 17, e 1 (20,0%) no éxon 13. As mutações pontuais foram as mais comuns, resultando em substituições no éxon 11 (K558R, T574A, L576P, e V559A), éxon 13 (N655K), e éxon 17 (N822K). A nova mutação *KIT* Thr574Ala (c.1720A>G), que não foi relatada no melanoma maligno ou em outros tipos de tumores, foi identificada em um caso de melanoma maligno genital. Dos 97 espécimes de melanoma maligno de mucosa ou acral, 49 foram testados para alterações no número de cópias do gene *KIT*, utilizando PCR quantitativa. O aumento do número de cópias *KIT* foi identificado em 15 pacientes: 7 (40%) de 20 melanomas malignos acral e 8 (31%) de 26 melanomas malignos de mucosa. Os autores concluíram que uma proporção significativa de melanomas malignos de mucosa e acral apresentam mutações *KIT* na população asiática.

Postow e Carvajal (2012) afirmaram que o melanoma maligno é uma doença heterogênea de representação biológica e subgrupos genéticos distintos. Mutações ativadoras do *KIT* foram descobertas em uma proporção significativa de melanomas malignos decorrentes de mucosas, acral e locais cronicamente danificados pelo sol, representando um importante subconjunto genético. Inicialmente, observou-se que o *KIT* funcionava como um supressor de tumores, mas a pesquisa adicional sugere que, em certos contextos, o *KIT* funciona como um oncogene. Estratégias terapêuticas dirigidas para o gene *KIT* com *imatinib* demonstraram uma eficácia notável em pacientes com tumores estromais gastrointestinais, mas os testes iniciais em melanomas malignos foram infrutíferos. No entanto, relatos de casos continuam a surgir, demonstrando uma eficácia notável do *imatinib* para pacientes com aberrações genéticas específicas no gene *KIT*.

Recentemente, estudos de *imatinib* têm selecionado pacientes com alterações genéticas no gene *KIT* e têm apresentado resultados promissores. Os esforços atuais investigam agentes adicionais tendo o gene *KIT* como alvo e inibidores de tirosina quinase são testados em combinação com outros agentes para melhorar os prognósticos de pacientes com este subconjunto genético de melanoma maligno.

Cho *et al.* (2013) avaliaram melanomas malignos acrais amelanóticos, que são muito raros e difíceis de diagnosticar clínica e patologicamente. O tipo completo não mostra nenhuma pigmentação negro-marrom na lesão, enquanto que o tipo incompleto apresenta pigmentação focal ou sutil. No estudo realizado por Cho *et al.*, em 2013, foram analisadas as características clínico-patológicas, mutações *BRAF*, e alterações *KIT* em 34 casos em coreanos. Foram incluídos no estudo 28 casos do tipo completo e 7 casos do tipo incompleto. Ao todo, 26 (45,7%) estavam localizados nos pés dos pacientes, dos quais 21 (82,9%) apresentaram ulcerações. Dezesesseis casos desenvolveram-se em áreas subungueais. O melanoma maligno nodular foi o tipo histológico mais comum (63,6%). Os tipos celulares mais frequentes foram epitelioides e fusiformes. A coloração HMB-45 foi fortemente positiva em 66,7% dos casos de MAA, 4 (12,1%) foram negativos para HMB-45, e 3 deles eram MAA do tipo completo. Dos 33 pacientes, no total, foram detectadas mutações *BRAF* em 2 casos de MAA e as alterações no gene *KIT* estavam presentes em 11 pacientes (33,3%). Quatro casos (12,1%), todos os quais foram MAA do tipo completo, apresentaram mutações *KIT*. As alterações *KIT* foram pouco correlacionadas com imuno-histoquímica positiva para *c-KIT*. Vinte pacientes estavam no estágio TNM I ou II, e a sobrevida média foi de $30,14 \pm 4,54$ meses. O estudo foi limitado pelo pequeno número de pacientes, os autores acreditam que os inibidores de tirosina quinase seriam eficazes para pacientes com mutações *KIT* com MAA do tipo completo.

Mohamed *et al.* (2013) afirmaram que as células que expressam os marcadores de células estaminais CD271 indicam a formação de tumores quando transplantados em ratos. Estes tumores têm um potencial

metastático maior e pior prognóstico do que melanomas malignos resultantes do transplante de células CD271-negativos. Os autores avaliaram os marcadores de células-tronco (CD271, *c-KIT*, SOX10) em melanomas malignos, correlacionando sua presença com fatores prognósticos e resultados. Os autores concluíram que a expressão CD271 em melanomas malignos está associada com aumento da frequência de metástases, e a imunorreatividade ao *c-KIT* está associada a parâmetros prognósticos melhores e melhoria dos resultados.

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

Salama (2013) afirmou que mutações no gene *KIT* podem desempenhar um papel importante melanoma maligno, em particular, aqueles com MMCP e em pacientes com melanomas malignos cutâneos decorrentes de pele cronicamente danificada pelo sol. As mutações *KIT* demonstraram relação com doenças malignas, incluindo a grande maioria das células de tumores estromais do trato gastrointestinal, para qual a eficácia da inibição-alvo foi bem estabelecida. O papel do *KIT* como um oncogene no melanoma maligno tem emergido nos últimos anos. É bem conhecido por ser essencial para o desenvolvimento e sobrevivência dos melanócitos, e, agora, parece ser um oncogene crítico em subconjuntos bem definidos de melanoma maligno. Diversos estudos examinaram a incidência de mutações do *KIT* em subtipos específicos e parece que, aproximadamente, de 15-20% de melanoma maligno acral; e 15-30% de melanoma maligno de mucosa, dependendo de seu sub-sítio anatômico, apresentam mutações *KIT*. As mutações mais comuns parecem estar nos éxons 11 e 13, embora mutações no éxon 17 e outros também tenham sido observadas. Ensaios iniciais com mesilato de imatinib não apresentaram bons resultados, com nenhuma evidência clínica significativa, sendo necessários mais estudos para comprovar sua eficácia.

Estudos indicam que mutações no gene *KIT* podem estar associadas a melanomas malignos metastáticos de mucosa e acral (Curtin *et al.*, 2006; Beadling *et al.*; Satzger *et al.*, 2008; Ashida *et al.*; Smalley *et al.*, 2009; Satzger *et al.*, 2010; Seetharamu *et al.*; Yun *et al.*, 2011; Salama, 2013).

Apesar de Went *et al.* (2004) afirmarem que a expressão *c-KIT* não aparece na maioria das neoplasias e que, com exceção dos GISTs, as mutações do gene *KIT* são raras em tumores que apresentam positividade imuno-histoquímica. Estudos mais recentes (Beadling *et al.*; Satzger *et al.*, 2008; Ashida *et al.*; Smalley *et al.*; Torres-Cabala *et al.*, 2009; Handolias *et al.*; Satzger *et al.*; Seetharamu *et al.*, 2010; Salama, 2013) demonstraram que as mutações *KIT* são comuns em melanoma maligno de mucosa e acral, mas nem sempre estão correlacionadas com o número de cópias *KIT*

ou expressão CD117. Portanto, a triagem de mutações *KIT* pode abrir novas opções de tratamento para os pacientes com melanoma maligno.

As mutações *KIT* mais comuns são observadas nos éxons 11; 13; e 17 (Beadling *et al.*; Satzger *et al.*, 2008; Torres-Cabala *et al.*, 2009; Handolias *et al.*, 2010; Yun *et al.*, 2011; Salama, 2013).

Considerar as aberrações genéticas em *c-KIT* é importante para a terapêutica do melanoma maligno, uma vez que mutações *KIT* também podem ser encontradas em outros tipos de cânceres e respondem bem ao tratamento com *imatinib* e outros inibidores de tirosina quinase (Curtin *et al.*, 2006; Ashida *et al.*; Smalley *et al.*, 2009; Satzger *et al.*, 2010; Cho *et al.*; Mohamed *et al.*; Salama, 2013).

O *imatinib* tem sido considerado o medicamento de escolha para a terapêutica de melanomas malignos em que as mutações *KIT* são identificadas pela análise imuno-histoquímica, por PCR quantitativa (Beadling *et al.*; Satzger *et al.*, 2008; Smalley *et al.*, 2009; Satzger *et al.*, 2010; Carvajal *et al.*, 2011; Postow & Carvajal, 2012). Contudo, o estudo realizado por Salama (2013) demonstrou que ensaios iniciais com o uso de *imatinib* não apresentaram bons resultados, com nenhuma evidência clínica significativa, o que demonstra a necessidade de novos estudos para comprovar sua eficácia na terapêutica de melanomas malignos. A terapêutica com inibidores de tirosina quinase, como o *imatinib*, tem sido considerada promissora em relação ao prognóstico de pacientes com melanoma maligno em que as aberrações genética de *KIT* foram observadas. Isso se deve ao fato de que, em outros tipos de cânceres que apresentam mutações de *KIT*, o tratamento com *imatinib* tem apresentado resultados positivos.

4 Casuística e Métodos

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Casuística

4.1.1 Critérios de inclusão

Para a formação do grupo deste estudo, foram selecionados 28 pacientes matriculados e tratados na Seção de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Instituto Nacional de Câncer – INCA – com o diagnóstico de melanoma maligno de mucosa de cabeça e pescoço. Informações colhidas entre os anos de 1998 e 2009.

4.1.2 Critérios de exclusão

Casos que não possuísem bloco de parafina do tumor ou casos com informações incompletas a respeito do tratamento empregado.

4.1.3 Dados epidemiológicos

Avaliação de prontuários, onde foram colhidos dados epidemiológicos: sexo (masculino ou feminino); idade (em anos) e etnia (branca, negra, mulata).

4.1.4 Variáveis clínicas-patológicas

Além das análises moleculares para a avaliação da mutação do *KIT* e do padrão de resposta ao tratamento empregado (ressecção cirúrgica,

radioterapia ou a combinação de um destes), foram consideradas para análise as seguintes variáveis:

- Localização do tumor primário e do metastático;
- Tempo de tratamento;
- Intervalo de tempo entre o tratamento da lesão primária e a detecção de recidiva (doença metastática, local e regional);
- Tipo de tratamento;
- Tratamento utilizado em caso de recidiva;
- Comportamento biológico do pacientes portadores da mutação;
- Margens de cirúrgicas (ampliação e margens livre);
- Índice mitótico;
- Invasão (óssea, perineural e angiolinfática);
- Pigmentação.

4.1.5 Seguimento

Por meio da consulta ao prontuário médico dos pacientes, foi anotada a data do tratamento cirúrgico, a data da última consulta de controle e a condição do paciente em relação ao seu seguimento: vivo sem doença, óbito secundário à doença, óbito por outro motivo, sendo, nos casos de recidiva, anotada a data da ocorrência e calculado o tempo de acompanhamento em meses.

4.2 Métodos

Estudo retrospectivo de coorte.

4.2.1 Metodologia da extração do DNA

O DNA foi extraído a partir de tecido incluído e fixado em parafina. O procedimento consiste de múltiplas etapas de desparafinização com xilol, seguido pela adição de etano em gradação, para eliminar eventuais resíduos de xilol. A desparafinização com xilol foi seguida pela digestão pela proteinase K (BioAmerica, Inc, Homestead, FL, USA), utilizando o *Wizard® Genomi DNA purification* (Promega, Madison, WI, USA). A proteinase K é responsável pela digestão proteica, além de inibir nucleases que podem degradar o DNA. Os restos celulares foram precipitados por centrifugação e o DNA, no sobrenadante, é utilizado nas reações de PCR (direto ou diluído). A confirmação da extração foi feita por meio da aplicação de uma alíquota de 5 µL em gel de agarose 0.8% em tampão de eletroforese (TBE 1X). Para avaliar a integridade e concentração do DNA extraído, é aplicada uma alíquota de 1 µL no espectrofotômetro ND-1000 (*NanoDrop Technologies Inc.*, Delaware, USA). As amostras de DNA foram, então, conservadas a 4°C.

4.2.2 Análise de mutação em *KIT*

A análise mutacional do gene foi realizada utilizando-se a amplificação por PCR seguida pelo sequenciamento genômico. As análises foram iniciadas pelo éxon 11 no gene *KIT*, em que é encontrada a maioria das mutações (70% das mutações descritas), seguida pelas análises dos éxons 9, 17 e 13. Vale ressaltar que as mutações são exclusivas.

Os éxons 9, 11, 13 e 17 do gene *KIT* são amplificados utilizando-se os pares de iniciadores descritos na Tabela 2. Os pares de iniciadores são desenhados com base no gene *KIT* humano (*GenBank accession nº* U63834). As condições de reação da PCR são realizadas em um volume final de 50 µL, contendo 100ng de DNA, 1X PCR Buffer, 3 mM MgCl₂, 0,25 mM dNTPs, 10 µM primer e 1U Taq DNA polymerase (Invitrogen). As

condições de amplificação consistem de um passo inicial de desnaturação de 2 minutos a 94°C, seguido por 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos, e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram purificados usando o *KIT* de purificação GFX (*GE Healthcare*). Os produtos foram sequenciados no sequenciador automático ABI PRISM TM 377 (*Applied Biosystems Foster City, Califórnia, USA*). Uma alíquota de 5 µl dos produtos de PCR purificados foi aplicada em gel de agarose 2% em tampão de eletroforese (TBE 1X) para confirmação da purificação.

Os produtos de PCR purificados foram preparados para o sequenciamento genômico, utilizando-se volume final de 7,5 µl (solução contendo iniciador, DNA e água mili-Q). O sequenciamento foi realizado utilizando-se o método de Sanger (pelo método de Sanger, uma fita simples de DNA que será sequenciada é hibridizada com um primer de desoxinucleotídeos marcado na ponta 5 - quinta linha). Quatro misturas de reação são preparadas onde os primers utilizados serão alongados por uma DNA polimerase. Cada mistura contém os quatro desoxinucleosídeos trifosfato normais mais um dos quatro didesoxinucleosídeos trifosfato em uma razão de, aproximadamente, 1/100. Uma vez que um didesoxinucleotídeo não tem ponta 3-OH, não é possível haver elongação a partir do nucleotídeo adicionado, parando a reação. Desta forma, cada mistura de reação produzirá cadeias prematuramente terminadas de acordo com toda ocorrência de um didesoxinucleotídeo adicionado. Cada mistura foi, então, separada em um gel de sequenciamento por eletroforese para se detectar cada um do nucleotídeo presente na sequência de DNA lida. Esses sequenciadores analisam as moléculas por meio do processo de eletroinjeção, que é chamado o curto período em que a eletroforese ocorre no capilar imerso na amostra. As moléculas entram no capilar em um fluxo constante, sempre do catodo em direção ao anodo. Quando os fragmentos de DNA atingem a janela de detecção no capilar, um laser excita os corantes fluorescentes. Quatro diferentes substâncias ligadas aos nucleotídeos modificados são empregadas e, uma vez excitadas por um feixe de laser,

emitem luz em diferentes comprimentos de onda, ou seja, emitem quatro cores diferentes. O *software* de sequenciamento interpreta os resultados, titulando cada base em relação à intensidade do composto fluorescente, denominando quatro cores específicas. O *software* para análise do sequenciamento utiliza as mesmas quatro cores específicas para cada base. Por convenção, A (adenina) ficou como verde, C (citossina) como azul, T (timina) como vermelho e G (guanina) como preto na visualização do eletroferograma.

Tabela 2 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes *KIT*

<i>Gene</i>	<i>Alvo</i>	<i>Sequência (3'-5')</i>
<i>KIT</i>	Éxon 9F	TTCCTAGAGTAAGCCAGGGC
	Éxon 9R	ACAGAGCCTAAACATCCCCT
	Éxon 11F	CCAGAGTGCTCTAATGACTGAGAC
	Éxon 11R	AGGTGACATGGAAAGCCCCTG
	Éxon 13F	CTGCATGCGCTTTGACATCAG
	Éxon 13R	CTAGCATTGCCAAAATCATATT
	Éxon 17F	GTTTTCTTTTCTCCTCCAACCT
	Éxon 17R	CCTTTGCAGGACTGTCAAGC

F: Senso; R: Antissenso

4.2.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa SPSS versão 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). A sobrevida global (definida como o tempo entre a data de início do tratamento e a data do óbito) e a sobrevida livre de doença (definida como o tempo entre o tratamento e a recidiva) foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e as curvas de sobrevida comparadas pelo teste de Log-rank. A análise univariada foi feita com o intuito de avaliar a correlação entre as variáveis idade, gênero, sítio do tumor primário, *status* mutacional do gene *KIT* e sobrevida livre de doença (SLD). Além disso, investigamos a correlação entre as variáveis descritas acima e a

sobrevida global (SG). Para avaliar a correlação entre variáveis, foram utilizados os seguintes testes estatísticos: Test T (variável categórica *versus* numérica), Qui-quadrado. Um valor de p igual ou inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5 Aprovações pelas Comissões de Éticas

5 APROVAÇÕES PELAS COMISSÕES DE ÉTICAS

A Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer – CEP/INCA – aprovou o protocolo de pesquisa sob o número 058/08. Posteriormente, a Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq – da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo também o fez, Projeto CAPPesq nº 272/11 (Anexo A).

6 Resultados

6 RESULTADOS

Foram incluídos 28 pacientes no estudo. As informações de cada caso estão sumarizadas na Tabela 3, as fotos 1 e 2 exemplificam 2 casos tratados no INCA e incluídos na casuística do trabalho.

Foto 1 – Melanoma Mucoso de Palato Duro

Foto 2- Melanoma Mucoso de Rebordo Alveolar Superior

Tabela 3 – Sumário dos casos tratados no Instituto Nacional de Câncer (INCA)

CASO	SEXO	RAÇA	IDADE anos	TRATAMENTO	RECIDIVA	SG (meses)	KIT
1	F	Branco	69	Cx+RXT	Sim	117	Selvagem
2	F	Branco	66	Cx+RXT	Sim	54	Selvagem
3	F	Branco	38	Cx	Sim	11	Selvagem
4	F	Branco	88	Cx+RXT	Sim	Vivo	Selvagem
5	F	Branco	64	Cx+RXT	Não	Vivo	Mutado
6	F	Branco	61	Cx+RXT	Não	Vivo	Selvagem
7	F	Branco	62	Cx+RXT	Sim	27	Selvagem
8	F	Branco	62	Cx	Sim	19	Selvagem
9	F	Branco	39	Cx+RXT	Sim	Vivo	Selvagem
10	F	Branco	62	Cx	Não	Vivo	Selvagem
11	F	Branco	27	Cx	Sim	10	Selvagem
12	F	Branco	59	Cx	Sim	Vivo	Selvagem
13	F	Branco	60	Cx	Sim	8	Selvagem
14	F	Branco	76	Cx	Sim	11	Selvagem
15	F	Branco	63	Cx	Sim	14	Selvagem
16	F	Branco	69	Cx	Sim	14	Selvagem
17	M	Branco	32	Cx+RXT	Sim	19	Selvagem
18	M	Branco	85	Cx+RXT	Sim	43	Selvagem
19	M	Branco	47	Cx	Não	Vivo	Selvagem
20	M	Branco	39	Cx+RXT	Sim	64	Selvagem
21	M	Branco	53	Cx+RXT	Sim	99	Mutado
22	M	Branco	52	Cx+RXT	Sim	Vivo	Mutado
23	M	Branco	62	Cx+RXT	Sim	27	Selvagem
24	M	Branco	51	Cx+RXT	Não	Vivo	Selvagem
25	M	Branco	40	Cx+RXT	Sim	15	Mutado
26	M	Negros	81	Cx	Sim	60	Mutado
27	M	Negros	69	Cx+RXT	Sim	21	Mutado
28	M	Negros	76	Cx+RXT	Sim	11	Mutado

F=feminino, M=masculino, Cx+RXT= ressecção cirúrgica seguida de radioterapia adjuvante, Cx=ressecção cirúrgica, SG= sobrevida global

6.1 Variáveis epidemiológicas

6.1.1 Sexo (Gráfico 1)

No estudo epidemiológico, quanto à distribuição por gênero, foram encontrados 12 casos pertencentes ao sexo masculino e 16 casos ao sexo feminino, correspondendo a 42,9% e 57,1% da casuística, respectivamente.

Gráfico 1 – Distribuição de sexo

6.1.2 Idade (Gráfico 2)

A idade dos doentes variou entre 27 anos e 88 anos, com uma mediana de 59,5 anos. Para fins de análise estatística, estratificou-se a amostra em 2 grupos: pacientes com idade superior a 60 anos e pacientes com idade inferior a 60 anos.

Gráfico 2 – Distribuição de idade

6.1.3 Etnia (Gráfico 3)

24 pacientes eram brancos e 4 negros, mostrando uma predileção por pacientes brancos na nossa amostra.

Gráfico 3 – Distribuição de etnia

6.1.4 Tabagismo, etilismo, dentição precária e prótese (Gráfico 4)

Na nossa amostra, 15 pacientes eram tabagistas, apenas 7 pacientes faziam o uso contínuo de bebida alcoólica. Metade dos pacientes apresentavam uma dentição precária e apenas 7 pacientes faziam uso de prótese.

Gráfico 4 - Distribuição de hábitos e costumes

6.2 Variáveis clínicas

6.2.1 Localização do tumor primário (Gráfico 5)

Quanto à localização do tumor primário, 21 situavam-se na região nasossinusal, e 7 eram tumores de cavidade oral.

Gráfico 5 – Localização do tumor primário

6.2.2 Sintomatologia (Gráficos 6 e 7)

A duração dos sintomas foi determinada pelo intervalo de tempo entre a primeira consulta ambulatorial e início dos sintomas. O tempo médio de sintoma até a procura por tratamento especializado foi de 8,75 meses com variação entre 1 e 36 meses. O sintoma mais frequente foi a presença de massa tumoral (28,57%), seguido da associação de mais de um sintoma (25%).

Gráfico 6 - Duração dos Sintomas

Quanto ao sintoma mais frequente encontrado, foi a presença de tumor, seguido de obstrução nasal.

Gráfico 7 – Distribuição dos sintomas

6.3 Distribuição estadiamento TNM (Gráfico 8)

A maioria dos tumores foram classificados como T4 (75%), enquanto que a maior parte da casuística foi de pacientes N0. A maioria dos pacientes apresenta-se no estágio IV.

Gráfico 8 – Estadiamento clínico conforme a AJCC-2002. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA

6.4 Variáveis histopatológicas

6.4.1 Grau de diferenciação histológica do tumor (Gráfico 9)

Foi analisado o grau de diferenciação celular, na nossa amostra, foram encontrados 7 casos de tumores indiferenciados (25%).

Gráfico 9 – Distribuição do grau de diferenciação celular

6.4.2 Índice mitótico (Gráfico 10)

Quanto ao índice mitótico dos tumores estudados, encontraram-se 17 casos com índice mitótico maior que 10 mitoses/mm², correspondendo, respectivamente, a 60,7% dos casos estudados.

Gráfico 10 – Distribuição do índice mitótico

6.4.3 Presença da melanina (Gráfico 11)

Apenas 8 pacientes (28,6%) da casuística eram tumores amelanocíticos, isto é, não foi encontrado pigmentação nestes tumores.

Gráfico 11 – Avaliação histopatológica da presença de melanina). Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA

6.5 Análise da mutação de *KIT*

6.5.1 Incidência e distribuição da mutação

A análise da mutação de *KIT* foi possível em todos os 28 casos estudados, 7 pacientes apresentaram a mutação de *KIT* e 21 pacientes apresentavam o *KIT* na forma selvagem (Gráfico 12).

Gráfico 12 – Incidência da mutação de *KIT*. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA

Quanto à distribuição da mutação do gene *KIT*, houve predomínio pelos éxon 11 (42,8%) e éxon 9 (42,9%). A Tabela 4 descreve as mutações encontradas e o tipo da mutação apresentada.

A Figura 5 apresenta um cromatograma exeplicando um caso (caso 26) apresentando mutação no éxon 11 do gene *KIT* e a perda de heterozigose representado na Figura 6.

Tabela 4 – Distribuição da mutação de *KIT*. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.

PACIENTE	STATUS MUTACIONAL	TIPO DA MUTAÇÃO	OBS
5	Éxon 11	V551I	Heterozigoto
21	Éxon 11	V551I	Heterozigoto
22	Éxon 13	L657F	Homozigoto
25	Éxon 9	L455M	Heterozigoto
26	Éxon 11	L576P	Heterozigoto
27	Éxon 9	S480F	Heterozigoto
28	Éxon 9	G499S	Heterozigoto

Figura 5 - Cromatograma evidenciando mutação no éxon 11 do gene *KIT*/L576P de um caso representativo (caso 26)

Figura 6 - Eletroferograma evidenciando a perda de heterozigose do gene *KIT* (Marcador HK 8810) (análise pelo bioanalizador Agilent 2100)

6.5.2 Análise de variáveis clínicas e mutação de *KIT* (Tabela 5)

Aplicou-se o teste exato de *Fisher* para avaliarmos a correlação entre variáveis clínicas e presença da mutação de *KIT*, não houve relação estatisticamente significativa com fatores clínicos.

Tabela 5 – Variáveis clínicas e sua correlação com a mutação de *KIT*. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.

Variáveis	<i>KIT</i>		<i>p</i> *
	Selvagem N=21(75%)	Mutação N=7(25%)	
Idade			
>60	12(42,9%)	4(14,3%)	0,666
<60	9(32,1%)	3(10,7%)	
Sexo			
Feminino	12(42,9%)	9(32,1)	0,672
Masculino	4(14,3%)	3(10,7%)	
Raça			
Branco	18(64,3%)	6(21,4%)	0,747
Negro	3(10,7%)	1(3,6%)	
Tabagismo			
Sim	9(32,1%)	4(14,3%)	0,412
Não	12(42,9%)	3(10,7%)	
Etilismo			
Sim	5(17,9%)	2(7,1%)	0,581
Não	16(57,1%)	5(17,9%)	
Localização			
Nasossinusal	4(14,3%)	4(14,3%)	0,220
Cavidade Oral	17(60,7%)	3(10,7%)	

*Teste exato de Fisher

6.6 Sobrevida global e sobrevida livre de doença

A sobrevida foi estudada sob dois prismas: tempo livre de doença, e óbito relacionado à doença. Para estimação desses intervalos, foi usado o método de Kaplan-Meier.

A sobrevida relacionada ao óbito por câncer foi de 53,6% em 24 meses e de 37,5% em 60 meses. A curva de sobrevida relacionada ao óbito encontra-se no Gráfico 13.

Gráfico 13 – Sobrevida global. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA

A sobrevida livre de doença foi de 50,8% em 24 meses e de 43,5% em 5 anos. A curva de sobrevida livre de doença encontra-se no Gráfico 14.

Gráfico 14 – Sobrevida Livre de doença. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA

6.6.1 Relação da mortalidade e parâmetros clínicos (Tabela 6)

Foram comparados parâmetros clínicos e sua relação com o óbito em 12, 24 e 36 meses. Não houve significância estatística pelo teste de Log Rank (Mantel Cox). A Tabela 6 descreve os resultados encontrados.

Tabela 6 – Relação entre parâmetros clínicos e o óbito. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.

		SG (meses)			<i>p</i> *
		12 m	24 m	48 m	
Idade					
	>60	75%	50%	36,5%	0,648
	<60	66,7%	48,6%	48,6%	
Sexo					
	Masculino	75%	50%	40%	0.790
	Feminino	87,5%	62,5%	42,9%	
Raça					
	Branços	59,1%	40,9%	27,3%	0.509
	Negros	75%	25%	25%	
Tabagismo					
	Sim	76,9%	53,8%	46,2%	0,794
	Não	73,3%	46,7%	37,3%	
Etilismo					
	Sim	100%	100%	35,7%	0,134
	Não	66,7%	47,6%	37,5%	

*Teste exato de Fisher

6.6.2 Relação da mortalidade com TNM e adjuvância (Tabela 7)

Avaliou-se a probabilidade de óbito em relação ao TNM e ao tratamento adjuvante. A ausência de tratamento adjuvante influenciou adversamente este grupo, com uma probabilidade maior de óbito com significância estatística ($p=0,05$). O Gráfico 15 mostra a curva de sobrevida comparativa do grupo de tratamento adjuvante.

Tabela 7 – Relação entre TNM e adjuvância e com óbito. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.

		SG (meses)			p
		12	24	48	
T	3	66,7%	66,7%	44,4%	0,362
	4	76,2%	52,4%	42,3%	
N	0	77,3%	54,5%	44,4%	0,458
	1	75%	50%	25%	
	2	100%	0%	0%	
	3	100%	0%	0%	
Estádio	II	75%	75%	75%	0,899
	III	75%	50%	50%	
	IV	75%	50%	40%	
Adjuvância	Sim	88,2%	64,7%	52,8%	0,05**
	Não	45,5%	36,4%	27,3%	

*Teste exato de Fisher

**Significativo estatisticamente

Gráfico 15 – Curva de sobrevida global comparando adjuvância e óbito. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA

6.6.3 Relação da mortalidade e variáveis histopatológicas (Tabela 8)

Índice mitótico >10 mitoses/mm² esteve relacionado com significância estatística com a mortalidade ($p=0,05$). A presença de invasão vascular e disseminação angiolinfática também apresentaram significância estatística ($p=0,04$ e $p=0,02$, respectivamente). Os Gráficos 16 e 17 mostram as curvas de sobrevida dos dados significativos.

Tabela 8 – Relação entre variáveis histopatológicas e óbito. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.

	SG (meses)			<i>P</i> *
	12	24	48	
Indiferenciados				
Sim	57,1%	42,9%	28,6%	0,087
Não	81%	61,9%	54,4%	
Índice Mitótico				
>10	72,7%	51,5%	36,4%	0,05**
<10	88,2%	64,7%	51,5%	
Amelanocíticos				
Sim	62,5%	35,5%	18,8%	0,334
Não	80%	60%	55%	
Invasão Vascular				
Presente	66,7%	33,3%	33,3%	0,043**
Ausente	80%	60%	51,3%	
Invasão Óssea				
Presente	78,9%	52,6%	41,4%	0,775
Ausente	77,8%	55,6%	41,7%	
Disseminação Angiolinfática				
Presente	75%	25%	12,5%	0,020**
Ausente	75%	65%	54%	
Disseminação Perineural				
Ausente	83,3%	58,3%	49,2%	0,116
Presente	50%	25%	25%	

*Teste exato de Fisher

**Significativo estatisticamente

Gráfico 16 – Curva de sobrevida global relacionando invasão vascular e óbito. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.

Gráfico 17 – Curva de sobrevida global relacionando disseminação angiolinfática e óbito. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA

6.6.4 Relação da SLD com parâmetros clínicos (Tabela 9)

Foram analisadas variáveis clínicas e sua relação com recidiva, a presença de etilismo sugere um efeito protetor, provavelmente, isto se deve à pequena amostra.

Tabela 9 – Relação entre SLD e parâmetros clínicos. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.

		SLD(meses)			P*
		12	24	48	
Idade					
	>60	62,5%	43,8%	30%	0.380
	<60	50%	33,3%	16,7%	
Sexo					
	Masculino	41,7%	25%	25%	0.594
	Feminino	68,8%	43,8%	23,4%	
Raça					
	Branços	59,1%	40,9%	27,3%	0.509
	Negros	75%	25%	25%	
Tabagismo					
	Sim	61,5%	38,5%	23,1%	0.838
	Não	66,7%	33,3%	26,7%	
Etilismo					
	Sim	71,4%	57,1%	57,1%	0.038**
	Não	61,9%	28,6%	14,3%	

*Teste exato de Fisher

**Significativo estatisticamente

6.6.5 Relação da SLD com TNM e adjuvância (Tabela 10)

Não houve diferença estatística nos parâmetros estudados.

Tabela 10 – Relação entre SLD com estadiamento e adjuvância. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.

		SLD (meses)			*p
		12	24	48	
T	3	66,7%	66,7%	50%	0.704
	4	71,4%	38,1%	23,8%	
N	0	59,1%	40,9%	27,3%	0.509
	Positivo	75%	25%	25%	
Estádio	II	25%	25%	25%	0.523
	III	75%	50%	50%	
	IV	70%	40%	25%	
Adjuvância	Sim	88,2%	47,1%	29,4%	0.306
	Não	36,4%	27,3%	18,2%	

*Teste exato de Fisher

6.6.6 Relação da recidiva com variáveis histopatológicas (Tabela 11)

Na nossa amostra, índice mitótico >10 mitoses/mm², invasão vascular, disseminação angiolinfática e disseminação perineural estão relacionadas com significância estatística com a recidiva ($p=0,05$, $p=0,043$, $p=0,008$ e $p=0,034$, respectivamente).

Tabela 11 – Relação entre SLD com variáveis histopatológicas. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.

		SLD (meses)			<i>p</i> *
		12	24	48	
T	3	66,7%	66,7%	50%	0.704
	4	71,4%	38,1%	23,8%	
N	0	59,1%	40,9%	27,3%	0.509
	Positivo	75%	25%	25%	
Estádio	II	25%	25%	25%	0.523
	III	75%	50%	50%	
	IV	70%	40%	25%	
Adjuvância	Sim	88,2%	47,1%	29,4%	0.306
	Não	36,4%	27,3%	18,2%	

*Teste exato de Fisher

**Significativo estatisticamente

Gráfico 18 – Curva de sobrevida livre de doença relacionando índice mitótico. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA

Gráfico 19 – Curva de sobrevida livre de doença relacionando invasão vascular. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.

Gráfico 20 – Curva de sobrevida livre de doença relacionando disseminação angiolinfática. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.

Gráfico 21 – Curva de sobrevida livre de doença relacionando a disseminação perineural. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA

6.6.7 Sobrevida global e sobrevida livre de doença e presença da mutação de *KIT* (Tabelas 12 e 13)

Na nossa casuística, não houve diferença estáticas entre os grupos, a presença da mutação não exerceu papel protetor ou promotor para recidiva ou óbito.

Tabela 12 – Relação entre SLD e a presença da mutação de *KIT*. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.

SLD (meses)				p*
	12	24	48	
KIT				
Mutação	71,4%	28,6%	28,6%	0.771
Selvagem	66,7%	42,9%	28,6%	

*Teste exato de Fisher

Tabela 13 – Relação entre o óbito e a presença da mutação de *KIT*. Pacientes tratados no Instituto Nacional de Câncer – INCA.

Estados do Instituto Nacional de Câncer - INCA.				
	SLD (meses)			p*
	12	24	48	
KIT				
Mutação	71,4%	57,1%	38,1%	0.935
Selvagem	71,4%	52,4%	47,6%	

*Teste exato de Fisher

7 Discussão

7 DISCUSSÃO

Devido à raridade desta patologia, conseguimos selecionar 28 casos. Kanda (2003) apresentou estudo com o total de 54 casos oriundos de 3 instituições diferentes, comprovando a raridade da patologia na casuística nacional. Em virtude de sua raridade, grande parte da literatura que existe a respeito do assunto aborda casos isolados e faz análise retrospectiva de séries com amostras relativamente pequenas (Rinaldo *et al.*, 2001; Turri-Zanoni *et al.*, 2013).

Algumas particularidades do comportamento biológico desses tumores têm extrema importância: a localização anatômica da lesão incluindo seu estadiamento. Assim, há tumores com estadiamento inicial, que podem ter um comportamento mais agressivo devido a sua localização.

Os resultados históricos do tratamento do MMCP são desapontadores. Isso levou, prontamente, os investigadores a testarem novas estratégias de tratamento, como a adição da quimioterapia ou terapia-alvo.

A definição de parâmetros prognósticos para MMCP é uma tarefa muito mais complexa porque a profundidade de invasão, o fator prognóstico mais importante em melanomas cutâneos, não pode ser utilizada devido à falta de pontos de referência histológicos análogos à derme papilar e reticular

Recentes estudos têm avaliado o papel oncogênico das mutações de *KIT* no MMCP, bem como, o valor da terapia com inibidores de tirosina quinase nesses tumores, os resultados parecem animadores mostrando significativo benefício de sobrevida em favor da quimioterapia e terapia-alvo (Guo *et al.*, 2011).

7.1 Variáveis epidemiológicas

7.1.1 Idade

O MMCP acomete, com maior frequência, pacientes entre a quinta e sétima década de vida, com mais de 60% dos pacientes pertencentes a este grupo etário (Chang *et al.*, 1998). Neste estudo, 16 (57%) pacientes apresentavam idade superior a 60. Quando comparamos estes dois grupos etários, isto é, pacientes com mais de 60 anos e pacientes com menos de 60 anos, com a recidiva da doença e com a mortalidade, não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,38$ e $p = 0,648$).

Em concordância com nossos resultados, Patel *et al.* (2002) também avaliaram o impacto da idade como fator prognóstico no MMCP, não encontrando diferenças nos grupos estudados. Alguns autores relataram que mais de 60% dos pacientes apresentam idade superior a 60 anos no momento do diagnóstico e apenas 3% tinham 30 anos ou menos, demonstrando uma predileção por pacientes com idade mais avançada (McLaughlin *et al.*, 2005).

7.1.2 Sexo

O MMCP parece ter uma predileção pelo sexo masculino. Contudo, os relatos da literatura baseiam-se em séries com poucos casos. No presente estudo, 16 (57,1%) pacientes eram do sexo masculino. Não houve relação do sexo com o desfecho clínico do paciente.

7.1.3 Etnia

Segundo dados da literatura, a doença tem sido relatada com mais frequência em asiáticos e negros; isso é atribuído parcialmente pelos

achados comuns de pigmentação melânica na mucosa oral dessas etnias (Aguas *et al.*, 2009). Nos Estados Unidos, a proporção de melanomas de mucosa é maior (8,8%) em afro-americano e hispânicos do que na população em geral (1,3%). Contudo, dados de trabalho nacional apresentado por Hsieh (2013) sugerem que a doença parece acometer com maior frequência indivíduos brancos. Nossos resultados são similares aos relatados por Hsieh; 89% são dos indivíduos são brancos em nossa série.

7.2 Variáveis clínicas

7.2.1 Localização do tumor primário

Segundo alguns autores (Chang *et al.*, 1998; Gal *et al.*, 2011), não existem diferenças na incidência da localização dos MMCP, isto é, a incidência de tumores de seios da face e nariz é equivalente aos tumores de cavidade oral. Entretanto, encontramos uma maior incidência de tumores de seio da face (75%) dos pacientes. Isso se deve a fatores relacionados ao tratamento, pois, como no INCa são tratados tumores mais complexos, acreditamos tratar-se de amostra selecionada.

Séries retrospectivas foram incapazes de demonstrar a relação entre o sítio do tumor primário com sobrevida e controle local (Nandapalan *et al.*, 1998; Owens *et al.*, 2003). Esta observação foi confirmada no presente estudo. Porém, existem alguns relatos de pior prognóstico relacionado a tumores originados em seios da face, provavelmente, pela presença de doença localmente avançada no diagnóstico (Haerle *et al.*, 2012).

7.2.2 Sintomatologia

Os dados disponíveis na literatura sobre o valor prognóstico da duração e início dos sintomas são escassos. Pode-se afirmar que o MMCP

tem uma apresentação inicial indolente, e o surgimento de sintomas locais está diretamente relacionado à presença de estágio avançado. Pelo menos, 25% apresentaram como sintoma obstrução e/ou tumor, reflexo de uma maior incidência de tumores T4 na amostra.

7.3 Distribuição do estadiamento TNM

O estadiamento MMCP continua sendo um desafio. Em 1970, Ballantyne descreveu um sistema de estadiamento simplificado, baseado em 3 categorias: I) lesões localizadas, II) metástase para linfonodos cervicais e III) metástases a distância. As vantagens deste sistema são a sua simplicidade e que ele pode ser usado para todos MMCP. Todavia, esse é um sistema que não leva em consideração a profundidade da invasão nem a extensão local do tumor, fornecendo informações prognósticas limitadas. Com o intuito de superar essas limitações, Prasad *et al.* (2004) propuseram um sistema de microestadiamento com base na invasão tecidual dentro da mucosa: nível 1 (doença *in situ*), nível 2 (superficialmente invasivo: melanoma invadindo até a lâmina própria), e nível 3 (melanomas profundamente invasivos: músculo, osso ou cartilagem). Eles relataram diferenças estatisticamente significativas nas taxas de sobrevivência para os níveis 1, 2 e 3 (SLD de 75%, 52% e 23%, respectivamente). A classificação de Prasad é histológica: o nível só pode ser determinado após a cirurgia, exceto quando a invasão tumoral é visível por diagnóstico de imagem.

O sistema de classificação proposto pela AJCC enfatiza critérios relacionados ao tamanho do tumor primário como um preditor prognóstico. Com base nesta classificação, Loree *et al.* relataram uma taxa de SG em 5 anos de 32% para pacientes classificados T1 e T2 e 0% para tumores classificados T3 e T4 ($p = 0,05$). O sistema de estadiamento TNM proposto em 2009 pela AJCC é cada vez mais utilizado, e parece ser o principal instrumento de classificação para MMCP, principalmente nos casos de origem nasossinusal, pois fornece uma distribuição uniforme dos estágios

tumorais. Michel *et al.* (2014) avaliaram o valor prognóstico dos métodos de estadiamento, e identificaram que o único método que conseguiu relacionar SG ($p = 0,012$) e SLD ($p = 0,041$) foi o sistema TNM.

No presente estudo, utilizamos a classificação TNM. A maioria dos tumores do foi classificada como T4 (75%), enquanto que a maior parte da casuística tinha pescoço N0; a maioria dos pacientes considerada estágio IV. Não encontramos diferenças na SG e SLD ($p=0,899$ e $p=0,523$); respectivamente.

7.4 Variáveis histopatológicas

Os MMCPs são, geralmente, diagnosticados em estágios avançados, apresentando-se macroscopicamente como lesões nodulares da mucosa; são raros os casos detectados como lesões *in situ* (Bridger *et al.*, 2005; Cheng *et al.* 2007).

A detecção da lesão local é mais difícil nos tumores nasossinusais, possivelmente, devido ao fato de se situarem em cavidades ocultas e menos acessíveis ao exame clínico sem instrumentos. Já nas lesões de cavidade oral, pode ocorrer disseminação ao longo do revestimento de dutos salivares, mesmo nos tumores *in situ* semelhante à disseminação do MC ao longo dos anexos cutâneos. O significado prognóstico desta característica é incerto, mas pode ajudar na caracterização do tumor como primário.

Diagnóstico histopatológico é simples quando as células do tumor são ricas em melanina. A apresentação celular é variada: células poliédricas, redondas, fusiformes, epitelióide, pleomórfica ou uma combinação de mais de um tipo. Normalmente, a atividade mitótica é elevada, e dados da literatura tentam relacionar atividade mitótica, bem como, o arranjo celular (psedocapilar e sarcomatoide) com agressividade. Invasão perineural, angiolinfática e invasão vascular são fatores prognósticos consagrados em outras patologias, como exemplo o carcinoma epidermoide, que tem sido estudado no MMCP. Lesões amelanóticas (entre 15-50% dos casos em

algumas séries) podem apresentar um desafio para o patologista desavisado e simular outros tumores malignos, nestes casos, a imuno-histoquímica deve ser usada, incluindo marcadores: S-100 e HMB-45, além da citoqueratina (Ballantyne *et al.*, 1970; Cardesa *et al.*, 2006; Lourenco *et al.*, 2014).

7.4.1 Índice mitótico

No presente estudo, encontramos a presença de índice mitótico maior que 10 mitoses por campo em 60,7% dos pacientes. Este dado deve ser valorizado, pois sugere uma agressividade maior nesses tumores. É interessante salientar que, após análise da SLD e SG, o índice mitótico mostrou ser um fator prognóstico independente. A sobrevida global nos pacientes com índice mitótico maior que 10 por campo foi 36,4% em 48 meses versus 51,5% no outro grupo ($p=0,05$). Thompson *et al.* (2003) estudaram 115 pacientes com MMCP e encontraram resultados semelhantes, um pior prognóstico no grupo com alto índice mitótico ($p=0,026$). Em recente trabalho publicado por Moreno *et al.* (2010), 95% pacientes índice elevado foram a óbito pelo MMCP, enquanto que pacientes com índice mitótico menor que 10 tiveram um melhor resposta à terapia sistêmica.

7.4.2 Presença de melanina

Em nossa casuística, encontramos 8 casos (28,6%) que eram de tumores amelanocíticos. Nestes casos, todos foram confirmados por meio de imuno-histoquímica. Dados da literatura sugerem uma maior agressividade nos tumores amelanocíticos (Moreno *et al.*, 2002), sendo o único fator histopatológico relacionado com sobrevida, nenhum paciente vivo após 48 meses contra 47,6% de sobrevida nos tumores pigmentados. Nossos resultados não confirmaram este dado, porém, tivemos uma SG de

55% em 48 meses nos tumores pigmentados contra 18,8% nos amelanocíticos. A explicação aceita para um pior prognóstico nos tumores amelanocíticos é de estarem associados a atraso no diagnóstico.

7.4.3 Grau de diferenciação celular

Oito (25%) dos pacientes apresentaram tumores indiferenciados, tal achado mostrou uma tendência a maior agressividade nos pacientes que apresentaram esta característica (SG 28,6% *versus* 54,4% em 48 meses) $p=0,087$). Entretanto, quando comparamos estes grupos, não houve diferença estatística, Prasad *et al.* (2004) em seu trabalho verificou 100% de letalidade nos tumores indiferenciados.

7.4.4 Invasão vascular, disseminação angiolinfática e disseminação perineural

Estudamos outras características anatomopatológicas como: invasão perineural microscópica, invasão vascular e disseminação angiolinfática na tentativa de buscarmos fatores prognósticos que interferissem na SG e SLD.

É interessante salientar que os fatores relatados acima, apesar de serem utilizados amplamente no MC e em inúmeras neoplasias da área de cabeça e pescoço, têm tido pouco enfoque nos MMCP. Isso deve-se a dois fatores: raridade da doença e, na maioria dos relatos, há um grande número de pacientes submetidos à biopsia com ressecções a “*piecemeal*”; dificultando a avaliação do patologista (Conley *et al.*, 1974; Smithers *et al.*, 1992).

Todos os casos estudados no presente trabalho foram submetidos a tratamento cirúrgico radical, e, desta forma, conseguimos analisar estes dados. Oito (28,57%) pacientes apresentavam disseminação angiolinfática; destes, apenas 1 estava vivo após 48 meses ($p=0,020$) e 75% pacientes apresentaram recidivas com menos de 24 meses pós-tratamento ($p=0,008$).

Presença de invasão vascular foi constatada em 2 pacientes; este achado influenciou negativamente da SG e SLD ($p=0,0043$ e $p=0,0043$, respectivamente). Apesar de somente 4 (14,28%) casos apresentarem invasão perineural, isso influenciou negativamente na SLD ($p=0,034$), não havendo interferência na SG. Na série de Kanda (2003), apenas 5 de 21 casos apresentaram invasão perineural e não diferenças entre os grupos.

Como já comentado, os estudos têm dado uma atenção maior ao MC, todavia, o principal parâmetro, que é a espessura, não pode ser utilizado no MMCP. A busca constante de marcadores prognóstico em uma patologia rara e agressiva pode esclarecer melhor a fisiopatologia desta doença, bem como estabelecer uma orientação terapêutica.

7.5 Tratamento

7.5.1 Cirurgia

Ressecção cirúrgica com margens livres é a base do tratamento do MMCP e pode proporcionar os melhores resultados, embora a estratégia terapêutica deva ser individualizada de acordo com o estágio do tumor, local, e tratamento prévio do paciente. Especialmente para tumores avançados, há necessidade de se avaliarem as opções de terapêutica levando em consideração a eficácia e morbidade do tratamento. Estratégias para melhorar o resultado do tratamento devem se concentrar em controle locorregional da doença. Biopsia de congelação intraoperatória do MMCP parece não oferecer dados fidedignos, uma vez que pode existir disseminação submucosa; além disso, há necessidade de preservação de estrutura nobres adjacentes à área da ressecção. Isso resulta em taxas de controle local menos de 50% (Wenig *et al.*, 2005).

Todos os pacientes do estudo foram submetidos a tratamento cirúrgico, incluindo diversas técnicas. O procedimento cirúrgico mais realizado foi a maxilarectomia (com extensões diversas, dependendo do local do tumor). É

óbvio que a realização da maxilarectomia está associada à prevalência de tumores nasossinussais na amostra (75%).

Na amostra, não foi possível comparar o tratamento cirúrgico com outras modalidades, visto que todos os pacientes foram operados. Obtivemos margens livres em 82,15% dos pacientes; todavia, o achado de margens livres não teve impacto na sobrevida. Pacientes com margens cirúrgicas positivas têm 21 vezes maior risco de morrer devido à falha terapêutica (Penel *et al.*, 2005), porém não encontramos esse relação na amostra.

Na doença local recorrente e sem disseminação metastática, deve ser considerado o resgate cirúrgico, mas a amplitude da ressecção deve ser ponderada. A chance de um resgate cirúrgico bem-sucedido é menor que 25%, além das chances de metástases distantes estarem aumentadas (Moreno *et al.*, 2010).

Para o MMCP da cavidade oral, a ressecção adequada pode envolver a necessidade de mandibulectomias marginal ou segmentar. Embora o tratamento eletivo do pescoço, geralmente, não seja realizado nos tumores nasossinussais, a abordagem cervical eletiva nos MMCP de cavidade oral pode ser cogitada.

7.5.2 Radioterapia

O melanoma maligno, incluindo o MMCP, é considerado, tradicionalmente, um tumor radiorresistente. Não obstante, a radioterapia é utilizada amplamente como parte do algoritmo de tratamento, principalmente na adjuvância. Existem trabalhos, principalmente de instituições do oriente, que relatam taxas de controle local similares para tratamento cirúrgico quanto comparado ao tratamento radioterápico exclusivo (Yanagi *et al.*, 2009).

No presente estudo, não submetemos nenhum paciente a tratamento radioterápico exclusivo, pois consideramos essa neoplasia como

radiorresistente. Dezesete (60,71%) pacientes receberam radioterapia adjuvante. Encontramos resultados curiosos quando comparamos os pacientes em relação à radioterapia adjuvante: não houve benefício no controle local (SLD) na adição da radioterapia ($p=0,306$); por outro lado, houve melhora da SG (52,8% vs 27,3%; $p=0,05$).

Alguns autores relacionam tratamento radioterápico adjuvante com melhor controle locorregional, mas, na maioria dos trabalhos, os pacientes irradiados têm lesões em estádios III e IV, não se indicando radioterapia adjuvante em lesões nos estádios I e II (Patel *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2010). No presente estudo, todos os pacientes apresentavam tumores em estádios III e IV, provavelmente fazendo com que o uso da radioterapia não mostrasse benefício na SLD. Indicações precisas para a radiação adjuvante ainda precisam ser definidas e, na maioria das séries, ela é usada somente em doença avançada e recorrente.

7.6 Mutação de *KIT*

7.6.1 Incidência e localização

A maior motivação para a realização deste estudo foi a investigação de um marcador com potencial terapêutico para uma doença que, apesar de rara, apresenta uma letalidade elevada. Além disso, há poucos estudos envolvendo a pesquisa de *KIT* em MMCP, possivelmente em decorrência da raridade da doença.

A presença da mutação de *KIT* em melanomas malignos já tem sido demonstrada na literatura, em particular, os melanomas da mucosa (21% de mutações de *KIT*), melanomas acrais (11% de mutações de *KIT*) e melanomas cutâneos causados pela exposição solar crônica (17% de mutações de *KIT*) (Curtin *et al.*, 2006). Isto sugere que a presença das mutações de *KIT* pode ter relevância na fisiopatogenia e, portanto, um potencial alvo terapêutico nestes subtipos de melanoma. Em contraste, as

mutações *KIT* são raramente encontrados no maior subgrupo de melanomas malignos, MC não associados à exposição solar crônica: 1 caso em 100 estudados por Willmore-Payne *et al.* (2005) e 2 casos em 39 estudos por Fui *et al.* (2004). Além disso, os estudos de fase II com imatinib em pacientes com MC, sem avaliação da mutação de *KIT*, foram decepcionantes (Ugurel *et al.*, 2005; Wyman *et al.*, 2006; Becker *et al.*, 2007).

Foram avaliadas as mutações de *KIT* em grupo selecionado de pacientes com MMCP. A análise molecular da mutação de *KIT* foi possível em 28 pacientes e revelou mutações em 7 deles (25%). Isto é consistente com as descobertas de Antonescu *et al.* (2007), e Rivera *et al.* (2008), que detectaram mutações do gene *KIT* em 3 de 20 (15%) e 4 de 18 pacientes (22%) com melanomas mucosos da região anal e cavidade oral, respectivamente. Assim, as mutações de *KIT* ocorrem em até 20% dos melanomas mucosos, independentemente da localização do tumor primário. Foram detectadas 3 mutações no éxon 11, 3 mutações no éxon 9 e 1 mutação no éxon 13, essa distribuição com uma predileção para os éxons 11 e 13 está em concordância com a literatura (Tate *et al.*, Daniotti *et al.*, 2009). A Tabela 14 mostra a prevalência da mutação em vários trabalhos.

Tabela 14 - Sumário da mutações de *KIT*

Autor	Ano	Numero de Pacientes	Mutação de <i>KIT</i> (%)
Beadling <i>et al.</i>	2008	29	8,4%
Carvajal <i>et al.</i>	2011	5	40%
Schoenewolf <i>et al.</i>	2012	12	0%
Turri-Zanino <i>et al.</i>	2012	32	12,5%
Zebary <i>et al.</i>	2013	56	3,6%
Estudo atual	2015	28	25%
	Total	162	9,8%

O papel da localização da mutação de *KIT* em MMCP foi pouco estudado. Porém, em tumores GIST, a relação prognostica já tem evidências na literatura: o éxon 11, que codifica o domínio justamembrana, está envolvido em autoinibição do receptor, as mutações neste domínio

justamembrana impedem esta função inibitória, aumentando a dimerização do receptor independente da sua ativação. Por sua vez, essa localização é a mais sensível ou que responde melhor ao tratamento com inibidores de tirosina-kinase. Com esta informação, podemos sugerir que o MMCP também poderia exibir uma sensibilidade potencial aos inibidores de tirosina-quinase (Lasota *et al.*, 2008).

Em nossos resultados, não houve um tipo de mutação mais frequente: 2 casos V551I, 1 caso L657F, 1 caso L455M, 1 caso L576P, 1 caso S480F e 1 caso G499S. Embora os trabalhos disponíveis reúnam um número reduzido de pacientes, os dados sugerem uma maior incidência da mutação tipo L576P.

7.6.2 Associação de mutações de *KIT* com características clínico-patológicas

Tentamos avaliar características clínico-patológicas e relacioná-las à mutação de *KIT*. Os resultados foram desanimadores, pois nenhuma das características analisadas apresentou maior prevalência da mutação, apesar do número de mutações identificadas ser bastante significativo (8/28 pacientes, 25%).

Um dado que chamou a atenção foi a distribuição das mutações quanto aos sítios anatômicos. Nos tumores nasossinusais, a mutação foi encontrada em 4 casos (19% dos pacientes). Já no grupo de pacientes com tumores de boca, a mutação foi encontrada 3 pacientes (75% dos pacientes).

Em outras palavras, nossos resultados sugerem uma maior incidência de mutações em melanomas de cavidade oral. Este achado está em desacordo com os dados da literatura, em que as mutações são mais comuns nos tumores de seios da face (Zebary *et al.*, 2013).

7.6.3 Valor prognóstico da mutação de *KIT*

No presente estudo, não foi encontrado impacto prognóstico causado pela presença da mutação de *KIT* no presente estudo. Avaliamos a relação da mutação com a SG e SLD. A SLD foi de 28,6% em 48 meses, em ambos os grupos, isto é, nos pacientes portadores da mutação e nos que apresentavam forma selvagem ($p=0,771$). Quanto à SG, tivemos um melhor resultado nos pacientes portadores da selvagem 47,6% de SG em 5 anos, porém sem significância estatística ($p=0,935$).

As mutações de *KIT* têm sido avaliadas em vários outros tumores e, em algumas neoplasias, são um importante fator prognóstico. Em tumor estromal gastrointestinal (GIST), a mutação de *KIT* é um fator de risco independente para a SG e SLD; esta relação é tão importante que o éxon 11 está relacionado a uma melhor resposta terapêutica. Pode-se afirmar que tumores GIST são um exemplo da importância do *KIT* na seleção para tratamento e prognóstico. Em pacientes portadores de leucemia, as mutações de *KIT* podem sugerir um maior risco de recaída (Singer *et al.*, 2002)

No entanto, a importância prognóstica das mutações de *KIT* em melanoma não foi avaliada em uma série de tamanho adequado. Nosso estudo confirmou a presença de 25% de mutação em MMCP, sugerindo um caminho para estudar a fisiopatologia deste tumor, com o foco na cascata da *MAPKs* e inclusão de pacientes em ensaios clínicos com inibidores de *KIT*.

7.6.4 Perspectivas futuras

A experiência clínica com a utilização de inibidores e tirosino quinase no MMCP revelou vários princípios que, provavelmente, serão importantes na condução de avanços para este subtipo de melanoma maligno. As respostas terapêuticas, nos ensaios clínicos de fase II, são muito variáveis, mas, curiosamente, indicam que pacientes com mutações *KIT* específicas, particularmente nos éxons 11 e 13, são mais propensos a apresentar uma

resposta terapêutica. Isto sugere que nem todas as mutações *KIT* devam ser consideradas igualmente alvos terapêuticos, pois algumas podem não ser passíveis de terapia-alvo.

A avaliação contínua das mutações de *KIT* é fundamental, na tentativa de se identificarem biomarcadores e melhor selecionar pacientes, individualizando o tratamento. Vale salientar que algumas mutações específicas em GIST podem apresentar resposta terapêutica ao tratamento com imatinib em 80% casos. Entretanto, os resultados iniciais nos pacientes tratados com imatinib ainda são restritos à doença disseminada ou irresssecável. A literatura já mostra relatos de resposta completa em melanomas mucosos de outras regiões como vagina e ânus (Scott *et al.*, 2010; Carvajal *et al.*, 2011; Bello *et al.*, 2014). Se o nosso estudo não encontrou diferenças prognósticas nos grupos, ensejou a perspectiva de novas abordagens terapêuticas para os doentes com MMCP.

8 Conclusão

8 CONCLUSÃO

1. Identificamos a presença de mutações de *KIT* em 7 (25%) pacientes da amostra estudada.
2. A presença da mutação de *KIT* não apresentou relação com a recidiva ou sobrevida global.

9 ANEXOS

Anexo A – Aprovações das Comissões de Ética

DECLARAÇÃO

Registro CEP nº 052/08 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)
Título do Estudo: Análise de mutações do gene *KIT* em pacientes com melanoma de mucosa de cabeça e pescoço e correlação clínica

Declaro que o Comitê de Ética em Pesquisa do INCA concorda com as normas de Boas Práticas Clínicas (Good Clinical Practices – GCP/ICH) e cumpre os termos da Resolução 196 de outubro de 1996 e da Resolução 251 de agosto de 1997.

Rio de Janeiro, 27 de agosto de 2008.

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

Memo 178/08-CEP-INCA

A(o): Dr(a) Ullyanov Bezerra Toscano de Mendonça
Pesquisador(a) Principal

Registro CEP nº 052/08 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este protocolo)
Título do estudo: Análise de mutações do gene *KIT* em pacientes com melanoma de mucosa de cabeça e pescoço e correlação clínica

Prezado Pesquisador,

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer analisou e aprovou o estudo intitulado: **Análise de mutações do gene *KIT* em pacientes com melanoma de mucosa de cabeça e pescoço e correlação clínica.**

Atenciosamente,

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

DECLARAÇÃO DE INFRA-ESTRUTURA

Registro CEP nº 052/08 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)

Título do Estudo: Análise de mutações do gene *KIT* em pacientes com melanoma de mucosa de cabeça e pescoço e correlação clínica

De acordo com o Decreto nº 109, de 02 de maio de 1991, publicado no D.O.U. de 03 de maio de 1991, no seu artigo 14, § IV, ao Instituto Nacional de Câncer, INCA, compete coordenar, programar e realizar pesquisas clínicas, epidemiológicas e experimentais em cancerologia.

Para tanto o INCA possui uma ampla infra-estrutura com Laboratório de Análises Clínicas; Serviço de Imagens de Radiologia, Tomografia Computadorizada, Ressonância Magnética; tratamento multidisciplinar com os Serviços de Cirurgia, Radioterapia e Quimioterapia; Centro de Transplante de Medula Óssea; Serviço Terapêutico Oncológico (STO, para pacientes fora de possibilidades terapêuticas); Corpo clínico, cirúrgico e de enfermagem com ampla experiência em cancerologia; estrutura hospitalar adequada para internações com serviço de urgência e emergência e serviço de UTL.

O INCA é o principal Centro do Ministério da Saúde em cancerologia do Brasil.

Rio de Janeiro, 27 de agosto de 2008.

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

CIÊNCIA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **30.06.11** tomou ciência do Projeto nº **272/11** intitulado "**Análise de mutações do gene CKIT em pacientes com melanoma de mucosa de cabeça e pescoço e correlação clínica retrospectiva**", vinculado à pós-graduação do Departamento de Cirurgia, que não envolverá atividade prática e/ou experimental no âmbito da Faculdade de Medicina ou Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e que conta com prévia aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer, onde o projeto será executado.

Pesquisador(a) Responsável: Cláudio Roberto Cernea

Pesquisador(a) Executante : Ullyanov Bezerra Toscano de Mendonça

CEP-FMUSP, 30 de junho de 2011.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo B – Aprovação no Exame de Qualificação

MEDICINA

FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CLÍNICA CIRÚRGICA

Comissão de Pós-Graduação

O(A) aluno (a) **ULLYANOV BEZERRA TOSCANO DE MENDONÇA** - matrícula **7808751** - curso de **Doutorado** do Programa de Pós-Graduação em CLÍNICA CIRÚRGICA, submeteu-se ao exame de qualificação, perante a Comissão Examinadora, atendendo ao disposto no Regimento da Pós-Graduação da Universidade de São Paulo.

A Comissão Examinadora, indicada pela Comissão Coordenadora do Programa, é de parecer que:

O candidato mostrou bom domínio do assunto, boa dicção; o trabalho está em fase avançada. O candidato respondeu adequadamente aos questionamentos da banca examinadora e por isso foi considerado aprovado.

MEDICINA

Membros Participantes da Comissão Examinadora
Assinale com um "X" - Aprovado (APR) ou Reprovado (REP) e assine

São Paulo, 21 de Outubro de 2013

B.O. Santos
☒ APR () REP - André Bandiera de Oliveira Santos – Titular

[Assinatura]
☒ APR () REP - Leandro Luongo de Matos – Titular

Vergilios
☒ APR () REP - Vergillius José Furtado de Araujo Filho – Titular

() APR () REP - Fernando Walder – Suplente

() APR () REP - Marcelo Benedito Menezes - Suplente

DE HOMOLOGAÇÃO PELA CCP

COORDENADOR [Assinatura]

ASSINATURA [Assinatura] Prof.^a Dr.^a Edna Frasson de Souza Montero
Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
Clínica Cirúrgica

10 Referências

10 REFERÊNCIAS

Abeloff MD, Armitage JO. In: Abeloff MD, Armitage J, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna GW, editors. *Abeloff's clinical oncology*. Churchill Livingstone; Philadelphia: 2008.

Aguas SC, Quarracino MC, Lence AN, Lanfranchi-Tizeira HE. Primary melanoma of the oral cavity: ten cases and review of 177 cases from literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009 Jun 1;14(6):E265-71.

Andersen LJ, Berthelsen A, Hansen HS. Malignant melanoma of the upper respiratory tract and the oral cavity. *J Otolaryngol*. 1992 Jun;21(3):180-5.

Antonescu CR, Busam KJ, Francone TD, et al. L576P KIT mutation in anal melanomas correlates with KIT protein expression and is sensitive to specific kinase inhibition. *Int J Cancer*. 2007;121:257-64.

Araujo EG, Bianchi C, Faro R, Sellke FW. Oscillation in the activities of MEK/ERK1/2 during cardiopulmonary bypass in pigs. *Surgery*. 2001;130(2):182-91.

Ariyoshi Y, Shimahara M, Omura K, Yamamoto E, Mizuki H, Chiba H, Imai Y, Fujita S, Shinohara M, Seto K; Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons, 2002. Epidemiological study of malignant tumors in the oral and maxillofacial region: survey of member institutions of the Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons, 2002. *Int J Clin Oncol*. 2008

Ashida A, Takata M, Murata H, Kido K, Saida T. Pathological activation of KIT in metastatic tumors of acral and mucosal melanomas. *Int J Cancer*. 2009 Feb 15;124(4):862-8

Balmano K, Cook SJ. Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ*. 2009 Mar;16(3):368-77.

Ballantyne AJ. Malignant melanoma of the skin of the head and neck. An analysis of 405 cases. *Am J Surg*. 1970;120:425-31.

Bartell HL, Bedikian AY, Papadopoulos NE, Dett TK, Ballo MT, Myers JN, Hwu P, Kim KB. Biochemotherapy in patients with advanced head and neck mucosal melanoma. *Head Neck*. 2008 Dec;30(12):1592-8.

Becker JC, Brocker EB, Schadendorf D, Ugurel S. Imatinib in melanoma: a selective treatment option based on KIT mutation status? *J Clin Oncol*. 2007;25:e9.

Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, Le C, Warrick A, Patterson J, Town A, Harlow A, Cruz F 3rd, Azar S, Rubin BP, Muller S, West R, Heinrich MC, Corless CL. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res*. 2008 Nov 1;14(21):6821-8.

Bello DM, DeMatteo RP, Ariyan CE. The GIST of targeted therapy for malignant melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2014 June; 21(6): 2059–67.

Bong JL, Herd RM, Hunter JA. Incisional biopsy and melanoma prognosis. *J Am Acad Dermatol*. 2002 May;46(5):690-4.

Braggio E, Braggio Dde A, Small IA, Lopes LF, Valadão M, Gouveia ME, Moreira Ados S, Linhares E, Romano S, Bacchi CE, Renault IZ, Guimarães DP, Ferreira CG. Prognostic relevance of KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Anticancer Res*. 2010 Jun;30(6):2407-14.

Brandwein MS, Rothstein A, Lawson W, Bodian C, Urken ML. Sinonasal melanoma. A clinicopathologic study of 25 cases and literature meta-analysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. Mar 1997;123(3):290-6.

Bridger AG, Smee D, Baldwin MA, Kwok B, Bridger GP. Experience with mucosal melanoma of the nose and paranasal sinuses. *ANZ J Surg*. 2005 Apr;75(4):192-7.

Cardesa A, Alos L, Franchi A. Nasal cavity and paranasal sinuses. In: Cardesa A, Slootweg PJ, editors. *Pathology of the head and neck*. Heidelberg: Springer; 2006. p 39-70.

Carlson JA, Ross JS, Slominski AJ. New techniques in dermatopathology that help to diagnose and prognosticate melanoma. *Clin Dermatol*. 2009 Jan-Feb;27(1):75-102.

Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, Chapman PB, Roman RA, Teitcher J, Panageas KS, Busam KJ, Chmielowski B, Lutzky J, Pavlick AC, Fusco A, Cane L, Takebe N, Vemula S, Bouvier N, Bastian BC, Schwartz GK. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA*. 2011 Jun 8;305(22):2327-34.

Chan RC, Chan JY, Wei WI. Mucosal melanoma of the head and neck: 32-year experience in a tertiary referral hospital. *Laryngoscope*. 2012 Dec;122(12):2749-53.

Chang AE, Karnell LH, Menck HR. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer*. 1998 Oct 15;83(8):1664-78.

Cheng YF, Lai CC, Ho CY, Shu CH, Lin CZ. Toward a better understanding of sinonasal mucosal melanoma: clinical review of 23 cases. *J Chin Med Assoc.* 2007;70:24-29.

Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Development.* 2008;20:2149-82.

Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest.* 2005 Apr;115(4):813-24.

Cobb MH. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol.* 1999;71(3-4):479-500.

Conley J, Pack GT. Melanoma of the mucous membranes of the head and neck. *Arch Otolaryngol.* 1974 May;99(5):315-9.

Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol.* 2004 Sep 15;22(18):3813-25. Review.

Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian B. Somatic activation of *KIT* in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol.* 2006;24(26):4340-6.

Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.* 2005 Nov 17;353(20):2135-47.

Daniotti M, Ferrari A, Frigerio S, Casieri P, Miselli F, Zucca E, Collini P, Della Torre G, Manoukian S, Peissel B, Bono A, Santinami M, Parmiani G, Rivoltini L, Pilotti S, Rodolfo M. Cutaneous melanoma in childhood and adolescence shows frequent loss of *INK4A* and gain of *KIT*. *J Invest Dermatol.* 2009;129:1759-68.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature.* 2002;417(6892):949-54.

Demierre MF, Sabel MS, Margolin KA, Daud AI, Sondak VK. State of the science 60th anniversary review: 60 Years of advances in cutaneous melanoma epidemiology, diagnosis, and treatment, as reported in the Journal Cancer. *Cancer.* 2008 Oct 1;113(7 Suppl):1728-43.

Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.* 2007 May 14;26(22):3279-90.

Dong J, Phelps RG, Qiao R, Yao S, Benard O, Ronai Z, Aaronson SA. *BRAF* oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma. *Cancer Res.* 2003;63:3883-5.

Englaro W, Bertolotto C, Buscà R, Brunet A, Pagès G, Ortonne JP, Ballotti R. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase pathway triggers B16 melanoma cell differentiation. *J Biol Chem.* 1998 Apr 17;273(16):9966-70.

Femiano F, Lanza A, Buonaiuto C, Gombos F, Di Spirito F, Cirillo N. Oral malignant melanoma: a review of the literature. *J Oral Pathol Med.* 2008 Aug;37(7):383-8.

Ferreira LM, Gomes EF, Barros da Silva MS, Araújo RP, Rios ASN. Metástase tonsilar de melanoma maligno. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2006;72(6):851.

Figueiredo LC, Cordeiro LN, Arruda AP, Carvalho MDF, Ribeiro EM, Coutinho HDM. Cancer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma maligno cutâneo. *Rev Bras Cancerol.* 2003;49(3):179-83.

Funasaka Y, Boulton T, Cobb M, Yarden Y, Fan B, Lyman SD, Williams DE, Anderson DM, Zakut R, Mishima Y, Halaban R. *C-KIT*-Kinase induces a cascade of protein tyrosine phosphorylation in normal human melanocytes in response to mast cell growth factor and stimulates mitogen-activated protein kinase but is down-regulated in melanomas malignos. *Mol Biol Cell.* 1992;3:197-209.

Gal TJ, Silver N, Huang B. Demographics and treatment trends in sinonasal mucosal melanoma. *Laryngoscope.* 2011;121:2026-33.

Gilligan D, Slevin NJ. Radical radiotherapy for 28 cases of mucosal melanoma in the nasal cavity and sinuses. *Br J Radiol.* 1991 Dec;64(768):1147-50.

Goel VK, Lazar AJF, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. Examination of mutations in *BRAF*, *NRAS*, and *PTEN* in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2006;126:154-60.

González-García R, Naval-Gías L, Martos PL, Nam-Cha SH, Rodríguez-Campo FJ, Muñoz-Guerra MF, Sastre-Pérez J. Melanoma of the oral mucosa. Clinical cases and review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005;10:264-71.

Gowrishankar K, Shaw HM, Goding CR, Scolyer RA, Mann GJ, Kefford RF, Rizos H, Becker TM. Oncogenic B-RAF(V600E) signaling induces the T-Box3 transcriptional repressor to repress E-cadherin and enhance melanoma cell invasion. *J Invest Dermatol.* 2013;133(5):1269-77.

Gu GM, Epstein JB, Morton TH Jr. Intraoral melanoma: long-term follow-up and implication for dental clinicians. A case report and literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Oct;96(4):404-13.

Guimaraes RES, Becker HMG, Ribeiro CA, Crossara PFBT, Brum LRA, Melo MMO. Melanoma maligno da mucosa nasossinusal: revisão da literatura e relato de dois casos. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2003;69(1):131-5.

Guo J, Si L, Kong Y, Flaherty KT, Xu X, Zhu Y, Corless CL, Li L, Li H, Sheng X, Cui C, Chi Z, Li S, Han M, Mao L, Lin X, Du N, Zhang X, Li J, Wang B, Qin S. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J Clin Oncol.* 2011;29(21):2904-9.

Haerle SK, Soyka MB, Fischer DR, Murer K, Strobel K, Huber GF, Holzmann D. The value of 18F-FDG-PET/CT imaging for sinonasal malignant melanoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2012 Jan;269(1):127-33

Haluska F, Pemberton T, Ibrahim N, Kalinsky K. The RTK/RAS/*BRAF*/PI3K pathways in melanoma: biology, small molecule inhibitors, and potential applications. *Semin Oncol.* 2007;34(6):546-54.

Handolias D, Salemi R, Murray W, Tan A, Liu W, Viros A, Dobrovic A, Kelly J, McArthur GA. Mutations in KIT occur at low frequency in melanomas arising from anatomical sites associated with chronic and intermittent sun exposure. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010 Apr;23(2):210-5.

Handolias D, Hamilton AL, Salemi R, Tan A, Moodie K, Kerr L, Dobrovic A, McArthur GA. Clinical responses observed with imatinib or sorafenib in melanoma patients expressing mutations in KIT. *Br J Cancer.* 2010 Apr 13;102(8):1219-23.

Harvey RJ, Dalgorf DM. Chapter 10: Sinonasal malignancies. *Am J Rhinol Allergy.* 2013 May-Jun;27 Suppl 1:S35-8.

Hayward NK. Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene.* 2003 May 19;22(20):3053-62.

Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Muhammad Tunio G, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y. Gain-of-function mutations of *c-KIT* in human gastrointestinal stromal tumors. *Science.* 1998 Jan 23;279(5350):577-80.

Homsí J, Kashani-Sabet M, Jane L. Cutaneous melanoma: prognostic factors. *Cancer Control.* 2005;12(4):223-9.

Hsieh R. *Melanoma maligno primário da mucosa oral: estudo imunohistoquímico e molecular da via da MAPK* [Tese]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2012.

Jarell AD, Lawrence D, Tsao H. The RAS/mitogen activated protein (MAP) kinase pathway in melanoma biology and therapeutics. *Biologics*. 2007 Dec;1(4):407-14.

Jung JE, Falk TM, Bresch M, Matias JEF, Boer A. *BRAF* Mutations in Cutaneous melanoma in Brazilian Patients: no correlation with histological prognostic factors or overall survival. *J Bras Patol Med Lab*. 2010;46(6):487-93.

Kanda JL. Melanoma da mucosa de cabeça e pescoco/ Mucosal melanoma of head and neck: survival analysis and clinicopathological prognostic factors. São Paulo; s.n; 2003.

Kerr EH, Hameed O, Lewis JS Jr, Bartolucci AA, Wang D, Said-Al-Naief N. Head and neck mucosal malignant melanoma: clinicopathologic correlation with contemporary review of prognostic indicators. *Int J Surg Pathol*. 2012 Feb;20(1):37-46.

Lang J, Mackie RM. Prevalence of exon 15 *BRAF* mutations in primary melanoma of the superficial spreading, nodular, acral, and lentigo maligna subtypes. *J Invest Dermatol*. 2005;125:575-9.

Lasota J, Miettinen M. Clinical significance of oncogenic KIT and PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Histopathology*. 2008;53:245-66.

Laud K, Kannengiesser C, Avril MF, Chompret A, Stoppa-Lyonnet D, Desjardins L, Eychene A, Demenais F, Lenoir GM, Bressac-de Paillerets B; French Hereditary Melanoma Study Group. *BRAF* as a melanoma susceptibility candidate gene? *Cancer Res*. 2003 Jun 15;63(12):3061-5.

LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasain A (Eds.): *World Health Organization Classification of Tumours. pathology and genetics of skin tumours*. IARC Press: Lyon; 2006 pg 49-118.

Liu HG, Kong MX, Yao Q, Wang SY, Shibata R, Yee H, Martiniuk F, Wang BY. Expression of Sox10 and *c-KIT* in sinonasal mucosal melanomas arising in the Chinese population. *Head Neck Pathol*. 2012 Dec;6(4):401-8.

Liu W, Kelly JW, Trivett M, Murray WK, Dowling JP, Wolfe R, Mason G, Magee J, Angel C, Dobrovic A, McArthur. Distinct clinical and pathological features are associated with the *braf* t1799a(v600e) mutation in primary melanoma. *J Invest Dermatol*. 2007;127:900-8.

Loree TR, Mullins AP, Spellman J, North JH Jr, Hicks WL Jr. Head and neck mucosal melanoma: a 32-year review. *Ear Nose Throat J*. 1999;78:372-5.

Lourenco SV, Fernandes JD, Hsieh R, Coutinho-Camillo CM, Bologna S, Sanguenza M, Nico MM. Head and neck mucosal melanoma: a review. *Am J Dermatopathol*. 2014 Jul;36(7):578-87.

Lukas J, Sorensen CS, Lukas C, Santoni-Rugiu E, Bartek J. p16INK4a, but not constitutively active pRb, can impose a sustained G1 arrest: molecular mechanisms and implications for oncogenesis. *Oncogene*. 1999 Jul 8;18(27):3930-5.

Marks R. Epidemiology of melanoma. *Clin Exp Dermatol*. 2000 Sep;25(6):459-63.

McLaughlin CC, Wu XC, Jemal A, Martin HJ, Roche LM, Chen VW. Incidence of noncutaneous melanomas in the US. *Cancer*. 2005;103(5):1000-7.

Mathur NN. Head and neck mucosal melanomas. *Medscape*. 2011;1-8.

Mckay MM, Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*. 2007 May 14;26(22):3113-21.

Meira DD, de Almeida VH, Mororó JS, Nóbrega I, Bardella L, Silva RL, Albano RM, Ferreira CG. Combination of cetuximab with chemoradiation, trastuzumab or MAPK inhibitors: mechanisms of sensitisation of cervical cancer cells. *Br J Cancer*. 2009 Sep 1;101(5):782-91

Meleti M, Leemans CR, Mooi WJ, Vescovi P, van der Waal I. Oral malignant melanoma: a review of the literature. *Oral Oncol*. 2007 Feb;43(2):116-21

Mendenhall WM, Amdur RJ, Hinerman RW, Werning JW, Villaret DB, Mendenhall NP. Head and neck mucosal melanoma. *Am J Clin Oncol*. 2005 Dec;28(6):626-30.

Michel J, Perret-Court A, Fakhry N, Braustein D, Monestier S, Richard MA, Grob JJ, Giovanni A, Dessi P. Sinonasal mucosal melanomas: the prognostic value of tumor classifications. *Head Neck*. 2014;36(3):311-16.

Mohamed A, Gonzalez RS, Lawson D, Wang J, Cohen C. SOX10 expression in malignant melanoma, carcinoma, and normal tissues. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2013 Dec;21(6):506-10.

Moreno MA, Hanna EY. Management of mucosal melanomas of the head and neck: did we make any progress? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010 Apr;18(2):101-6.

Moreno MA, Roberts DB, Kupferman ME, DeMonte F, El-Naggar AK, Williams M, Rosenthal DS, Hanna EY. Mucosal melanoma of the nose and paranasal sinuses, a contemporary experience from the M. D Anderson Cancer Center. *Cancer*. 2010 May 1;116(9):2215-23.

Nandapalan V, Roland NJ, Helliwell TR, Williams EM, Hamilton JW, Jones AS. Mucosal melanoma of the head and neck. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1998 Apr;23(2):107-16

Nonaka D, Chiriboda L, Rubin BP. SOX10: a pan-schwannian and melanocytic marker. *Am J Surg Pathol*. 2008;32:1291–8.

Omholt K, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clin Cancer Res*. 2003;9(15):6483-8.

Owens JM, Roberts DB, Myers JN. The role of postoperative adjuvant radiation therapy in the treatment of mucosal melanomas of the head and neck region. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003 Aug;129(8):864-8

Patel SG, Prasad ML, Escrig M, Singh B, Shaha AR, Kraus DH, Boyle JO, Huvos AG, Busam K, Shah JP. Primary mucosal malignant melanoma of the head and neck. *Head Neck*. 2002 Mar;24(3):247-57.

Penel N, Mallet Y, Mirabel X, Van JT, Lefebvre JL. Primary mucosal melanoma of head and neck: prognostic value of clear margins. *Laryngoscope*. 2006; 116:993-5.

Postow MA, Hamid O, Carvajal RD. Mucosal melanoma: pathogenesis, clinical behavior, and management. *Curr Oncol Rep*. 2012 Oct;14(5):441-8.

Postow MA, Carvajal RD. Therapeutic implications of KIT in melanoma. *Cancer J*. 2012 Mar-Apr;18(2):137-41.

Poynter JN, Elder JT, Nair RP, Soengas MS, Johnson TM, Redman B, Thomas NE, Gruber SB. BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma Res*. 2006;16(4):267-73.

Prasad ML, Patel SG, Huvos AG, Shah JP, Busam KJ. Primary mucosal melanoma of the head and neck: a proposal for microstaging localized, Stage I (lymph node-negative) tumors. *Cancer*. 2004 Apr 15;100(8):1657-64

Ricaniadis N, Kataki A, Agnantis N, Androulakis G, Karakousis CP. Long-term prognostic significance of HSP-70, c-myc and HLA-DR expression. in patients with malignant melanoma. *Eur J Surg Oncol*. 2001;1(27):88-93.

Richard D. Carvajal, Cristina R. Antonescu, Jedd D. Wolchok, Paul B. Chapman, Ruth-Ann Roman, Jerrold Teitcher, Katherine S. Panageas, Klaus J. Busam, Bartosz Chmielowski, Jose Lutzky, Anna C. Pavlick, Anne Fusco, Lauren Cane, Naoko Takebe, Swapna Vemula, Nancy Bouvier, Boris C. Bastian, Gary K. Schwartz. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA*. 2011 June 8;305(22):2327–34.

Rinaldo A, Shaha AR, Patel SG, Ferlito A. Primary mucosal melanoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Acta Otolaryngol*. 2001;121:979-82.

Rivera RS, Nagatsuka H, Gunduz M, Cengiz B, Gunduz E, Siar CH, Tsujigiwa H, Tamamura R, Han KN, Nagai N. C-kit protein expression correlated with activating mutations in KIT gene in oral mucosal melanoma. *Virchows Arch*. 2008 Jan;452(1):27-32.

Rivera RS, Nagatsuka H, Siar CH, Gunduz M, Tsujigiwa H, Han PP, Katase N, Tamamura R, Ng KH, Naomoto Y, Nakajima M, Nagai N. Heparanase and vascular endothelial growth factor expression in the progression of oral mucosal melanoma. *Oncol Rep*. 2008 Mar;19(3):657-61.

Roesch A, Becker B, Meyer S, Hafner C, Wild PJ, Landthaler M, Vogt T. Overexpression and hyperphosphorylation of retinoblastoma protein in the progression of malignant melanoma. *Mod Pathol*. 2005 Apr;18(4):565-72.

Rubin BP, Singer S, Tsao C, Duensing A, Lux ML, Ruiz R, Hibbard MK, Chen CJ, Xiao S, Tuveson DA, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. KIT activation is a ubiquitous feature of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res*. 2001 Nov 15;61(22):8118-21.

Salama AK, Kim KB. Trametinib (GSK1120212) in the treatment of melanoma. *Expert Opin Pharmacother*. 2013 Apr;14(5):619-27.

Salama AK. Evolving pharmacotherapies for the treatment of metastatic melanoma. *Clin Med Insights Oncol*. 2013 Jun 20;7:137-49.

Salama AK, Kim KB. MEK inhibition in the treatment of advanced melanoma. *Curr Oncol Rep*. 2013 Oct;15(5):473-82.

Satzger I, Schaefer T, Kuettler U, Broecker V, Voelker B, Ostertag H, Kapp A, Gutzmer R. Analysis of c-KIT expression and KIT gene mutation in human mucosal melanomas. *Br J Cancer*. 2008 Dec 16;99(12):2065-9.

Seetharamu N, Ott PA, Pavlick AC. Novel therapeutics for melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2009 Jun;9(6):839-4.

Seetharamu N, Ott PA, Pavlick AC. Mucosal melanomas: a case-based review of the literature. *Oncologist*. 2010;15(7):772-81.

Sharma N. Primary oral malignant melanoma: two case reports and review of literature. *Case Rep Dent*. 2012; 2012: 975358.

Shinozaki M, Fujimoto A, Morton DL, Hoon DSB. Incidence of *BRAF* oncogene mutation and clinical relevance for primary cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:1753-7.

Schoenewolf NL, Bull C, Belloni B, Holzmann D, Tonolla S, Lang R, Mihic-Probst D, Andres C, Dummer R. Sinonasal, genital and mucocutaneous melanomas show distinct characteristics of KIT expression and mutations. *Eur J Cancer*. 2012;48:1842-52.

Silva BV, Horta BAC, Alencastro RB, Pinto AC. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Quim. Nova*. 2009;32(2):453-62.

Singer S, Rubin BP, Lux ML, Chen CJ, Demetri GD, Fletcher CD, Fletcher JA. Prognostic value of KIT mutation type, mitotic activity, and histologic subtype in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol*. 2002;20:3898-905.

Smalley KS. Understanding melanoma signaling networks as the basis for molecular targeted therapy. *J Invest Dermatol*. 2010 Jan;130(1):28-37.

Smalley KS, Flaherty KT. Development of a novel chemical class of BRAF inhibitors offers new hope for melanoma treatment. *Future Oncol*. 2009 Aug;5(6):775-8.

Smalley KS, Sondak VK, Weber JS. c-KIT signaling as the driving oncogenic event in sub-groups of melanomas. *Histol Histopathol*. 2009 May;24(5):643-50.

Smithers BM, McLeod GR, Little JH. Desmoplastic melanomas: patterns of recurrence. *World J Surg*. 1992;16:186-90.

Sortino-Rachou AM, Cancela MC, Voti L, Curado MP. Primary oral melanoma: population-based incidence. *Oral Oncol*. 2009 Mar;45(3):254-8.

Tas F, Keskin S. Mucosal melanoma in the head and neck region: different clinical features and same outcome to cutaneous melanoma. *ISRN Dermatol*. 2013 May;2013:586915.

Tate G, Tajiri T, Suzuki T, Mitsuya T. Mutations of the KIT gene and loss of heterozygosity of the PTEN region in a primary malignant melanoma arising from a mature cystic teratoma of the ovary. *Cancer Genet Cytogenet*. 2009;190:15-20

Temam S, Mamelie G, Marandas P, Wibault P, Avril MF, Janot F, Julieron M, Schwaab G, Luboinski B. Postoperative radiotherapy for primary mucosal melanoma of the head and neck. *Cancer*. 2005 Jan;103(2):313-9.

Thompson LD, Wieneke JA, Miettinen M. Sinonasal tract and nasopharyngeal melanomas: a clinicopathologic study of 115 cases with a proposed staging system. *Am J Surg Pathol*. 2003 May;27(5):594-611.

Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet*. 2005 Feb 19-25;365(9460):687-701.

Torres-Cabala CA, Wang WL, Trent J, Yang D, Chen S, Galbincea J, Kim KB, Woodman S, Davies M, Plaza JA, Nash JW, Prieto VG, Lazar AJ, Ivan D. Correlation between KIT expression and KIT mutation in melanoma: a study of 173 cases with emphasis on the acral-lentiginous/mucosal type. *Mod Pathol*. 2009 Nov;22(11):1446-56.

Turri-Zanoni M, Medicina D, Lombardi D, Ungari M, Balzarini P, Rossini C, Pellegrini W, Battaglia P, Capella C, Castelnuovo P, Palmedo G, Facchetti F, Kutzner H, Nicolai P, Vermi W. Sinonasal mucosal melanoma: molecular profile and therapeutic implications from a series of 32 cases. *Head Neck*. 2013;35:1066-77.

Ugurel S, Hildenbrand R, Zimpfer A, La Rosee P, Paschka P, Sucker A, Keikavoussi P, Becker JC, Rittgen W, Hochhaus A, Schadendorf D. Lack of clinical efficacy of imatinib in metastatic melanoma. *Br J Cancer*. 2005;92:1398-405.

Zebary A, Jangard M, Omholt K, Ragnarsson-Olding B, Hansson J. KIT, NRAS and BRAF mutations in sinonasal mucosal melanoma: a study of 56 cases. *Br J Cancer*. 2013 Aug 6;109(3):559-64.

Wada H, Nemoto K, Ogawa Y, Hareyama M, Yoshida H, Takamura A, Ohmori K, Hamamoto Y, Sugita T, Saitoh M, Yamada S. A multi-institutional retrospective analysis of external radiotherapy for mucosal melanoma of the head and neck in Northern Japan. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004 Jun 1;59(2):495-500.

Wagner M, Morris CG, Werning JW, Mendenhall WM. Mucosal melanoma of the head and neck. *Am J Clin Oncol*. 2008 Feb;31(1):43-8.

Weinlich G, Bitterlich V, Fritsch PO, Zelger B. Metallothionein overexpression as a prognostic factor for progression and survival in melanoma. A prospective study on 520 patients. *Br J Dermatol*. 2003;149(3):535-41.

Wenig BM, Dulgerov P, Kapadia SB, Prasad ML, Fanburg Smith JC, Thompson LDR. Neuroectodermal tumors. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidranski D, editors. *World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours*. Lyon: IARC Press; 2005. p 65-75.

Went PT, Dimhofer S, Bundi M, Mirlacher M, Schraml P, Mangiolaio S, Dimitrijevic S, Kononen J, Lugli A, Simon R, Sauter G. Prevalence of *KIT* expression in human tumors. *J Clin Oncol*. 2004;22:4514-22.

Whiteman DC, Whiteman CA, Green AC. Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Causes Control*. 2001 Jan;12(1):69-82.

Willmore-Payne C, Holden JA, Hirschowitz S, Lester JL. *BRAF* and *c-KIT* gene copy number in mutation-positive malignant melanoma. *Hum Pathol*. 2006;37:520-7.

Willmore-Payne C, Holden JA, Tripp S, Layfield L. Human malignant melanoma: detection of *BRAF* and *c-KIT*- activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. *Hum Pathol*. 2005;36:486-93.

- Winnenpenninckx V, Lazar V, Michiels S, Dessen P, Stas M, Alonso SR, Avril M, Romero PLO, Robert T, Balacescu O, Eggermont AMM, Lenoir G, Sarasin A, Tursz T, Oord JJ, Spatz A. Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical outcome. *J Nat. Cancer Instit.* 2006;98(7):472-82.
- Woodman SE, Davies MA. Targeting KIT in melanoma: a paradigm of molecular medicine and targeted therapeutics biochem pharmacol. *Biochem Pharmacol.* 2010 September 1;80(5):568–74.
- Wyman K, Atkins MB, Prieto V, Eton O, McDermott DF, Hubbard F, Byrnes C, Sanders K, Sosman JA. Multicenter phase II trial of high- dose imatinib mesylate in metastatic melanoma: significant toxicity with no clinical efficacy. *Cancer.* 2006;106:2005–11.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* 1995;270(5240):1326-31.
- Xing Y, Cromwell KD, Cornier JN. Review of diagnostic imaging modalities for the surveillance of melanoma patients. *Dermatol Res Pract.* 2012:941-21.
- Yanagi T, Mizoe JE, Hasegawa A, Takagi R, Bessho H, Onda T, Kamada T, Okamoto Y, Tsujii H. Mucosal malignant melanoma of the head and neck treated by carbonion radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009 May 1;74(1):15.
- Younes MN, Myers JN. Melanoma of the head and neck: current concepts in staging, diagnosis, and management. *Surg Oncol Clin N Am.* 2004 Jan;13(1):201-29.
- Yun J, Lee J, Jang J, Lee EJ, Jang KT, Kim JH, Kim KM. KIT amplification and gene mutations in acral/mucosal melanoma in Korea. *APMIS.* 2011 Jun;119(6):330-5.
- Zebary A, Jangard M, Omholt K, Ragnarsson-Olding B, Hansson J. KIT, NRAS and BRAF mutations in sinonasal mucosal melanoma: a study of 56 cases. *Br J Cancer.* 2013 Aug 6;109(3):559-64.
- Zhang F, Strand A, Robbins D, Cobb MH, Goldsmith EJ. Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature.* 1994 Feb 24;367(6465):704-11