ANDRÉ BANDIERA DE OLIVEIRA SANTOS

**Expressão imuno-histoquímica das proteínas p16, ciclina D1, CDK4, pRb,
p53 e p21 em melanomas cutâneos de cabeça, pescoço e tronco e sua
relação com prognóstico**

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

Programa: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Lenine Garcia
Brandão

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, André Bandiera de Oliveira

Expressão imuno-histoquímica das proteínas p16, ciclina D1, CDK4, pRb, p53 e p21 em melanomas cutâneos de cabeça, pescoço e tronco e sua relação com prognóstico / André Bandiera de Oliveira Santos. -- São Paulo, 2010.

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

Orientador: Lenine Garcia Brandão.

Descritores: 1.Melanoma 2.Inibidor p16 de quinase ciclina-dependente 3.Ciclina D1 4.Quinase 4 dependente de ciclina 5.Proteína do retinoblastoma 6.Proteína supressora de tumor p53 7.Inibidor de quinase dependente de ciclina p21 8.Prognóstico 9.Imunoistoquímica

USP/FM/DBD-158/10

A meus pais, Ivan e Oscarlina, pela vida que me deram e proporcionaram.

A minha esposa, Mônica, por completá-la.

A minha filha, Luana, por me mostrar seu sentido.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Lenine Garcia Brandão, de quem tenho o privilégio de ser amigo e aluno.

À Dra. Silvia Vanessa Lourenço, cuja participação no trabalho foi absolutamente fundamental desde o seu planejamento, execução e conclusão.

Ao professor Alberto Rossetti Ferraz, pelas oportunidades que me foram oferecidas. Espero corresponder a confiança.

Aos amigos cirurgiões Simone Elisa Dutenhofner e José de Souza Brandão Neto, pelo companheirismo diário e amizade pessoal, acadêmica, clínica e cirúrgica.

Aos amigos cirurgiões Milton Inoue e Chin Shien Lin, a quem muito tempo devo, necessário para a conclusão desse trabalho, gentilmente por eles cedido.

Ao professor Vergilius José Sampaio Araújo Filho e ao Dr. Erivelto Martinho Volpi, pelos ensinamentos práticos clínicos e cirúrgicos.

Ao Dr. Marco Aurélio Vamondes Kulcsar e ao Dr. Celso Ubirajara M Friguglietti, amigos e conselheiros.

Ao professor Claudio Roberto Cernea, professor e acadêmico, que me ensinou grande parte do pouco que sei.

Aos professores Gilberto Britto e Marcos Roberto Tavares, pelas lições sobre medicina e a vida.

Ao professor Pedro Michaluart Jr., jovem exemplo de vida acadêmica, a quem desejo a mais pronta recuperação.

Ao Dr. Fábio Luis de Menezes Montenegro, um enorme agradecimento do tamanho de sua competência.

Ao Dr. Marcelo Doria Durazzo, professor e amigo.

Aos amigos e colegas Dr. Sergio Samir Arap, Dr. Regis Turcano, Dr. Rodney Smith, Dra. Raquel Ajub Moyses, Dra. Marilia Brescia, Dr. Maury Sampaio e Dr. Cesar Simões, médicos da nossa Disciplina.

Aos residentes do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCFMUSP, que tanto me ensinam diariamente.

Ao Serviço de Pesquisa Clínica do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, em especial a estatística Júlia Fukushima pelos ensinamentos, consultoria e análise estatística presente nesse estudo.

À secretária Eliane, da pós graduação de Clínica Cirúrgica: sem ela certamente esse trabalho não seria concluído.

À secretária Ruth Tadeu Araújo, há três gerações envolvida com pacientes com melanoma, um agradecimento especial pela paciência, pelo empenho na elaboração de planilhas e contato com os pacientes: sem ela certamente esse trabalho não seria sequer iniciado.

A meu avô, Dino Carlos Bandiera, *in memoriam*, que deu início a toda essa história. Se defendendo doutorado hoje, é fruto de muito trabalho que começou há meio século tratando de pacientes com melanoma.

Aos pacientes, sem os quais não há motivo para pesquisa ou assistência.

Esta tese obedece:

Às recomendações do Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, segundo Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias elaborado por Cunha AC, Freddi MJAL, Crestana MF, Aragão MS, Cardoso SC, Vilhena V. São Paulo. Serviço de Biblioteca e Documentação, 2005.

As normas de referências bibliográficas adaptadas do *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

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

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas e siglas

Resumo

Summary

1) Introdução	1
2) Revisão da literatura	7
Melanoma	7
Ciclo celular	15
Proteínas do ciclo celular e melanoma	17
3) Objetivos	25
4) Métodos	26
Pesquisa dos dados da casuística e desenho do estudo	26
Análise histopatológica	28
Análise estatística	31
5) Resultados	33
Resultados descritivos relativos à casuística	33
Resultados relativos à análise imuno-histoquímica	42
6) Discussão	60
7) Conclusões	73
8) Anexos	76
9) Referências	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do locus gênico CDKN2A e das proteínas reguladoras do ciclo celular.	5
Figura 2 – Frequência (em porcentagem) de pacientes com melanoma de cabeça, pescoço e tronco de acordo com a classificação de Clark.	34
Figura 3 – Distribuição (em porcentagem) por tipo histológico de melanomas de cabeça, pescoço e tronco.	34
Figura 4 – Distribuição segundo a classificação T (em porcentagem) dos pacientes com melanoma de cabeça, pescoço e tronco(TNM 2010).	35
Figura 5 – Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença dos pacientes com melanoma de cabeça, pescoço e tronco.	36
Figura 6 – Comparação do tempo de sobrevida livre de doença entre os pacientes tratados por melanoma com idade acima e abaixo de 65 anos.	37
Figura 7 – Comparação do tempo de sobrevida livre de doença entre os pacientes tratados por melanoma em tronco e cabeça/pescoço.	38
Figura 8 – Comparação da frequência de pacientes com melanoma segundo os tipos histológicos e evolução.	39
Figura 9 – Comparação da frequência de pacientes com melanoma segundo os níveis de Clark e o tipo de evolução.	39
Figura 10 – Comparação do tempo de sobrevida livre de doença entre os pacientes tratados por melanoma segundo os níveis de Clark.	40
Figura 11 – Comparação entre os grupos de pacientes com melanoma com evolução favorável e desfavorável, segundo a classificação T (TNM 2010).	41

Figura 12 – Fotomicrografias de melanomas com reação imuno-histoquímica positiva para p16.	42
Figura 13 – Comparação do tempo de sobrevida livre de doença entre os pacientes tratados por melanoma segundo a expressão de p16.	43
Figura 14 – Comparação dos índices de Breslow e expressão de p16 dos pacientes tratados por melanoma.	44
Figura 15 – Fotomicrografias de melanomas com reação imuno-histoquímica positiva para ciclina D1.	45
Figura 16 – Comparação do tempo de sobrevida livre de doença entre os pacientes tratados por melanoma segundo a expressão de ciclina D1.	46
Figura 17 – Comparação dos índices de Breslow e expressão de ciclina D1 dos pacientes tratados por melanoma.	47
Figura 18 – Comparação da expressão de ciclina D1 em melanomas segundo a topografia da lesão primária.	47
Figura 19 – Fotomicrografias de melanomas com reação imuno-histoquímica positiva para CDK4.	48
Figura 20 – Comparação do tempo de sobrevida livre de doença entre os pacientes tratados por melanoma segundo a expressão de CDK4.	49
Figura 21 – Comparação dos índices de Breslow e expressão de CDK4 dos pacientes tratados por melanoma.	50
Figura 22 – Fotomicrografias de melanomas com reação imuno-histoquímica positiva para pRb.	51
Figura 23 – Comparação do tempo de sobrevida livre de doença entre os pacientes tratados por melanoma segundo a expressão de pRb.	52

Figura 24 – Comparação dos índices de Breslow e expressão de pRb dos pacientes tratados por melanoma.	53
Figura 25 – Fotomicrografias de melanomas com reação imuno-histoquímica positiva para p53.	54
Figura 26 – Comparação do tempo de sobrevida livre de doença entre os pacientes tratados por melanoma segundo a expressão de p53.	55
Figura 27 – Comparação dos índices de Breslow e expressão de p53 dos pacientes tratados por melanoma.	56
Figura 28 – Fotomicrografias de melanomas com reação imuno-histoquímica positiva para p21.	57
Figura 29 – Comparação do tempo de sobrevida livre de doença entre os pacientes tratados por melanoma segundo a expressão de p21.	58
Figura 30 – Comparação dos índices de Breslow e expressão de p21 dos pacientes tratados por melanoma.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativa de sobrevida em cinco e 10 anos para melanoma cutâneo segundo o estágio clínico (TNM, AJCC 2002).	10
Tabela 2 - Margens de segurança recomendadas para melanomas de acordo com índice de Breslow.	11
Tabela 3 - Expressão de p16 em melanomas primários na literatura.	18
Tabela 4 - Expressão de ciclina D1 em melanomas primários na literatura.	20
Tabela 5 - Expressão de pRb em melanomas primários na literatura.	22
Tabela 6 - Expressão de p21 em melanomas primários na literatura.	24
Tabela 7 - Anticorpos, clones, fabricantes e detalhes dos reagentes utilizados nas reações imuno-histoquímicas.	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC – “American Joint Committee on Cancer “

AKT – “v-akt murine thymoma viral oncogene homolog”

BRAF – “v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1”

BSA – soro de albumina bovina

c-KIT – “v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog”

c-MET – “met proto-oncogene (hepatocyte growth factor) receptor “

CDK2 – quinase 2 dependente de ciclina

CDK4 – quinase 4 dependente de ciclina

CDK6 – quinase 6 dependente de ciclina

CDKN1A – inibidor da quinase dependente de ciclina tipo 1A

CDKN2A – inibidor da quinase dependente de ciclina tipo 2A

DNA – ácido desoxirribonucleico

FAS – Membro 6 da superfamília de receptores do TNF

FGF – fator de crescimento de fibroblasto

FGF-R – receptor do FGF

G1 – “gap 1”

G2 – “gap 2”

HGF – fator de crescimento do hepatócito

HMB-45 - reação imuno-histoquímica utilizada para diferenciar melanoma

IGF – fator de crescimento derivado da insulina

IGF-1R – receptor do fator de crescimento derivado da insulina tipo 1

INK4a – inibidor 4a de quinase ciclina dependente

Ki-67 – marcador imuno-histoquímico de proliferação celular

M – mitose

MAPK - “mitogen-activated protein kinase”

Melan-A - reação imuno-histoquímica utilizada para diferenciar melanoma

MSH – hormônio estimulador de melanócito

NRAS – “neuroblastoma RAS viral oncogene homolog”

p14ARF – p14, “alternative reading frame”

p16 – inibidor p16 de quinase ciclina-dependente

p21 – inibidor de quinase dependente de ciclina p21

p53 – proteína supressora de tumor p53

PI3K- fosfatidil-inositol 3 quinase

pRb –Proteína do retinoblastoma

RAF – “v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog”

RAS – “rat sarcoma viral oncogene homolog”

S – síntese

S100 – reação imuno-histoquímica utilizada para diferenciar melanoma

SCF – fator de célula tronco “stem cell factor (KITLG, KIT ligand)”

SFB – soro fetal bovino

SIDA – síndrome da imunodeficiência adquirida

TMA – “tissue microarray”

TNF- fator de necrose tumoral

TNM – tumor, linfonodos, metástases

TP53 – gene que codifica a proteína supressora de tumor p53

TRAIL – “ tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-receptor”

TRIS – tampão tris (hidroximetil) aminometano

VEGF – fator de crescimento do endotélio vascular

VEGFR - receptor de VEGF

WNT – “wingless-type MMTV (mouse mammary tumor virus) integration site family”

RESUMO

Santos, ABO. Expressão das proteínas p16, ciclina D1, CDK4, pRb, p53 e p21 em melanomas cutâneos de cabeça, pescoço e tronco e sua relação com prognóstico (tese). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.

O melanoma cutâneo é a neoplasia de pele de maior mortalidade. A imprevisibilidade de sua evolução é uma de suas características principais, o tratamento do tumor primário é, atualmente, de pouca morbidade e, na doença disseminada, as opções terapêuticas são pouco eficazes. É fundamental a pesquisa de marcadores tumorais que permitam a previsão da evolução, melhor compreensão da patogênese do melanoma e possibilitem a descoberta de alvos moleculares. Nesse contexto, estudos genéticos mostraram a importância da regulação do ciclo celular, especialmente a passagem da fase G1-S. Importantes fatores envolvidos compõem a cascata da proteína Rb (p16, ciclina D1, CDK4 e pRb) e da proteína p53 (p53 e p21). Objetivo: verificar a frequência da expressão de p16, ciclina D1, CDK4, pRb, p53 e p21 em melanomas cutâneos de cabeça, pescoço e tronco e sua relação com prognóstico. Métodos: Estudo retrospectivo envolvendo 46 pacientes (sendo 67,3% homens, idade média $57,7 \pm 15,8$ anos) com melanoma cutâneo de cabeça, pescoço e tronco que foram tratados pela mesma equipe com seguimento mínimo de dois anos. Foram estudados fatores clínicos (topografia do tumor primário, tempo de seguimento, ocorrência de metástases e óbito relacionado), histopatológicos (tipo histológico, índice de Clark, índice de Breslow) e análise imuno-histoquímica pela técnica de micro-array para as proteínas reguladoras do ciclo celular p16, ciclina D1, CDK4, pRb, p53 e p21. Resultados: Houve proporção igualitária entre as topografias (23 casos em tronco, 23 em cabeça e pescoço). Treze pacientes com Clark I (29,5%), cinco com II (11,3%), 16 com III (36,5%), 10 com IV (22,7%) e nenhum com Clark V. A média das medidas de Breslow foi 0,96 (DP=1,01). O seguimento médio foi de 77 meses (DP=47). Oito dos 46 pacientes (17,3%) tiveram evolução desfavorável, com seis óbitos relacionados. A idade foi mais elevada no grupo com evolução desfavorável ($p=0,04$). Houve expressão de p16 em 80%, ciclina D1 em 58,9%, CDK4 em 43,5%, pRb em 58,5%, p53 em 53,6% e p21 em 52,3% dos melanomas. Em análise univariada, a expressão do p21 foi relacionada com evolução desfavorável ($p=0,04$), o que não foi observado com a expressão dos outros marcadores ($p>0,05$). Conclusão: A expressão da proteína p21 nos melanomas cutâneos de cabeça, pescoço e tronco foi relacionada com evolução desfavorável, o que não ocorreu com outros fatores envolvidos na regulação do ciclo celular.

Descritores: melanoma, Inibidor p16 de Quinase Ciclina-Dependente, ciclina D1, Quinase 4 Dependente de Ciclina, Proteína do Retinoblastoma, Proteína Supressora de Tumor p53, Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina p21, prognóstico, imunoistoquímica, micro-array.

SUMMARY

Santos, ABO. Prognostic impact of p16, cyclin D1, CDK4, pRb, p53 and p21 expression in head, neck and trunk melanomas.

Melanoma is the most lethal skin cancer. The outcome of melanoma is not predictable in most cases. Although the treatment for the primary tumor is well tolerated, there are no effective therapeutic options in disseminated disease. Efforts are being made in the search for tumoral markers that may predict outcome, increase the comprehension of melanoma pathogenesis, and may also help the search for molecular targets. In this issue, genetic studies concerning the regulation of cell cycle, including the G1-S checkpoint, are important. The retinoblastoma protein (pRb) pathway (p16, cyclin D1, CDK4 and pRb) and the p53 pathway (p53 and p21) are part of this regulation. Objectives: to verify the expression of p16, cyclin D1, CDK4, pRb, p53 and p21 in head, neck and trunk melanomas, and its correlation with prognosis. Method: Retrospective study approved by institution ethics committee. Forty-six head, neck and trunk melanoma patients (67.3% men, mean age 57.7 ± 15.8) treated by a single surgeon with minimum 2-years follow-up were enrolled. Clinical factors (primary tumor location, follow-up period, metastasis or related deaths), pathologic (histological subtype, Clark and Breslow index) and microarray immunohistochemical analysis of the cell cycle proteins p16, cyclin D1, CDK4, pRb, p53 and p21. Results: Location of the primary tumor was equal for head/neck and trunk (50% each). Thirteen patients were classified as Clark I (29.5%), five as Clark II (11.3%), 16 as Clark III (36.5%), 10 as IV (22.7%), none as Clark V. Mean Breslow measure was 0.96 ± 1.01 . Mean follow-up was 77 ± 47 months. Eight patients (17.3%) had bad outcome, with six related deaths. Patients with worse outcome had a higher mean age at diagnosis ($p=0,04$). Expression of p16 was positive in 80%. Cyclin D1 was positive in 58.9%. CDK4 was positive in 43.5%. pRb was positive in 58.5%. p53 was positive in 53.6%. p21 was positive in 52.3%. Univariate analysis showed that p21 expression was related to worse outcome ($p=0,04$), while the other markers were not ($p>0,05$). Conclusion: p21 expression in head, neck and trunk melanomas was related to worse outcome. Expression of the other cell cycle regulators proteins was not.

Descriptors: melanoma, Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p16 , Cyclin D1, Cyclin-Dependent Kinase 4, Retinoblastoma protein, Tumor Suppressor Protein p53, Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21, prognosis, immunohistochemistry, micro-array analysis

1) INTRODUÇÃO

O câncer de pele é a neoplasia mais comum nos indivíduos caucasianos. Entre os tipos de câncer de pele, o mais frequente é o carcinoma basocelular, seguido pelo carcinoma espinocelular e, posteriormente, pelo melanoma. Menos prevalente, o melanoma é o mais agressivo e historicamente o mais temido.¹

O melanoma foi descrito em 1804 por René Laennec, médico francês conhecido também pela invenção do estetoscópio.² Trata-se de neoplasia dos melanócitos da pele, de comportamento agressivo e em grande parte imprevisível. Desde os relatos mais antigos, é descrita a natureza invasiva e o prognóstico sombrio, sendo considerado por Dupuytren, professor de Laennec,³ condição em que a cirurgia não deveria ser realizada, por não haver mais esperança.

O interesse pelo melanoma foi gradualmente aumentando com a descrição de seu grande potencial de desenvolver metástases. Em 1820, William Norris descreveu o primeiro caso em literatura inglesa, em que um tumor enegrecido cresceu onde antes havia um nevo, tornou-se circundado por lesões menores marrons e, após ressecção, houve recorrência no local da cicatriz. Esse manuscrito foi o primeiro a levantar a questão da hereditariedade envolvida na doença, já que o pai, os irmãos e os filhos eram portadores de múltiplos nevos – meio século antes dos estudos de herança genética de Mendel.^{2, 4}

Após essas primeiras publicações, o melanoma passou a ser conhecido e surgiram as primeiras recomendações de tratamento. William Sampson Handley publicou, em 1907, uma proposta de tratamento cirúrgico com margem

de segurança de 2,5 polegadas e linfadenectomia regional na presença ou não de linfonodos metastáticos, conduta que foi seguida por quase 70 anos.²

Em 1969, Wallace Clark et al publicaram um artigo que mudaria o conhecimento do melanoma até aquela época. Segundo os autores, a partir da camada da pele invadida, o melanoma apresentaria diferentes tipos de evolução.⁵ Alexander Breslow melhorou esse conceito, propondo medida em milímetros da espessura do tumor desde a camada granulosa, eliminando o critério subjetivo da análise. O índice de Breslow ainda é o mais importante fator prognóstico do melanoma.⁶

Houve evolução no tratamento cirúrgico, havendo ressecções com margens menores e menos mutiladoras. Em grandes estudos multicêntricos, publicados nas décadas de 70 e 80, Veronesi, Adamus, Bandiera et al mostraram que o esvaziamento eletivo das cadeias linfonodais não se justificaria e provaram que a diminuição das margens cirúrgicas era oncolologicamente segura.⁷⁻⁹ Essa proposta de tratamento cirúrgico é seguida até hoje. A introdução da biópsia do linfonodo sentinela foi a novidade cirúrgica que deixou para segundo plano a discussão sobre esvaziamento eletivo no melanoma.¹⁰

Nas décadas em que se desenvolveu o tratamento cirúrgico, houve aumento no número de casos em todo o mundo e em nosso meio.¹¹ Nos Estados Unidos, a incidência estimada para 2009 foi de 19,1 casos para 100.000 habitantes, com clara tendência de aumento nos últimos dez anos. Consequentemente, um em cada 53 norte-americanos nascidos em 2009 desenvolverá melanoma.¹ No Brasil, a estimativa de incidência para 2008 foi de 3,76 casos por 100.000 habitantes.¹²

Na Austrália, o melanoma é considerado um grave problema de saúde pública com mais de 50 casos por 100.000 habitantes. Após estratégias de prevenção primária – campanhas de conscientização a respeito de exposição solar – os australianos tiveram êxito em diminuir a incidência entre os mais jovens, ainda que os mais idosos permaneçam com incidência elevada.¹³

O diagnóstico precoce certamente é o principal objetivo no que diz respeito à prevenção secundária. O melanoma pode ter bom prognóstico se não for espesso, com taxas de cura que se aproximam de 100% nos melanomas *in situ*. Quando o diagnóstico é feito após o índice de Breslow ultrapassar 4 mm, a sobrevida em 5 anos cai para menos de 50%.¹⁴

No tratamento do melanoma, dois fatores relacionados ao tumor primário são fortes preditores de sobrevida: a espessura e a presença ou ausência de ulceração. A ulceração tem papel importante nos melanomas por ser fator independente na predição de sobrevida e faz parte da caracterização do fator T no estadiamento TNM de 2002¹⁵ e de 2010.¹⁶

Outros fatores clínicos preditores de pior prognóstico são a idade avançada, o sexo masculino e o sítio anatômico do tumor primário localizado em cabeça/pescoço e tronco (se comparado à localização em membros).^{14, 15}

Pouco se sabe, no entanto, sobre outros fatores em pacientes sem metástases. Existe grande imprevisibilidade na evolução¹⁷ e os tratamentos disponíveis na doença disseminada são, em grande parte, desanimadores.¹⁸

Há pouco mais de cinco décadas foi descrita a estrutura do DNA. Desde então, o conhecimento da biologia molecular trouxe à medicina uma nova maneira de procurar suas respostas e, com o melanoma, não foi diferente. Na década de 90, estudos sobre o p53 (atualmente chamado TP53), “o guardião

do genoma”, estiveram entre os primeiros a tentar elucidar as questões prognósticas.^{19, 20}

Avanços são evidentes na biologia molecular do melanoma, havendo conhecimento acumulado no que diz respeito a proliferação celular (via da MAPK),^{21,22} sinalização antiapoptótica (caspases e AKT)²³ e regulação da transcrição do melanócito (fator MITF)²⁴⁻²⁶. As vias da MAPK e AKT não são independentes: agem de maneira sinérgica em diversos mecanismos oncogénéticos.²³

Os conhecimentos acerca da biologia molecular do melanoma são complexos e uma revisão aprofundada do assunto não faz parte do escopo deste estudo.

Em 1994 foi descrito o locus gênico envolvido em grande parte dos melanomas de origem familiar^{27, 28} em uma região no gene 9p21. Denominado CDKN2A, esse locus dá origem, com uma área de transcrição comum, a dois tipos de proteína diferentes: p16 INK4A (inibidor da ciclina dependente de quinase 4 – CDK4), ou simplesmente p16 e p14ARF (“alternative reading frame”, ou p14), descrita posteriormente (Figura 1).

Figura 1 – Representação esquemática do locus gênico CDKN2A e das proteínas reguladoras do ciclo celular.

Ambas atuam como supressoras de tumor, ativando cascatas que regulam negativamente o processo do ciclo celular. A proteína p16 regula a via que é composta por ciclina D1, CDK4/6, e proteína Rb, enquanto que a via p14 regula a via que controla o p53 e o p21. Tanto a proteína Rb quanto o p53 mantêm a célula na fase G1, impedindo a entrada na fase S do ciclo celular. Qualquer alteração em componentes dessas vias pode determinar crescimento e proliferação celular.²³

A mutação do p16 leva à ativação da ciclina D1, que se acopla com outras proteínas, CDK4 e CDK6 (ciclina dependentes de quinases), que quando expressas denotam maior agressividade do tumor. O complexo formado promove a fosforilação da proteína Rb e a célula perde o controle que a mantém na fase G1 e entra descontroladamente na fase S.²³

A transcrição do p14ARF leva à produção da proteína p53, extensamente estudada, que atua como supressora de tumor através da indução da proteína p21, que também promove a regulação do ciclo celular não permitindo a fosforilação da proteína Rb por outras ciclinas (CDK2 e ciclina E). O descontrole desse processo leva a não efetividade da proteína p53, que não induz a formação da proteína inibitória p21 e a fosforilação da proteína Rb ocorre, levando à divisão celular.²³

A compreensão desses processos moleculares é fundamental para o conhecimento da patogênese do melanoma e formam a base dos estudos que pesquisam terapias com alvos moleculares. O estudo da expressão das proteínas envolvidas no ciclo celular poderá permitir, no futuro, que a imprevisibilidade em relação a prognóstico não seja tão elevada.

Pretendemos assim, estudar a imunoexpressão das principais proteínas envolvidas no ciclo celular codificadas pelo locus CDKN2A em uma série de pacientes com melanoma de cabeça, pescoço e tronco e testar se tal expressão é capaz de predizer o prognóstico.

2) REVISÃO DE LITERATURA

MELANOMA

O melanoma é o tumor maligno dos melanócitos, células neuroectodérmicas derivadas da crista neural. Essas células estão presentes na pele e nas mucosas, principais sítios de desenvolvimento do melanoma.

A doença é prevalente em pessoas de pele clara, olhos claros, que apresentam pouca ou nenhuma capacidade de se bronzear, cabelos loiros ou ruivos e que, quando expostas ao sol, facilmente ficam com a pele vermelha e com bolhas.

O melanoma tem relação com a exposição intermitente ao sol, em especial os raios ultravioletas, como é hábito entre os executivos nas grandes cidades.²⁹

Fatores de risco individuais incluem xeroderma pigmentoso, síndrome dos nevos displásicos, imunossupressão (por SIDA ou transplantados), história pessoal de melanoma ou de outros tumores cutâneos. O fator de risco mais relevante é a história familiar de melanoma, sendo que o risco relativo de se desenvolver melanoma com três ou mais parentes de primeiro grau afetados chega a ser 35 a 70 vezes maior que na população normal.³⁰

A herança genética do melanoma tem sido estudada com especial atenção ao locus CDKN2A, localizado no gene 9p21, que dá origem ao p16INK4A e ao p14ARF. Mutações nesse locus têm sido encontradas em 30 a 40% das famílias com três ou mais indivíduos portadores de melanoma. Os

portadores dessa mutação têm risco de desenvolver melanoma da ordem de 50-90% aos 80 anos de idade.³¹

A incidência de melanoma é a que mais cresce entre os tumores cutâneos malignos. Desde a década de 60, a incidência mundial vem crescendo entre três e oito por cento ao ano e, muito embora o número absoluto de mortes relacionadas tenha aumentado, a mortalidade pela doença tem sido menor. Na década de 60, cerca de 60% dos indivíduos diagnosticados com melanoma morriam da doença e hoje esse índice é de 11%, fato atribuído principalmente a diagnósticos precoces.³²

O diagnóstico da lesão primária é clínico, dermatoscópico e histopatológico.

Clinicamente, o melanoma é uma lesão pigmentada que apresenta alterações de suas características em um período de meses ou anos. As características clínicas mais frequentes são alterações de tamanho, coloração, elevação, sangramento, prurido e ulceração.³³

As características utilizadas para realização de um diagnóstico precoce foram reunidas na assim denominada regra mnemônica do ABCD: assimetria entre os principais eixos da lesão (A), identificação de bordos irregulares (B), multiplicidade de cores (C) e diâmetro acima de 6 mm (D). A alteração da lesão com o tempo deve ser considerada e tem sido sugerida como o critério E (“evolving”).³⁴

Outras propriedades clínicas importantes são o prurido, a ulceração, a elevação e a regressão (mais frequentes em melanomas mais avançados). Ainda que a maioria das lesões siga esse padrão de comportamento, existem

melanomas que ocorrem a partir de nevos que alteram sua aparência e não apresentam tais características. Cerca de 5% dos melanomas são amelanóticos, apresentando-se avermelhados ou róseos, podendo ser erroneamente diagnosticados como carcinomas basocelulares ou espinocelulares.³²

O melanoma pode ser classificado em:

1. Extensivo superficial
2. Nodular
3. Lentigo maligno melanoma
4. Acral lentiginoso

O tipo extensivo superficial é o mais comum - cerca de 70% dos melanomas - e geralmente ocorre sobre um nevo precursor. O tipo nodular é o mais agressivo, devido ao fato de sua fase vertical ocorrer em menor tempo, raramente apresentando as características da regra do ABCD. O lentigo maligno melanoma é muito comum em áreas expostas de cabeça e pescoço, em idosos e tem prognóstico relativamente melhor. O melanoma acral lentiginoso é hoje visto como uma entidade à parte, ocorre em extremidades e é prevalente em negros.^{15, 33}

No que diz respeito à dermatoscopia, a presença de rede pigmentar, glóbulos marrons, pontos pretos e pseudópodos, aliados aos dados clínicos, confirmam a necessidade de biópsia, que deve ser excisional sempre que possível.³⁵

As características histopatológicas que confirmam o diagnóstico são a presença de melanócitos atípicos, figuras de mitose e epiderme hiperplásica. A imuno-histoquímica trouxe contribuição importante principalmente nos casos

com diagnóstico diferencial difícil, havendo positividade característica de HMB-45, proteína S-100 e Melan-A, hoje utilizados rotineiramente na prática clínica.³²

Os fatores prognósticos relacionados com a sobrevida são a espessura tumoral (índice de Breslow) e a ulceração.¹⁴ O índice mitótico tem sido recentemente mais valorizado nas lesões pouco espessas e substituiu o nível de Clark no novo estadiamento TNM.¹⁶ Estudos mostram que o número de metástases linfonodais, a massa tumoral metastática (macroscópica ou microscópica) e a ulceração do tumor primário são também fatores importantes no prognóstico para pacientes com tumores em estágio intermediário (III). Para os pacientes com metástase à distância, o local da metástase (visceral ou não-visceral) é o principal fator prognóstico.

A classificação atual do melanoma cutâneo, estabelecido pelo “AJCC Melanoma Staging Committee”, o estadiamento TNM 2010, é baseado nesses fatores (anexo A).¹⁶

A estimativa de sobrevida de acordo com o estadiamento AJCC 2002 está representada na Tabela 1:

Tabela 1 - Estimativa de sobrevida em cinco e 10 anos para melanoma cutâneo segundo o estágio clínico (TNM, AJCC 2002).¹⁴

Estádio clínico	Sobrevida em 5 anos	Sobrevida em 10 anos
I	93%	85%
II	68%	55%
III	45%	36%
IV	11%	6%

Não há fatores imuno-histoquímicos ou marcadores tumorais histopatológicos capazes de prever o prognóstico do melanoma cutâneo, ou que façam parte do estadiamento TNM.

O tratamento do melanoma é essencialmente cirúrgico. Deve-se realizar biópsia excisional em toda lesão pigmentada suspeita.³⁶ A partir da espessura da lesão primária, deve-se realizar ampliação de margens da lesão primária conforme descrito na Tabela 2. A partir de 0,76 mm de índice de Breslow, deve-se realizar biópsia de linfonodo sentinela – em casos em que não há metástases regionais linfonodais ou à distância.³⁶

Na presença de metástases locorregionais ressecáveis, ou nos casos de micrometástases linfonodais (linfonodo sentinela positivo), a linfadenectomia deve ser indicada. Nos casos de metástases à distância, a ressecção cirúrgica deve ser avaliada caso a caso.³⁶

Tabela 2 - Margens de segurança recomendadas para melanoma de acordo com índice de Breslow.⁹

Índice de Breslow (mm)	Margem recomendada (cm)
<i>In situ</i>	0,5 – 1
0-1	1
1-2	1 ou 2*
2-4	2
> 4	No mínimo 2

* 1 em áreas restritas anatomicamente e 2 onde possível maior ampliação.

Os pacientes com melanoma em região de cabeça e pescoço possuem características peculiares, principalmente no que diz respeito à ampliação das margens de segurança. Em regiões como a face, nem sempre é possível a realização da recomendação ideal, por ocasionar mutilações cosmeticamente inaceitáveis.

Ainda que não seja praticado em todos os serviços, o estado da arte para estadiamento é a pesquisa de linfonodo sentinela para melanoma. O procedimento consiste na injeção de radioisótopo ao redor da lesão ou da

cicatriz resultante da biópsia excisional e na realização de linfocintilografia pré-operatória. O local de maior captação linfonodal é marcado na pele para a incisão. De oito a 24 horas após, o paciente é encaminhado ao centro cirúrgico, injeta-se o corante azul patente no mesmo local de injeção do radioisótopo e, com o auxílio de um “probe”, é possível realizar a pesquisa do linfonodo de maneira pouco invasiva. Esse linfonodo é retirado e enviado para estudo anatomopatológico em parafina, não sendo recomendado exame de congelação.³⁷

Com a pesquisa do linfonodo sentinela, foi possível definir quais pacientes realmente necessitariam de linfadenectomia. Mais do que isso, a identificação de um único linfonodo a ser analisado permitiu que os estudos de anatomia patológica fossem aprofundados, com a utilização de imuno-histoquímica e outros corantes, estudos esses não factíveis rotineiramente em uma linfadenectomia completa. No entanto, suas implicações no que diz respeito a prognóstico ainda são controversas. Os estudos multi-institucionais ainda são falhos em prever melhora na sobrevida quando da sua realização; ainda assim, a maioria dos autores acredita que o procedimento é benéfico – ainda que para estadiamento – e deve ser realizado para todos os pacientes com melanoma acima de 0,76 mm de índice de Breslow, ou abaixo se houver ulceração ou regressão, segundo a recomendação do Grupo Brasileiro de Melanoma.³⁸

A identificação do linfonodo sentinela na região de cabeça e pescoço é mais complexa, assim como ocorre com a ampliação das margens cirúrgicas. A existência de uma grande variação anatômica na drenagem linfática, além da

proximidade de estruturas nobres, faz com que o procedimento nem sempre seja isento de complicações, especialmente se realizado por cirurgiões pouco experientes. A injeção do radioisótopo perilesional por vezes é muito próxima do linfonodo sentinela, o que dificulta a localização pela cintilografia e pelo “probe”. Nesses casos, é necessária a retirada do tumor primário, retirando boa parte do volume de radioisótopo, facilitando a identificação do linfonodo sentinela.³⁹

Outro problema que merece menção é a pesquisa de linfonodo sentinela intraparotídeo, quando a identificação do nervo facial e a possível morbidade relacionada foi questionada por alguns autores.⁴⁰

A biópsia de linfonodo sentinela praticamente eliminou o esvaziamento eletivo em melanoma, realizado apenas em situações de exceção. Se houver micrometástases detectadas, procede-se ao esvaziamento linfonodal da cadeia em questão. O procedimento, no entanto, não está relacionado a ganho de sobrevida segundo estudos que compararam sua realização ao acompanhamento clínico.³⁷

Indica-se radioterapia para pacientes com metástases linfonodais após esvaziamento cervical e axilar. O melanoma tem resposta pobre à radioterapia, que não é indicada rotineiramente após ressecção de tumor primário, metástases linfonodais em outros sítios de drenagem ou metástases à distância.^{41, 42}

A quimioterapia clássica utilizada é com dacarbazina, com resultados desanimadores. A bioquimioterapia com interferon em altas doses, de morbidade elevada, foi o único tratamento que apresentou benefício em longo

prazo, caracterizado por aumento de sobrevida livre de doença, da ordem de meses, mas não por sobrevida global.⁴³

BIOLOGIA MOLECULAR

O melanoma representa um dos tumores mais estudados em relação ao seu comportamento biológico e sua biologia molecular. Algumas vias de sinalização descritas *in vitro* e *in vivo* em estudos sobre melanoma auxiliaram na descoberta da patogênese de outras neoplasias.

Os principais elementos estudados atualmente dizem respeito a :

- proliferação celular: a via de MAPK (“mitogen-activated protein kinase”), tem receptores conhecidos (VEGFR, c-KIT, c-MET, FGF-R, IGF-1R), com seus respectivos ligantes (VEGF, SCF, HGF, FGF e IGF-1), que ativam via de propagação de sinal, que, por sua vez, ativa o oncogene RAS²¹ e dá origem à ativação da MAPK, com consequências em múltiplos processos celulares como proliferação, diferenciação, angiogênese e sobrevida celular.²²

- sinalização antiapoptótica: a apoptose pode se iniciar por sinalização de receptor de membrana (FAS ou TRAIL), que leva à ativação de caspases, que, em última análise, levam a destruição de DNA; ou por via mitocondrial, com ativação de AKT e consequente ativação de caspase 3, que leva à degradação nuclear. Duas vias de sinalização são conhecidas e interferem nos dois processos, a via da MAPK, já descrita e a via PI3K/AKT.²³

- regulação da transcrição do melanócito: três receptores (endotelina, alfa-MSH e WNT) são capazes de disparar a transcrição do fator MITF, via adenilciclase, que é responsável pela ativação de diversos genes relacionados

à produção de melanina e sobrevivência celular. A transcrição do MITF, por sua vez, pode ser regulada por HGF, c-Kit e melanocortina. A E-caderina e beta-catenina estão envolvidas com a regulação da transcrição do MITF através do receptor WNT e participam também de outras vias de sinalização.^{24, 25} A importância da via do MITF tem sido comprovada e sua inibição é estudada como possível alvo molecular.²⁶

- cooperação entre as vias: a via de sinalização RAS/RAF/MAPK não age apenas na proliferação nem a via PI3K/AKT age apenas como antiapoptótica. São interligadas entre si e agem sinergicamente em alguns mecanismos oncogênicos. Ambas recebem também estímulos referentes a fatores de crescimento, como IGF-1 e VEGF.²³

CICLO CELULAR

O ciclo celular é dividido em quatro fases: G1 (“gap” 1), S (síntese), G2 (“gap” 2), M (mitose). As três primeiras fases reunidas compõem a intérfase. Durante a fase G1, há crescimento celular e preparo para a entrada na fase S, em que é realizada a síntese de DNA, com preparo para a divisão celular. A produção de microtúbulos é característica da fase G2, que representa a última etapa antes da mitose propriamente dita.²³

No processo de divisão celular, existem genes que inibem o processo de passagem da fase G1 para a fase S.⁴⁴ Esse processo foi denominado senescência celular, definido pela incapacidade da célula de dividir-se após certo número de divisões.⁴⁵ São fatores envolvidos na senescência celular os

genes supressores de tumor (como o que codifica a proteína Rb e o TP53). As proteínas codificadas por esses genes fazem com que a célula fique presa na fase G1, pelo reparo de DNA mutado, impedindo a divisão celular; ou induzem a apoptose. Eventualmente ambas as ações são realizadas.⁴⁶

Quando mutadas, entretanto, essas proteínas não agem corretamente e a célula entra em divisão sem controle, levando à formação de tumores.

A cascata que compõe a via da proteína Rb é iniciada pela proteína p16, codificada no locus CDKN2A, no gene 9p21. A proteína p16 inibe a ação da ciclina D1, que em conjunto com a CDK4 (ciclina dependente de quinase 4), promovem a fosforilação da proteína Rb, impedindo sua função protetora na progressão do ciclo celular.⁴⁷

Espera-se assim que a expressão de p16 em tumores seja indicativa de lesões iniciais, já que a proteína tem função protetora. Por outro lado, a expressão de ciclina D1 e de CDK4 mostra menos controle nesse processo e deve ser observada em lesões mais agressivas. Consequentemente, a pRb deve ser mais expressa em lesões menos agressivas e, por outro lado, lesões mais avançadas não devem apresentar expressão marcada da pRb. Essa condição das proteínas é observada na progressão da lesão pigmentada benigna para maligna e da fase de crescimento radial para vertical do melanoma.²³

O gene TP53, localizado em humanos no cromossomo 17p13, codifica a proteína supressora de tumor p53 que atua em diversos processos anti-oncogênicos: reparo de DNA, indução de apoptose, anti-angiogênese e “aprisionamento” da célula no ponto de regulação G1/S do ciclo celular (permitindo o reparo de DNA por mais tempo).⁴⁶

A proteína p21 é codificada por um gene denominado CDKN1A no cromossomo seis. Faz parte da cadeia do p53, sendo também uma proteína supressora de tumor. Quando a cadeia do p53 não a codifica, mais instável fica o ponto de regulação G1/S do ciclo celular, levando ao crescimento tumoral.^{45,46}

PROTEÍNAS DO CICLO CELULAR E MELANOMA

p16

A proteína p16, codificado pelo locus CDKN2A do gene 9p21, foi estudada quanto à sua expressão imuno-histoquímica em lesões melanocíticas em várias fases. Reed et al descreveram expressão de 100% em lesões benignas e melanomas não invasivos, com 48% de expressão homogênea em melanomas invasivos e 28% de expressão homogênea em metástases. Os autores concluíram que a perda da expressão da p16 esteve relacionada a tumores mais invasivos e metástases, e provavelmente não estaria relacionada com eventos iniciais do melanoma.⁴⁸

Em estudo finlandês, Talve et al encontraram positividade de p16 em 58% dos melanomas e em todos os nevos melanocíticos benignos. Houve relação estatisticamente significativa da perda de expressão com nível de Clark mais alto, e com índice de Breslow maior, sem significância estatística.⁴⁹ Esses achados foram confirmados por Alonso et al⁵⁰, em estudo espanhol com 39 marcadores e por Sparrow et al, em estudo australiano.⁵¹

Em estudo envolvendo 202 melanomas em fase vertical de crescimento e suas eventuais metástases, Straume et al demonstraram 45% de expressão

em tumores primários, que a perda da expressão nuclear do p16 foi relacionada com maior agressividade tumoral (incremento de expressão de Ki-67, marcador de proliferação), pior sobrevida e perda de expressão nas metástases.⁵² Wang et al, em estudo japonês envolvendo maioria de tumores acrais, encontraram positividade em 16% dos melanomas e 61% dos nevos.⁵³ A maior parte dos autores concorda com o padrão de perda de expressão relacionada a tumores mais espessos, mas esse dado não foi preditivo de sobrevida na maioria dos estudos.⁵⁴⁻⁵⁶

Há questionamentos envolvendo a expressividade da proteína p16 entre as diferentes populações do mundo. A expressão nuclear negativa do p16 foi relacionada com pior sobrevida em estudo envolvendo as populações equatoriana e italiana independentemente; no entanto, 85% dos tumores da série italiana apresentaram p16, que foi expressa em apenas 48,7% dos equatorianos. Ao menos em parte, os autores atribuíram tal diferença à heterogeneidade entre as amostras, com a população equatoriana apresentando tumores mais avançados. Concluíram enaltecendo o valor do p16 como fator prognóstico, independentemente de dados clínicos, histopatológicos ou geográficos.⁵⁷

A Tabela 3 mostra os estudos sobre p16 e sua relação com prognóstico:

Tabela 3 - Expressão de p16 em melanomas primários na literatura.

	p16	Prognóstico
Reed et al ⁴⁸	48%	Sem relação
Talve et al ⁴⁹	58%	Não estudado
Alonso et al ⁵⁰	89,9%	Pior com baixa expressão
Sparrow et al ⁵¹	92%	Não estudado
Wang et al ⁵³	16%	Não estudado
Funk et al ⁵⁴	33%	Não estudado
Sanki et al ⁵⁵	28,2%	Sem relação
Keller-Melchior et al ⁵⁶	59%	Não estudado
Sirigu et al ⁵⁷	67,0%	Pior com baixa expressão

CICLINA D1

A expressão de ciclina D1 no melanoma é mais marcada em melanomas acrais, sugerindo que essa é uma importante via em tumores que não tem relação com a exposição solar. Em uma série com 108 melanomas, foi observada expressão positiva para ciclina D1 em 29,6% dos casos, com 60% em melanomas acrais.⁵⁸

Em estudo envolvendo 172 melanomas primários e 73 metástases, a positividade encontrada para ciclina D1 foi de 62% nos primários e 29% nas metástases. Não houve relação da expressão da ciclina D1 com sobrevida global ou sobrevida livre de doença.⁵⁹ Não há nesse estudo a referência sobre a topografia do tumor.

Karim RZ et al, em recente estudo australiano, mostraram expressão diminuída de ciclina D1 em nevos benignos quando comparados com melanomas. No entanto, essa expressividade diminuiu nos melanomas mais espessos, sugerindo uma expressão fortemente marcada nas fases iniciais do melanoma. A redução na expressão de ciclina D1 nas amostras de melanoma foi relacionada com maior recorrência.⁶⁰

O padrão observado de pouca⁶¹ ou nenhuma expressão^{50,59} em nevos e marcada expressão em melanomas primários⁵⁹⁻⁶¹ é verificado em vários estudos (Tabela 4). Os autores que incluíram metástases nos estudos mostraram que a expressão de ciclina D1 é verificada em menor porcentagem em relação aos melanomas primários.⁶¹⁻⁶⁴

Tabela 4 - Expressão de ciclina D1 em melanomas primários na literatura.

	Ciclina D1	Prognóstico
Sauter et al ⁵⁸	29,6%	Não estudado
Florenes et al ⁵⁹	62,0%	Sem relação
Georgieva et al ⁶¹	14%	Não estudado
De Sá et al ⁶²	16%	Sem relação
Bachmann et al ⁶⁴	64%	Melhor com expressão
Alonso et al ⁵⁰	48%	Sem relação

Em resumo, a expressão de ciclina D1 apresenta-se reduzida ou ausente em nevos, aumentada em tumores primários iniciais e novamente diminuída quando se tornam mais espessos e em metástases. Os estudos que incluíram prognóstico são díspares quando relacionaram a expressão com sobrevida, fato possivelmente relacionado à amostra estudada: quando incluídos melanomas iniciais, a expressão relacionou-se com maior recorrência. ⁶⁰ Quando incluídos melanomas intermediários e metástases, a expressão relacionou-se com melhor prognóstico. ⁶⁴

CDK4

O acoplamento entre a ciclina D1 e a CDK4 é fator importante para a integridade do sistema supressor de tumor realizado pela proteína Rb. São poucos os estudos que utilizaram imuno-histoquímica para CDK4 em melanoma.

Bachmann et al, em estudo finlandês, mostraram expressão da CDK4 ligada a aumento de espessura e redução nas taxas de sobrevida. De fato, espera-se da CDK4 expressão mais pronunciada em fases mais avançadas do tumor primário. ⁶⁴ No entanto, Georgieva et al, em estudo alemão, encontraram

relativa uniformidade de expressão de CDK4 nas várias fases de lesões melanocíticas estudadas.⁶¹

De Sá et al encontraram positividade em 55,6% dos tumores primários, e 41,4% das metástases. Não houve, nesse estudo brasileiro, relação com prognóstico.⁶²

Curtin et al, estudando as mutações em BRAF e NRAS, verificaram que o gene que codifica CDK4 - mais frequentemente amplificados em melanomas acrais e de mucosa - poderia ser um oncogene independente na patogênese do melanoma.⁶⁵

Estes dados foram corroborados por um estudo genético, publicado em 2006, que trouxe à tona a discussão de que mutações no gene que codifica a CDK4 poderiam ter o mesmo papel da mutação do CDKN2A nesse processo.⁶⁶

PROTEÍNA Rb

A expressão da proteína Rb é considerada classicamente como um fator de proteção. Sua expressão estaria ligada à integridade do sistema que regula a senescência celular e impede o crescimento desenfreado. Nesse contexto, Tchernev et al mostraram em seu estudo envolvendo pacientes alemães com melanoma que a perda da expressividade da proteína Rb foi associada a pior evolução.⁶⁷

Korabiowska et al encontraram positividade em 100% dos nevos, 77% dos melanomas primários e 10% das metástases, havendo relação da expressão com melhor prognóstico.⁶⁸ A perda da expressão nas metástases parece ser ponto comum na maioria dos estudos.^{50, 60, 62, 68}

No entanto, a expressão de pRb não é frequente em lesões precursoras. Karim et al mostraram que a expressão da proteína Rb foi maior em melanomas que em nevos benignos ⁶⁰. No estudo de Alonso et al, não houve expressão de pRb em nevos. ⁵⁰

Em melanomas primários, a expressão de pRb variou entre 31,4% e 77% (Tabela 5). Embora para a maioria dos autores a expressão seja relacionada a melanomas iniciais, Alonso et al encontraram maior positividade em melanomas em fase vertical quando comparados a melanomas em fase radial de crescimento. ⁵⁰

Tabela 5. Expressão de pRb em melanomas primários na literatura.

	pRb	Prognóstico
Tchernev et al ⁶⁷	58%	Melhor com expressão
Korabiowska et al ⁶⁸	77%	Melhor com expressão
Alonso et al ⁵⁰	57,1%	Sem relação
De Sá et al ⁶²	31,4%	Sem relação
Bachmann et al ⁶⁴	56%	Não estudado

p53

Tanto a proteína p53 quanto a p21 são expressas em tumores agressivos, já que a reação imuno-histoquímica é positiva para a proteína mutada. No melanoma, no entanto, estudos não observaram padrão uniforme da expressividade da proteína p53. O gene que a codifica esteve mutado em apenas 9% dos melanomas ²³ e a proteína p53 esteve expressa numa proporção muito variável (8% a 86%) nas lesões dos diversos estudos. ^{50, 69-73}

Também é controversa a expressão em nevos melanocíticos. A proteína p53 foi expressa em 78% dos nevos no estudo de Alonso et al ⁵⁰ e não apresentou expressão no estudo de Li et al (0%). ⁶⁹ Ainda que essa variação,

ao menos em parte, possa estar relacionada a diferenças metodológicas entre os estudos⁷⁰, fica claro que a expressão do p53 é um evento complexo no estudo do melanoma.

Observa-se expressividade da proteína p53 em melanomas agressivos e iniciais, e sua relação com prognóstico é controversa entre os estudos: foi relacionada a pior prognóstico em alguns estudos^{67, 71, 72} e não apresentou relação com prognóstico em outros.^{50, 62, 73}

Em nosso meio, p53 foi expresso em 32,8% dos tumores primários e em 20,7% das metástases, sem relação com prognóstico.⁶² Alonso et al encontraram 92% de expressividade nas metástases estudadas.⁵⁰

Há autores que levantam a questão da expressão do p53 relacionada à topografia do melanoma. Dois estudos mostram maior positividade de p53 em melanomas de cabeça e pescoço quando comparados a melanomas de tronco.^{52, 70} Outros estudos não encontraram tal diferença.^{62, 72}

p21

O estudo da proteína p21 esteve em grande parte relacionada à descoberta de sua relação com p53. No entanto, conforme o conhecimento foi aprofundado, ficou claro que as expressões não eram necessariamente relacionadas.

Em estudo finlandês, envolvendo 369 melanomas primários, a expressão do p53 foi observada em 18% e a do p21 em 21% dos casos, mas a expressão de uma não estava relacionada à da outra.⁷² Fica evidente, no entanto, que a expressão do p21 está relacionada a fases mais avançadas do

tumor primário ⁵¹, já que a expressão foi baixa em nevos quando comparadas à expressão em melanomas ⁷⁴. Karjalainen et al observaram tendência da relação da expressão do p21 com sobrevida, mas não foi estatisticamente significativa. ⁷² Alonso et al encontraram expressão do p21 relacionada a pior sobrevida, analisando os melanomas em fase de crescimento vertical de sua casuística, em análise univariada. ⁵⁰

A frequência de expressão da proteína p21 variou entre 21 e 61% entre os estudos (Tabela 6). ^{50, 62, 72, 74, 75}

Como encontrado em outros marcadores, a expressão do p21 pode estar relacionada mais frequentemente a tumores primários e perder sua expressividade nas metástases. No entanto, a expressão nas metástases foi mais frequente que em tumores primários nos estudos de Alonso et al ⁵⁰ e Trotter et al ⁷⁴. Em nosso meio, foi observada expressão de p21 mais frequente em melanomas de espessura maior de 1 mm em relação aos de espessura menor, havendo expressividade em 36% dos tumores primários e 34% nas metástases. ⁶²

Tabela 6 – Expressão de p21 em melanomas primários na literatura.

	p21	Prognóstico
Alonso et al ⁵⁰	58%	Pior com expressão
De Sá et al ⁶²	36%	Sem relação
Maelandsmo et al ⁷⁵	35%	Não estudado
Karjalainen et al ⁷²	21%	Sem relação
Trotter et al ⁷⁴	56%	Não estudado

2) OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo são:

- verificar a frequência da expressão imuno-histoquímica de p16, ciclina D1, CDK4, pRb, p53 e p21 em amostras de melanoma de cabeça, pescoço e tronco pela técnica de “tissue micro-array”;
- relacionar a expressão das mesmas com prognóstico.

3) MÉTODOS

O estudo teve aprovação do Comitê de Ética para Análise em Projetos de Pesquisa (CAPPesq, protocolo de pesquisa nº0229/09) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em sessão de 06/05/2009 , e Bolsa de Estudo para Doutorado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

PESQUISA DOS DADOS DA CASUÍSTICA E DESENHO DO ESTUDO

Em etapa preliminar, foram investigados todos os 562 pacientes consecutivos atendidos por melanoma em consultório pela mesma equipe entre 1976 e 2009. Destes, 333 apresentaram tumor primário em região de cabeça e pescoço e tronco, 294 dos quais com diagnóstico até 2007 (dois anos de seguimento). Foi possível a obtenção dos blocos de parafina de 57 desses pacientes, 46 dos quais apresentaram material adequado para microdissecção, perfazendo o grupo a ser estudado.

Trata-se de estudo retrospectivo, longitudinal para a análise de ocorrência de metástases e sobrevida, transversal para as análises histopatológicas e imuno-histoquímicas.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Como critérios de inclusão, foram considerados a confirmação histopatológica de melanoma, topografia em região de cabeça, pescoço e tronco, sem metástases no momento do diagnóstico e tempo de seguimento

mínimo de dois anos na ausência de eventos desfavoráveis. Pacientes com eventos desfavoráveis foram incluídos independentemente do tempo de ocorrência do evento, desde que não apresentassem metástase no momento do diagnóstico.

Foram excluídos os pacientes com melanomas de membros, inclusive tipo acral lentiginoso e com tumor primário desconhecido. Foram excluídos os pacientes cujos blocos de parafina não foram localizados pelos laboratórios (281), que apresentavam menos de 2 anos de seguimento (39), que não concordaram em ceder o material para a pesquisa (1), que solicitaram o material para direcionar terapêutica experimental (1) ou cujo material não apresentava condições para realização das reações (11).

Os pacientes foram agrupados de acordo com a evolução:

- Grupo com evolução desfavorável: o diagnóstico de metástase linfonodal ou à distância por exame físico ou de imagem no seguimento, além de óbito relacionado a melanoma.
- Grupo com evolução favorável: ausência de metástases no seguimento pós tratamento do tumor primário, clínicas e em exames de imagem ou laboratoriais.

O seguimento dos pacientes foi realizado com exame físico, radiografia de tórax, ultrassonografia de abdome superior e DHL trimestralmente nos dois primeiros anos, semestralmente nos terceiro, quarto e quinto ano, e anualmente após o quinto ano. Exames como tomografias, ultrassonografias cervicais e ressonâncias magnéticas foram solicitadas apenas na suspeita clínica de metástases.

REVISÃO DE PRONTUÁRIOS E SEGUIMENTO

Foi realizada revisão de prontuários médicos de pacientes atendidos por melanoma, sendo utilizados os dados referentes a :

- identificação do paciente: gênero, idade ao diagnóstico. Os pacientes foram agrupados em grupos etários (acima ou abaixo de 65 anos).
- características clínicas: topografia do tumor primário (cabeça e pescoço ou tronco), tempo de evolução até evento desfavorável (metástase linfonodal, metástase à distância ou óbito relacionado), tempo de seguimento.
- características anatomopatológicas: tipo histológico (extensivo superficial, nodular, lentigo maligno melanoma), classificação de Clark e índice de Breslow, presença ou ausência de ulceração.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Cortes histológicos dos tumores corados pela técnica da hematoxilina e eosina foram analisados para o estudo morfológico dos padrões arquiteturais e celulares dos casos incluídos no estudo. Todos os casos foram revistos pela Dra Silvia Lourenço, no Laboratório de Imunopatologia da Faculdade de Medicina da USP.

CONFECÇÃO DO “TISSUE MICROARRAY” (TMA)

Para a confecção do TMA foi utilizado o aparelho “tissue microarrayer” (Beecher Instruments[®], Silver Spring, EUA). A área identificada no bloco doador foi puncionada em dois locais diferentes (selecionados previamente) com agulha de 1mm e os cilindros obtidos foram transferidos para o bloco receptor. O bloco foi então cortado e os cortes histológicos posicionados sobre lâminas específicas para a recepção de TMAs.

ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Cortes seriados de 4 μ m de cada TMA foram utilizados para a análise dos marcadores do ciclo celular do material contido nos TMAs. A análise imuno-histoquímica foi realizada por meio da técnica da fosfatase alcalina.

Os cortes de 4 μ m foram desparafinizados em dois banhos de xilol: o primeiro a 60°C por 30 minutos e o segundo à temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir, os cortes foram reidratados em cadeia descendente de etanol (100%, 95% e 85%) e imersos em solução de hidróxido de amônia a 10% durante 10 minutos para a remoção de pigmentos formólicos.

Após a lavagem em água corrente e água destilada, realizou-se incubação do material em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, com o intuito de bloquear a peroxidase endógena tecidual.

Repetida a lavagem com água corrente e água destilada, os cortes foram imersos duas vezes em solução de TRIS pH 7,4, por dois minutos cada. Em seguida, os cortes foram incubados com solução de 1% BSA (Sigma), 5%

SFB (Cultilab) em TRIS, pH 7,4, por 60 minutos, a fim de bloquear reações do soro primário com proteínas inespecíficas teciduais.

Em seguida, os cortes foram incubados com o soro primário diluído em solução de 1% BSA (Sigma) em TRIS pH 7,4. Informações sobre os anticorpos e etapas específicas do protocolo são descritas na Tabela 7.

Tabela 7 - Anticorpos, clones, fabricante e detalhes dos reagentes utilizados nas reações imuno-histoquímicas.

Soro primário	Clone	Fabricante	Título	Recuperação antigênica
p16	16P04	Labvision	1:40	Citrato pH 6,0
CDK4	SC-260	Biotechnology	1:200	Citrato pH 6,0
Ciclina D1	SP4	Neomarkers	1:200	Tris-EDTA pH 9,0
pRb	13A10	Novocastra	1:300	Citrato pH 6,0
p21	SX-18	Dako	1:50	Citrato pH 6,0
p53	DO-7	Dako	1:1000	Citrato pH 6,0

Os procedimentos posteriores foram sempre precedidos de duas lavagens em solução de “Tween” 20 a 1% em TRIS pH 7,4, durante cinco minutos cada.

Após a incubação com o anticorpo primário, os espécimes foram incubados com o reagente “En Vision” fosfatase alcalina (Dako Cytomation) por 30 minutos.

Para a reação de revelação, os espécimes foram incubados com o revelador permanente “Permanent Red” (Dako Cytomation), por três a 20 minutos, que evidenciou a reação por meio de coloração vermelha.

Os cortes foram lavados em tampão TRIS pH 7,4, água corrente e água destilada e contra-corados com hematoxilina de Carazzi por 10 minutos.

Posteriormente, os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanóis, diafinizados em três banhos de xilol, e montados em resina “permount” para o exame ao microscópio óptico.

Controles negativos das reações supracitadas foram realizados através da incubação de espécimes com soro não-imune substituindo o anticorpo primário. Controles positivos pertinentes foram incluídos de acordo com as especificações de cada anticorpo. Controles adicionais de pele normal e pele derivada de fetos humanos foram utilizados para controles da expressão dos marcadores em melanócitos normais.

As reações foram analisadas em microscópio óptico e os dados estudados de forma qualitativa.

Os dados foram fotografados com equipamento fotográfico digital acoplado a microscópio óptico convencional.

A leitura das lâminas foi realizada pela mesma patologista (Dra Sílvia Vanessa Lourenço), cuja análise foi cega com relação à evolução, sendo classificados os resultados como positivos se os núcleos das células do tumor se apresentassem corados pelos reagentes, conforme previamente descrito.⁴⁸

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram organizados e tabulados em planilhas com auxílio do programa Excel em Windows XP (Microsoft Corporation® California, USA).

As análises foram realizadas com o programa SPSS® versão 18.0 (SPSS® Inc; Illinois, USA).

O índice de Breslow foi apresentado descritivamente em tabelas contendo média, desvio padrão, mediana, valores mínimos e máximos. As distribuições foram avaliadas com o teste da soma de postos de Wilcoxon.

Foram construídas curvas segundo a técnica de Kaplan-Meier, que foram analisadas com o teste “log-rank”.

As variáveis classificatórias foram avaliadas com o teste de qui-quadrado, razão de verossimilhança ou teste exato de Fisher.

Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4) RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em duas etapas: descrição e análise da casuística; descrição e análise dos resultados referentes à imunoexpressão dos marcadores teciduais.

Na primeira etapa, além da descrição da casuística global de 46 pacientes, realizou-se a comparação dos dados da casuística entre os grupos com evolução favorável e desfavorável.

A análise imuno-histoquímica contempla também sua relação com os dados clínicos e histopatológicos.

RESULTADOS DESCRITIVOS RELATIVOS À CASUÍSTICA

Considerando todos os pacientes, a distribuição segundo o gênero mostrou que 31 (67,3%) dos pacientes eram homens e 15 (32,7%) eram mulheres. A média de idade ao diagnóstico foi de 57,7 ($\pm 15,8$) anos. A mediana foi de 56 anos, com mínima de 28 e máxima de 91 anos. Doze pacientes (26,0%) apresentaram idade ao diagnóstico superior a 65 anos.

A localização do tumor primário em topografia de cabeça e pescoço foi observada em 23 pacientes (50%), assim como em tronco (50%).

Em dois pacientes (4,3%) não foi possível obter a classificação de Clark e Breslow. A distribuição dos níveis de Clark pode ser observada na Figura 2.

Figura 2 - Frequência (em porcentagem) de pacientes com melanoma de cabeça, pescoço e tronco de acordo com a classificação de Clark.

A distribuição por tipo histológico pode ser observada na Figura 3.

Figura 3 – Distribuição (em porcentagem) por tipo histológico de melanomas de cabeça, pescoço e tronco.

A média dos índices de Breslow foi de 0,96 ($\pm 1,01$) mm. A classificação T (TNM 2010) pode ser observada na figura 4.

Figura 4 – Distribuição segundo a classificação T (em porcentagem) dos pacientes com melanoma de cabeça, pescoço e tronco (TNM 2010).

Três pacientes (6,5%) apresentaram ulceração do tumor primário. Dois casos tinham espessura entre 1,01 e 2,0mm (T2b) e um deles apresentava espessura de 3,25 mm (T3b). Nenhum dos outros 43 tumores primários era ulcerado (T1-4a).

O tempo de seguimento médio foi 70,4 (± 46) meses.

A evolução foi favorável para 38 pacientes (82,6%). Oito pacientes (17,4%) apresentaram evolução desfavorável, dos quais apenas dois permaneciam vivos com metástases até novembro de 2009. O tempo de aparecimento das metástases variou de quatro a 48 meses, com média de 20,1 ($\pm 13,4$) meses.

A Figura 5 mostra a evolução dos pacientes do estudo de acordo com o tempo de seguimento.

Figura 5 – Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença dos pacientes com melanoma de cabeça, pescoço e tronco.

Seis (75%) dos oito pacientes com evolução desfavorável eram homens. Não houve relação entre gênero e evolução (teste “log rank”, $p=0,63$).

No grupo de pacientes com mais de 65 anos, 33,3% apresentaram evolução desfavorável, enquanto que no grupo com menos de 65 anos, 11,7% apresentou evolução desfavorável (teste “log rank”, $p=0,06$). A relação entre os grupos etários e evolução pode ser observada na Figura 6.

Figura 6 – Comparação do tempo de sobrevida livre de doença entre os pacientes tratados por melanoma com idade acima e abaixo de 65 anos.

Seis (75%) pacientes com evolução desfavorável apresentaram seus tumores primários na região de cabeça e pescoço e dois (25%) em tronco (Figura 7). Essa diferença não foi estatisticamente significativa. (teste “log rank”, $p=0,12$).

Figura 7 – Comparação do tempo de sobrevivida livre de doença entre os pacientes tratados por melanoma em tronco e cabeça/pescoço.

Em relação ao tipo histológico, a distribuição entre as evoluções pode ser observada na Figura 8. Houve, proporcionalmente, maior número de casos de melanomas nodulares do que de extensivos superficiais com evolução desfavorável, porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa (teste “log rank”, $p=0,21$).

Figura 8 - Comparação da frequência de pacientes com melanoma segundo os tipos histológicos e evolução.

A relação do nível de Clark com a evolução pode ser observada nas Figuras 9 e 10.

Figura 9 – Comparação da frequência de pacientes com melanoma segundo os níveis de Clark e tipo de evolução.

Figura 10 – Comparação do tempo de sobrevida livre de doença entre os pacientes tratados por melanoma segundo os níveis de Clark.

A média dos índices de Breslow para os pacientes com evolução desfavorável foi de 1,51 ($\pm 1,04$) mm, enquanto a média para os pacientes com evolução favorável foi de 0,87 ($\pm 0,98$) mm. (teste Mann Whitney, $p=0,07$).

No que diz respeito à classificação T, a distribuição das evoluções pode ser observada na Figura 11.

Figura 11 – Comparação entre os grupos de pacientes com melanoma com evolução favorável e desfavorável, segundo a classificação T (TNM 2010).

Nenhum dos três pacientes com tumores ulcerados apresentaram evolução desfavorável (teste “log rank”, $p=0,44$).

ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

p16

A expressão do p16 foi positiva em 82,5% da amostra (Figura 12).

Figura 12 - Fotomicrografia de melanomas com imuno-histoquímica positiva para p16.

Em todos os oito pacientes com evolução desfavorável houve positividade para o p16 (100%). Dos pacientes com evolução favorável, o p16 foi expresso em 78,1%. Essa diferença não foi estatisticamente significativa (teste “log rank”, $p=0,15$). A relação da expressão do p16 com a evolução pode ser observada na Figura 13.

Figura 13 – Comparação do tempo de sobrevida livre de doença entre os pacientes tratados por melanoma segundo a expressão de p16.

Houve mais lesões primárias com expressão positiva para p16 com índice de Breslow mais elevado, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa (teste de Mann-Whitney, $p=0,21$). A relação entre a expressão de p16 com o índice de Breslow pode ser observada na Figura 14.

Figura 14 – Comparação dos índices de Breslow e expressão de p16 dos pacientes tratados por melanoma.

Os parâmetros clínico-patológicos e sua relação com os fatores imuno-histoquímicos estudados estão representados no anexo B. Não houve relação estatisticamente significativa da expressão de p16 com gênero, idade, topografia, ulceração, tipo histológico e níveis de Clark.

Ciclina D1

Houve positividade para ciclina D1 em 58,9% da amostra (Figura 15).

Figura 15 - Fotomicrografia de melanomas com imuno-histoquímica positiva para ciclina D1.

Houve expressão em 75% dos casos com evolução desfavorável e 64,2% dos casos com evolução favorável, diferença que não foi estatisticamente significativa (teste “log rank”, $p=0,61$). A relação da expressão de ciclina D1 com a evolução pode ser observada na Figura 16.

Figura 16 – Comparação do tempo de sobrevivência livre de doença entre os pacientes tratados por melanoma segundo a expressão de ciclina D1.

A relação entre a expressão de ciclina D1 com índice de Breslow pode ser observada na Figura 17. Houve mais tumores com expressão imunohistoquímica de ciclina D1 em pacientes com índice de Breslow mais elevado (teste de Mann-Whitney, $p=0,001$).

Figura 17 – Comparação dos índices de Breslow e expressão de ciclina D1 dos pacientes tratados por melanoma.

Houve mais expressão de ciclina D1 em melanomas de tronco, conforme mostra a figura 18. (teste de qui-quadrado, $p=0,03$)

Cabeça e Pescoço

Tronco

Figura 18 – Comparação da expressão de ciclina D1 em melanomas segundo a topografia da lesão primária.

Houve mais expressão de ciclina D1 em melanomas com nível de Clark mais elevado (teste de razão de verossimilhança, $p=0,0001$). Não houve relação estatisticamente significativa da expressão de ciclina D1 com gênero, ulceração, tipo histológico e idade.

CDK4

A positividade para CDK4 foi observada em 43,5% do total da amostra.
(Figura 19).

Figura 19 - Fotomicrografia de melanomas com imuno-histoquímica positiva para CDK4.

A relação da expressão de CDK4 com a evolução pode ser observada na Figura 20. Entre os pacientes de evolução desfavorável a positividade foi de 62,5%, havendo positividade em 38,2% dos com evolução favorável (teste “log rank”, $p=0,19$).

Figura 20 - Comparação do tempo de sobrevida livre de doença entre os pacientes tratados por melanoma segundo a expressão de CDK4.

A relação entre a expressão CDK4 com índice de Breslow pode ser observada na Figura 21. Houve maior expressão de CDK4 em pacientes com índice de Breslow mais elevado (teste de Mann-Whitney, $p=0,041$).

Figura 21 – Comparação dos índices de Breslow e expressão de CDK4 dos pacientes tratados por melanoma

Houve relação estatisticamente significativa da expressão de CDK4 com Clark mais elevado (teste de razão de verossimilhança, $p=0,0001$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre expressão de CDK4 e gênero, topografia, ulceração, tipo histológico e idade.

Proteína Rb

A proteína Rb foi expressa em 58,5% do total da amostra. (Figura 22)

Figura 22 - Fotomicrografias de melanomas com reação imuno-histoquímica positiva para pRb.

A relação entre a expressão de pRb e evolução pode ser observada na Figura 23. Entre os casos com evolução desfavorável, houve 75% de positividade. Houve 57,5% de positividade entre os casos com evolução favorável. Essa diferença não foi estatisticamente significativa (teste “log rank”, $p=0,39$).

Figura 23 - Comparação do tempo de sobrevida livre de doença entre os pacientes tratados por melanoma segundo a expressão de pRb

A relação entre a expressão pRb com índice de Breslow pode ser observada na Figura 24. Houve tendência estatística para maior expressão de pRb em pacientes com índice de Breslow mais elevado (teste de Mann-Whitney, $p=0,076$).

Figura 24 – Comparação dos índices de Breslow e expressão de pRb dos pacientes tratados por melanoma.

Não houve relação estatisticamente significativa da expressão de pRb com gênero, idade, topografia, ulceração, tipo histológico e níveis de Clark.

p53

A expressão do p53 foi positiva em 53,6% da amostra (Figura 25).

Figura 25 - Fotomicrografias de melanomas com reação imuno-histoquímica positiva para p53.

A relação entre expressão de p53 e evolução pode ser observada na Figura 26. Entre os pacientes com evolução desfavorável, observamos positividade em 62,5%; entre os com evolução favorável, 54,5% das amostras

foi positiva. Essa diferença não foi estatisticamente significativa (teste “log rank”, $p=0,68$).

Figura 26 - Comparação do tempo de sobrevida livre de doença entre os pacientes tratados por melanoma segundo a expressão de p53.

A relação entre a expressão p53 com índice de Breslow pode ser observada na Figura 27. Não houve diferença estatisticamente significativa entre expressão de p53 e índice de Breslow (teste de Mann-Whitney, $p=0,21$).

Figura 27 – Comparação dos índices de Breslow e expressão de p53 dos pacientes tratados por melanoma.

Não houve relação estatisticamente significativa da expressão de p53 com gênero, idade, topografia, ulceração, tipo histológico e níveis de Clark.

p21

Houve expressão positiva de p21 em 52,3% da amostra. (Figura 28)

Figura 28-Fotomicrografias de melanomas com reação imuno-histoquímica positiva para p21.

A relação entre a expressão de p21 e evolução pode ser observada na Figura 29. Dos indivíduos com evolução desfavorável, houve positividade em 87,5%, enquanto que a expressão foi positiva em 47,0% dos com evolução

favorável. Essa diferença foi estatisticamente significativa (teste “log rank”, $p=0,03$).

Figura 29 - Comparação do tempo de sobrevida livre de doença entre os pacientes tratados por melanoma segundo a expressão de p21.

A relação entre a expressão de p21 com índice de Breslow pode ser observada na Figura 30. Houve maior expressão de p21 em pacientes com índice de Breslow mais elevado (teste de Mann-Whitney, $p=0,018$).

Figura 30 – Comparação dos índices de Breslow e expressão de p21 dos pacientes tratados por melanoma.

Houve relação estatisticamente significante da expressão de p21 com Clark mais elevado (teste de razão de verossimilhança, $p=0,02$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre expressão de p21 e gênero, topografia, ulceração, tipo histológico e idade.

ANÁLISE MULTIVARIADA

Foi realizada análise multivariada incluindo idade, índice de Breslow e expressão imuno-histoquímica de p21. Nenhum dos fatores mostrou-se independente como preditor de evolução desfavorável.

5) DISCUSSÃO

O melanoma é uma doença prevalente em pessoas de pele clara, países desenvolvidos e de alto poder aquisitivo. Diferentemente de outras neoplasias tratadas pela Cirurgia de Cabeça e Pescoço, a doença tem espaço na mídia e dispõe de vultoso financiamento internacional para pesquisa.

Muito embora apresente taxas de incidência e mortalidade elevadas no assim chamado primeiro mundo, o conhecimento médico atual é incapaz de curar a imensa maioria dos pacientes com metástases. O conhecimento acerca de sua patogênese e evolução representa o meio de transporte mais promissor na tentativa de percorrer essa difícil estrada em direção à cura.

AMOSTRA

Esse estudo representa uma seleta parcela de portadores de melanoma tratados adequadamente pela mesma equipe em um único consultório privado em São Paulo. Não houve, para esse grupo, nenhuma restrição no que diz respeito a acesso a exames, cirurgias ou atendimento. Nenhum desses pacientes apresentou tratamento inadequado desde o momento de seu diagnóstico. Também não houve nenhum caso de perda de seguimento ou de dúvidas a respeito de evolução.

Se, por um lado, não existe viés no que diz respeito aos dados clínicos, tratamento adequado e seguimento, um grande problema foi enfrentado quando da realização do trabalho: poucos são os laboratórios em São Paulo que possuem um sistema de arquivos adequado e que guardam os blocos de parafina por mais de cinco anos. Sob a justificativa de que a legislação só

obriga que os blocos sejam guardados por cinco anos (RESOLUÇÃO CFM nº 1472 /97) a maioria dos laboratórios simplesmente despreza o material. Dessa forma, mais de 250 casos de melanomas axiais, que poderiam fazer parte desse estudo, foram perdidos.

Ainda que, pelos motivos relatados, o número de casos seja reduzido, a amostra ainda é bastante significativa, composta exclusivamente por melanomas de cabeça, pescoço e tronco. A exclusão dos melanomas não axiais elimina outro viés comum presente em outros estudos, já que os melanomas de extremidades apresentam prognóstico melhor do que os melanomas axiais.¹⁴ Assim, o presente estudo apresenta-se como único na literatura brasileira ao reunir casuística selecionada e tratada adequadamente pela mesma equipe.

CASUÍSTICA

GÊNERO

Os dados demográficos a respeito de gênero e idade são compatíveis com os achados da maior parte dos autores. A incidência de melanoma entre os sexos é relativamente igualitária, havendo países em que as mulheres apresentam maior incidência, como Reino Unido; e regiões onde a maior incidência é masculina, como a Austrália.³² As estimativas de incidência para 2008 no Brasil mostram pequeno predomínio feminino. Em nossa casuística, houve predomínio masculino. Isso provavelmente se deve ao fato de que melanomas de tronco são mais frequentes em homens, enquanto melanomas

em membros - que foram excluídos do estudo - são mais frequentes em mulheres.³² O gênero masculino apresenta pior prognóstico do que melanoma em mulheres.¹⁴ Não houve, em nossa casuística, diferença estatística entre a evolução dos diferentes gêneros.

IDADE

A idade de diagnóstico do melanoma tem relação com o prognóstico, sendo que, quanto maior a idade, pior a sobrevida.¹⁴ Em nosso estudo, a média de idade ao diagnóstico foi onze anos maior nos pacientes que apresentaram evolução desfavorável, o que apresentou tendência a significância estatística ($p=0,06$). A inclusão da idade avançada no TNM do melanoma tem sido discutida nos congressos sobre o tema e pode ser novidade nas próximas publicações.

TOPOGRAFIA

Sabe-se que os melanomas de membros têm melhor prognóstico.¹⁴ Nesse estudo, procuramos limitar a amostra aos melanomas axiais para evitar viés. O número igualitário entre tumores de cabeça, pescoço e tronco não foi proposital e não apresentou diferença estatística em relação à evolução, muito embora a maior parte dos pacientes com evolução desfavorável tenha sido do grupo com tumores em cabeça e pescoço.

TIPO HISTOLÓGICO

Dos quatro tipos histológicos mais importantes, foram excluídos os melanomas acrais desde o desenho do estudo. A maior parte dos tumores foi extensivo superficial, quase três vezes mais frequente que os nodulares. Essa distribuição é provavelmente relacionada ao fato de que a casuística é de um consultório, diferente das séries de instituições de ensino brasileiras, que apresentam casos mais avançados.⁷⁶

Proporcionalmente, houve mais casos com evolução desfavorável no grupo de melanomas nodulares, em relação ao grupo de extensivo superficial, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa.

CLARK E BRESLOW

A maior parte dos tumores tem classificação de Clark I, II ou III, corroborando a análise anterior. Não houve, nessa casuística, nenhum caso de melanoma com índice de Clark V. Todos os casos com evolução desfavorável apresentaram Clark III ou IV.

No que diz respeito à classificação de Breslow, a frequência de tumores abaixo de 2mm de espessura (in situ, T1 ou T2) chegou a mais de 80% da amostra. Fator mais importante no prognóstico do melanoma, em nosso estudo houve tendência, mas não significância estatística na comparação das amostras dos grupos com evolução favorável e desfavorável, provavelmente devido ao pequeno número de casos.

ULCERAÇÃO

Um dos fatores mais importantes para o prognóstico do melanoma é a ulceração. Desde a publicação do TNM 2002 pela AJCC ¹⁵, a ulceração ocupa papel de destaque nas análises de prognóstico. Em nosso estudo, no entanto, houve apenas três casos com ulceração – nenhum deles apresentou evolução desfavorável.

TEMPO DE SEGUIMENTO

O tempo médio de seguimento foi acima de cinco anos. No desenho do estudo, foram incluídos pacientes com no mínimo dois anos de seguimento (pacientes com evolução favorável). Esse cuidado certamente valoriza o estudo, já que houve paciente que apresentou metástase apenas após o quarto ano de seguimento. A maioria dos pacientes apresenta nos primeiros dois anos. ¹⁴

IMUNO-HISTOQUÍMICA

A análise imuno-histoquímica por “tissue microarray” é um método que permite a análise simultânea de centenas de casos em uma única lâmina. Cada bloco de parafina é microdissecado, selecionado o tecido que se quer estudar e transposto para um novo bloco, que se torna um grande arquivo e

pode gerar várias lâminas, permitindo vários estudos. O método foi descrito em 1998 e validado para o estudo de melanoma em 2004.⁷⁷

A técnica tem como vantagens a economia de reagentes e o fato de evitar artefatos de reações - já que todos os casos passam pelo mesmo processo simultaneamente.

p16

O p16INK4A é um gene supressor de tumor e o locus gênico que o codifica está mutado em boa parcela dos pacientes com melanoma familiar²⁷. O conhecimento acerca dessa mutação trouxe avanços no conhecimento da patogênese do melanoma. A proteína p16 é expressa em nevos e melanomas iniciais, havendo perda de sua expressão em melanomas mais avançados e metástases.⁴⁸ Em nosso estudo, em que a maioria dos melanomas é inicial, fica claro que sua expressão é extremamente prevalente, havendo positividade em 80% da amostra total e na totalidade dos casos com evolução desfavorável. Esse resultado mostra como a participação da proteína p16 foi importante na patogênese do melanoma dessa amostra de pacientes. Não temos o estudo das famílias desses pacientes, mas podemos inferir que alguns deles possam ter a mutação constitucional do p16INK4A, o que aumentaria sobremaneira a sua probabilidade de ter um novo melanoma³². Se por um lado a proteína p16 foi tão importante na patogênese dessa amostra, do ponto de vista discriminativo entre a evolução favorável e desfavorável, a expressão do marcador não foi efetivo.

Quando analisados todos os marcadores estudados, a proteína p16 não estava expressa em alguns tumores *in situ*, que também não apresentaram expressão de nenhum outro marcador. Houve dois casos de não expressão do p16 e expressão de outros marcadores, a saber – um caso com expressão apenas de ciclina D1 e outro com expressão de ciclina D1 e CDK4. Do ponto de vista teórico essa combinação faz sentido e denotaria um tumor com agressividade maior, já que apresentaria os marcadores de maior agressividade e não os supressores de tumor dessa cadeia (p16 negativo, ciclina D1 e CDK4 positivos, pRb negativo). No entanto, esses dois casos apresentaram evolução favorável.

Não houve, em nossa amostra, uma clara correlação de melanomas mais espessos com a perda de expressão do p16, como reportado por alguns autores.^{50,57} Ao contrário, houve relação da expressão de p16 com maior espessura tumoral, ainda que não estatisticamente significativa ($p=0,21$), fato possivelmente relacionado à composição da amostra estudada, com boa parte de melanomas iniciais. Tampouco houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão de p16 e os fatores clínicos e histopatológicos. Talvez os casos mais avançados de nossa amostra não fossem tão tardios a ponto de perderem a expressão de p16. Não houve relação estatisticamente significativa com prognóstico ($p=0,18$), mas é notável que todos os pacientes com evolução desfavorável tenham expressado p16.

CICLINA D1

A expressão de ciclina D1, importante marcador da regulação da entrada na fase S por permitir a fosforilação da pRb, acompanha geralmente os tumores mais agressivos. Foi mais expressa em tumores com evolução desfavorável do que com evolução favorável, mas essa diferença em nossa amostra não foi estatisticamente significativa. Outros autores também mostram que, apesar de mais expressa em tumores com índice de Breslow mais elevado, essa expressão não configura evolução desfavorável ^{50, 59, 62}. Bachmann et al encontraram evolução favorável com maior expressão de ciclina D1. ⁶⁴ Interessante notar também que a expressão de ciclina D1 esteve relacionada a índices de Clark mais elevados.

Merece atenção especial a ocorrência de expressão de ciclina D1 mais elevada em melanomas de tronco quando comparada a localização da lesão primária em cabeça e pescoço. Tal observação pode levantar a hipótese de que a exposição solar diferenciada (cronicamente em região de cabeça e pescoço e intermitente/recreacional em tronco, área não exposta) possa levar a diferentes vias patogênicas do desenvolvimento do melanoma.

Em estudo que envolveu 39 marcadores e 165 melanomas, Alonso et al enfatizam a importância da ciclina D1, que não foi expressa em nevos e sim em melanomas em fase radial de crescimento, havendo positividade também em metástases, ainda que não tão frequente. ⁵⁰ Em nosso estudo pudemos observar que a ciclina D1 apresentou pouca expressão em lesões *in situ* e foi expressa em tumores mais invasivos. Essa diferença foi notável em nosso

estudo e apresentou significância estatística ($p=0,001$), confirmando outros estudos.⁵⁹⁻⁶¹

CDK4

Não são numerosos os estudos envolvendo melanomas e expressão imuno-histoquímica de CDK4. Isso possivelmente se deve ao fato de que a expressão de ciclina D1 geralmente acompanha a expressão de CDK4 e que o primeiro marcador é dado como mais importante por alguns autores. No entanto, estudos mais recentes mostram a importância do gene que codifica a proteína CDK4, mutado em algumas famílias com síndrome do melanoma familiar e que não apresentam mutação do CDKN2A^{65, 66} (locus gênico mais estudado, que codifica o p16). As novas informações devem incluir a CDK4 como marcador importante nos estudos a serem realizados.

Em nossa casuística houve expressão em menos da metade dos melanomas e em cerca de dois terços dos melanomas com evolução desfavorável. Muito embora não tenha apresentado significância estatística ($p=0,19$), a expressão de CDK4 foi mais frequente nos casos com evolução desfavorável. Sua expressão foi acompanhada da expressão de ciclina D1 em cerca de 70% dos casos, mas a expressão de ciclina D1 sem a expressão de CDK4 esteve presente em quase metade dos casos ciclina D1 positivos. Isso deve ser explicado pelo acoplamento de ciclina D1 com outras CDKs, como a CDK2 e a CDK6, que podem realizar o papel da CDK4 nesse processo. De fato, não houve expressão maior de CDK4 em melanomas de tronco, como ocorreu com a expressão de ciclina D1.

Alternativamente, poderíamos supor que a expressão de ciclina D1 seria um passo anterior à expressão de CDK4 de acordo com a evolução do tumor. Corroborando tal suposição, todos os casos em que a expressão de ciclina D1 não foi acompanhada de CDK4 tiveram índice de Breslow igual ou inferior a 2 mm.

A expressão de CDK4 também foi relacionada a maior índice de Breslow, com significância estatística em nosso estudo ($p=0,04$), confirmando achados de Bachmann et al.⁶⁴ e discordando do estudo de Georgieva et al.⁶¹ Também observamos índices de Clark mais elevados com a expressão de CDK4.

PROTEÍNA Rb

A proteína Rb é classicamente conhecida como “protetora”, já que se trata de uma proteína supressora de tumor e é, em última análise, o último passo na regulação do ponto de entrada da fase G1 para a fase S. No entanto, o significado de sua expressão é controverso entre os autores. Tchernev et al mostraram perda de expressividade em melanomas com maior espessura e pior evolução⁶⁷. No entanto, Karim et al mostraram maior expressividade em melanomas com prognóstico pior, fato que o próprio autor classificou como surpreendente e sugeriu que o anticorpo poderia ter uma reação cruzada com pRb já fosforilada e não com a do tipo selvagem, que seria protetora.⁶⁰ Em nossos achados, também encontramos maior expressividade nos casos com

evolução desfavorável (sem significância estatística) e em melanomas com maior espessura, com valor de $p=0,07$. Nossos dados são concordantes com o estudo de Karim et al ⁶⁰ e de Alonso et al ⁵⁰, e discordantes dos de Tchernev et al ⁶⁷ e Korabiowska et al. ⁶⁸

p53

A expressão de p53 no melanoma não é claramente ligada a pior prognóstico como é para outros tumores. Expressa quando mutada, sua expressão seria em teoria ligada a maior invasão e pior prognóstico. No entanto, a expressão de p53 em melanomas é baixa. Em estudo envolvendo duas populações distintas – equatoriana e italiana - Sirigu et al mostraram expressão de 12,3% da proteína p53. ⁵⁷

De Sá et al encontraram positividade de 32%⁶². Em nosso estudo encontramos expressão em mais da metade dos pacientes e maior expressão em pacientes com evolução desfavorável, sem significância estatística. Também não houve relação da espessura tumoral (índice de Breslow) com expressão de p53 ($p=0,21$) em nosso estudo. O papel da expressão do p53 não ficou clara em nosso estudo, confirmando o achado de outros autores que também não encontraram relação com espessura e prognóstico. ^{50, 62, 73}.

p21

A proteína p21 é uma ciclina quinase dependente expressa após a mutação do p53 ⁷⁵. Expressa quando mutada, sua expressão é esperada em melanomas mais agressivos e de pior evolução. No entanto, estudos questionam essa ligação da proteína p21 com a mutação do p53. Aventa-se que haveria outras vias interligadas que promoveriam a mutação do p21, já que a via do p53 não explicaria sua mutação na totalidade dos casos. ⁷²

A expressão do p21 encontrada em estudo finlandês foi de 21% ⁷² e em nosso meio de 36%. ⁶² Os estudos anteriores mostram expressividade maior relacionada com aumento de espessura, mas não relacionada a pior prognóstico. Maelandsmo et al encontraram expressão em mais de 5% das células em 35% dos melanomas primários, com redução dessa expressão em metástases. ⁷⁵

Em nosso estudo, fica clara a importância do p21 como marcador de melanomas em estágios mais avançados, uma vez que o marcador se relacionou a índices de Clark ($p=0,02$) e Breslow maiores ($p=0,018$); e a evolução desfavorável. Em análise univariada, a expressão do p21 em melanomas de cabeça, pescoço e tronco foi relacionada com evolução desfavorável ($p=0,03$). Em análise multivariada, a expressão de p21 não se mostrou independente das outras variáveis pesquisadas.

Não encontramos, na literatura pesquisada, nenhum artigo que tenha relacionado a expressão positiva do p21 em melanomas primários com piora na sobrevida, independentemente de sua fase de crescimento. O estudo de Alonso et al mostra piora na sobrevida relacionada à expressão do p21, mas

incluiu na análise de sobrevida apenas pacientes com melanomas em fase vertical de crescimento, sabidamente de pior prognóstico. Nessa análise, foram incluídos 60 amostras de um total de 175.⁵⁰ Em nosso estudo, todos os pacientes da amostra foram incluídos, não havendo seleção para análise estatística.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Acreditamos que esse achado seja fundamental no planejamento de novos estudos. Certamente foi ultrapassado mais um obstáculo na direção do conhecimento da patogênese, foi estudada a importância de fatores que podem auxiliar na predição do prognóstico dos pacientes com essa neoplasia e é mais uma contribuição científica para que conheçamos, um dia quem sabe, o tratamento definitivo para os pacientes com melanoma.

6) CONCLUSÕES

A expressão da proteína p16 foi de 82,5% nos melanomas da amostra; houve positividade na expressão de ciclina D1 em 58,9%; a CDK4 foi expressa em 43,5%; a proteína Rb mostrou expressão imuno-histoquímica em 58,5%. A proteína p53 esteve expressa em 53,6% e a proteína p21 foi expressa em 52,3% dos melanomas.

Houve relação com prognóstico relacionada à expressão de p21 em análise univariada. A expressão das proteínas p16, ciclina D1, CDK, pRb e p53 não foi relacionada ao prognóstico.

ANEXO A

Estadiamento TNM para o melanoma cutâneo (AJCC 2010)

Estádio T	Espessura do tumor (mm)	Ulceração
T1	= 1.0	A – sem ulceração e índice mitótico <1 B – com ulceração e índice mitótico >1
T2	1.01 – 2.0	A – com ulceração B – sem ulceração
T3	2.01 – 4.0	A – com ulceração B – sem ulceração
T4	> 4.0	A – com ulceração B – sem ulceração
Estádio N	Número de linfonodos metastáticos	Massa metastática linfonodal
N1	1 linfonodo	A – micrometástase * B - macrometástase†
N2	2-3 linfonodos	A – micrometástase* B - macrometástase† C – metástase satélite ou em trânsito sem linfonodos metastáticos
N3	4 ou mais linfonodos metastáticos, linfonodos metastáticos coalescentes, metástase em trânsito com linfonodos metastáticos	
Estádio M	Local	DHL sérico
M1a	Pele à distância, subcutâneo, ou metástase linfonodal	Normal
M1b	Metástase pulmonar	Normal
M1c	Todas as outras metástases viscerais	Normal Elevada
	Qualquer metástase à distância	

* diagnosticadas após pesquisa de linfonodo sentinela ou linfadenectomia eletiva.

† definidas como linfonodo metastático clinicamente confirmado por linfadenectomia terapêutica ou quando a metástase linfonodal exhibe extravasamento extracapsular grosseiro.

Estádios clínicos do melanoma cutâneo (TNM, AJCC 2010)

Estádio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
Ia	T1a	N0	M0
Ib	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
IIa	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
IIb	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
IIc	T4b	N0	M0
IIIa	T1-4a	N1a	M0
	T1-4a	N2a	M0
IIIb	T1-4b	N1a	M0
	T1-4b	N2a	M0
	T1-4a	N1b	M0
	T1-4a	N2b	M0
	T1-4a/b	N2c	M0
IIIc	T1-4b	N1b	M0
	T1-4b	N2b	M0
	Qualquer T	N3	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M +

ANEXO B

Associação entre expressão de p16, ciclina D1, CDK4, pRb, p53 e p21 e os parâmetros clínico- patológicos												
	p16 Neg (%) p	Pos (%)	Ciclina D1 Neg (%) p	pos (%)	CDK4 Neg (%) p	pos(%)	pRb Neg (%) p	pos (%)	p53 Neg (%) p	pos (%)	p21 Neg (%) p	pos (%)
Gênero												
Feminino	3 (25)	9 (75)	5(55,6)	4(44,4)	6 (46,2)	7 (53,8)	6 (50)	6 (50)	8 (66,7)	4 (33,3)	7 (50)	7 (50)
Masculino	4 (14,2)	24 (85,8)	7(25,9)	20(74,1)	18 (62,1)	11 (37,9)	10 (34,5)	19 (65,5)	10 (34,5)	19 (65,5)	12 (42,9)	16 (57,1)
	0,41		0,126		0,335		0,485		0,059		0,661	
Topografia												
Cabeça e Pescoço	08 (57)	06 (43)	9 (50)	9 (50)	10 (47,6)	11 (52,4)	9(45)	11(55)	9(47,4)	10(52,6)	11(50)	11(50)
Tronco	04 (50)	17 (50)	3 (16,7)	15 (83,3)	14 (66,7)	7 (33,3)	7(33,3)	14(66,7)	9(40,9)	13(59,1)	8(40)	12(60)
	1.00		0,034		0,212		0,444		0,678		0,516	
Ulceração												
Sem	06(16,2)	31(83,8)	11 (33,3)	22 (66,7)	23 (59)	16(41)	15(39,5)	23 (60,5)	17(44,7)	21 (55,3)	18(46,2)	21 (53,8)
Com	01(33,3)	02(66,7)	1 (33,3)	2 (66,7)	1(33,3)	2(66,7)	1 (33,3)	2 (66,7)	1 (33,3)	2 (66,7)	1 (33,3)	2 (66,7)
	0,448		1.00		0,567		1,000		1,000		1,000	
Tipo histológico												
Ext superficial	6 (23,1)	20 (76,9)	8 (34,8)	15 (65,2)	16 (59,3)	11 (40,7)	9 (34,6)	17 (65,4)	11 (40,7)	16 (59,3)	13 (48,1)	14 (51,9)
Nodular	1 (8,3)	11 (91,7)	3 (25)	9 (75)	6 (46,2)	7 (53,8)	5 (38,5)	8 (61,5)	5 (41,7)	7 (58,3)	4 (30,8)	9 (69,2)
Lentigo	0 (0)	02 (100)	1 (100)	0	2(100)	0	2 (100)	0	2 (100)	0	2 (100)	0
	0,34		0,27		0,232		0,137		0,180		0,111	
Clark												
I	3 (30)	7 (70)	8 (80)	2 (20)	9(81,8)	2(18,2)	6 (60)	4(40)	7 (63,6)	4(36,4)	10 (83,3)	2(16,7)
II	1 (25)	3 (75)	1 (33,3)	2 (66,7)	3(100)	0	3(60)	2(40)	1(25)	3(75)	1(33,3)	2(66,7)
III	2 (12,5)	14(87,5)	0	13(100)	6(37,5)	10(62,5)	3(20)	12(80)	4(26,7)	11(73,3)	4(26,7)	11(73,3)
IV	1 (12,5)	7 (87,5)	2 (25)	6(75)	5 (50)	5(50)	3(33,3)	6(66,7)	5(55,6)	4(44,4)	4(40)	6(60)
V	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,981		0,0001		0,028		0,150		0,192		0,02	
Idade												
	48 ± 8	57 ± 15	60,1 ± 13,1	53,2 ±15,3	59,5 ± 14,3	55,7± 18,8	55,9±13,2	56,2±16,8	58±16,5	55,8±15,4	60,3±15,9	56,1±16,4
	0,145		0,188		0,464		0,958		0,667		0,405	

Dados demográficos, clínico-patológicos e imuno-histoquímicos dos casos estudados

Caso	idade	genero	evolução	tempo seg	topografia	tipo histol	Clark	Breslow	ulceração	p16	ciclinaD1	CDK4	pRb	p53	p21
1	39	M	0	144	TRONCO	ES	III	1,3	0	1	1	1	1	1	1
2	37	M	0	108	TRONCO	ES	III	1,5	1	1	1	1	1	1	1
3	53	F	0	156	TRONCO	L	I	0	0	1	0	0	0	0	0
4	58	M	1	4	TRONCO	N	IV	3,75	0	1	1	1	1	1	1
5	51	M	0	36	TRONCO	ES	I	0	0	1	1	0	1	1	0
6	36	M	0	120	TRONCO	ES	III	0,9	0	1	1	0	1	1	1
7	46	M	0	156	TRONCO	ES	II	0,3	0	1	0	0	0	0	0
8	41	F	0	60	TRONCO	ES	III	0,8	0	0	1	1	0	0	1
9	44	M	0	96	TRONCO	ES	III	0,9	0	1	1	0	1	0	
10	60	M	0	24	TRONCO	ES	II	0,3	0				1		
11	70	M	0	60	TRONCO	N	III	1,2	0	1	1	0	1	1	0
12	58	M	0	72	TRONCO	ES	II	0,4	0	1	1	0	0	1	1
13	46	M	0	60	TRONCO	ES	I	0	0	0	0	1	0	0	0
14	31	F	0	144	TRONCO	ES	IV	0,9	0	1	1	1	1	0	1
15	55	M	0	60	TRONCO	N	III	1,1	0	1	1	1	1	1	1
16	86	F	0	84	TRONCO	ES	III	0,6	0	1		0		1	0
17	45	F	0	96	TRONCO	ES	III	0,7	0	1	1	1	1	1	1
18	86	M	0	48	TRONCO	ES	IV	1,45	0			1		0	0
19	42	M	0	120	TRONCO	ES	II	0,85	0	0			0	1	
20	61	M	1	24	TRONCO	ES	III	0,85	0	1	1	1	1	0	1
21	45	F	0	72	TRONCO	ES	III	0,75	0	0		1	1	1	1
22	64	M	0	72	TRONCO	ES	II	0,35	0	1	1	0	1	1	1
23	39	M	0	72	TRONCO	N	iv	2,4	0	1	1	0	0	0	0

24	64	M	1	24	CABEÇA	ES	IV	1,5	0	1	1	0	1	1	1
25	74	M	0	60	CABEÇA	N	III	3,6	0	1	1	1	0	0	1
26	57	M	0	48	CABEÇA	ES	I	0	0	0	0	0	0	0	0
27	63	M	0	24	CABEÇA	ES	I	0	0	1	0	0	1	1	1
28	45	F	0	168	CABEÇA	ES	I	0	0						
29	64	F	0	180	CABEÇA	N	IV	1,7	1	0	0	0	0	0	0
30	45	M	1	48	CABEÇA	ES	III	1,1	0	1	1	0	1	1	0
31	45	M	0	144	CABEÇA	N	III	2,2	0	1	1	1	1	1	1
32	83	M	0	36	CABEÇA	N	IV	3,25	1	1	1	1	1	1	1
33	91	F	0	96	CABEÇA	N	IV	3	0			0	1		0
34	51	F	0	84	CABEÇA	ES	I	0	0						0
35	81	F	0	84	CABEÇA	ES	I	0	0	1	0	0	1	0	0
36	82	F	1	12	CABEÇA	L	IV	0,85	0	1	0	1	0	0	1
37	70	F	0	24	CABEÇA	N	I	0	0	1		0	0	0	0
38	54	M	0	36	CABEÇA	ES	III	0,7	0	1		0	0		0
39	61	M	0	72	CABEÇA	N	IV	2	0	1	1	0	1	1	1
40	61	M	0	108	CABEÇA	ES	I	0	0	1	0	0		1	0
41	74	M	1	20	CABEÇA	ES	III	1,06	0	1	1	1	1	1	1
42	73	F	1	24	CABEÇA	N	n/a	n/a	0	1	0	1	0	0	1
43	28	F	0	60	CABEÇA	ES	I	0	0	1	1	1	1	1	1
44	44	M	0	96	CABEÇA	ES	I	0	0	0	0	0	0	0	0
45	52	M	0	48	CABEÇA	ES	I	0,2	0		0	0	0	0	0
46	74	M	1	24	CABEÇA	N	n/a	n/a	0	1	1	0	1	1	1

REFERÊNCIAS

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009;59(4):225-49.
2. Santos I, Santos ABO, Bandiera DC, Almeida FA História da Cirurgia do Melanoma. *Diagn. tratamento* 2001;6(1):32-36.
3. Denkler K, Johnson J. A lost piece of melanoma history. *Plast Reconstr Surg* 1999;104(7):2149-53.
4. Chin L, Merlino G, DePinho RA. Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box. *Genes Dev* 1998;12(22):3467-81.
5. Clark WH, Jr., From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969;29(3):705-27.
6. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970;172(5):902-8.
7. Veronesi U, Adamus J, Bandiera DC, Brennhovd IO, Caceres E, Cascinelli N, Claudio F, Ikonopisov RL, Javorskj VV, Kirov S, Kulakowski A, Lacoub J, Lejeune F, Mechl Z, Morabito A, Rode I, Sergeev S, van Slooten E, Szczygiel K, Trapeznikov NN. Inefficacy of immediate node

- dissection in stage 1 melanoma of the limbs. *N Engl J Med* 1977;297(12):627-30.
8. Veronesi U, Adamus J, Bandiera DC, Brennhovd O, Caceres E, Cascinelli N, Claudio F, Ikonopisov RL, Javorski VV, Kirov S, Kulakowski A, Lacour J, Lejeune F, Mechl Z, Morabito A, Rode I, Sergeev S, van Slooten E, Szczygiel K, Trapeznikov NN, Wagner RI. Delayed regional lymph node dissection in stage I melanoma of the skin of the lower extremities. *Cancer* 1982;49(11):2420-30.
 9. Veronesi U, Cascinelli N, Adamus J, Balch C, Bandiera D, Barchuk A, Bufalino R, Craig P, De Marsillac J, Durand JC, et al. Thin stage I primary cutaneous malignant melanoma. Comparison of excision with margins of 1 or 3 cm. *N Engl J Med* 1988;318(18):1159-62.
 10. Cascinelli N, Belli F, Santinami M, Fait V, Testori A, Ruka W, Cavaliere R, Mozzillo N, Rossi CR, MacKie RM, Nieweg O, Pace M, Kirov K. Sentinel lymph node biopsy in cutaneous melanoma: the WHO Melanoma Program experience. *Ann Surg Oncol* 2000;7(6):469-74.
 11. Jemal A, Devesa SS, Hartge P, Tucker MA. Recent trends in cutaneous melanoma incidence among whites in the United States. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(9):678-83.
 12. INCA. *Estimativa 2008*. Incidência de Câncer no Brasil. 2008.

13. Lens MB, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2004;150(2):179-85.
14. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 2001;19(16):3622-34.
15. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A, Jr., Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001;19(16):3635-48.
16. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC, Jr., Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *J Clin Oncol* 2009.

17. Vogt T, Zipperer KH, Vogt A, Holzel D, Landthaler M, Stolz W. p53-protein and Ki-67-antigen expression are both reliable biomarkers of prognosis in thick stage I nodular melanomas of the skin. *Histopathology* 1997;30(1):57-63.
18. Lui P, Cashin R, Machado M, Hemels M, Corey-Lisle PK, Einarson TR. Treatments for metastatic melanoma: synthesis of evidence from randomized trials. *Cancer Treat Rev* 2007;33(8):665-80.
19. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358(6381):15-6.
20. Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993;329(18):1318-27.
21. Smalley KS. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int J Cancer* 2003;104(5):527-32.
22. Cohen C, Zavala-Pompa A, Sequeira JH, Shoji M, Sexton DG, Cotsonis G, Cerimele F, Govindarajan B, Macaron N, Arbiser JL. Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res* 2002;8(12):3728-33.
23. Sekulic A, Haluska P, Jr., Miller AJ, Genebriera De Lamo J, Ejadi S, Pulido JS, Salomao DR, Thorland EC, Vile RG, Swanson DL, Pockaj BA,

- Laman SD, Pittelkow MR, Markovic SN. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clin Proc* 2008;83(7):825-46.
24. Satyamoorthy K, Herlyn M. Cellular and molecular biology of human melanoma. *Cancer Biol Ther* 2002;1(1):14-7.
 25. Kielhorn E, Provost E, Olsen D, D'Aquila TG, Smith BL, Camp RL, Rimm DL. Tissue microarray-based analysis shows phospho-beta-catenin expression in malignant melanoma is associated with poor outcome. *Int J Cancer* 2003;103(5):652-6.
 26. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, Beroukhi R, Milner DA, Granter SR, Du J, Lee C, Wagner SN, Li C, Golub TR, Rimm DL, Meyerson ML, Fisher DE, Sellers WR. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 2005;436(7047):117-22.
 27. Cannon-Albright LA, Meyer LJ, Goldgar DE, Lewis CM, McWhorter WP, Jost M, Harrison D, Anderson DE, Zone JJ, Skolnick MH. Penetrance and expressivity of the chromosome 9p melanoma susceptibility locus (MLM). *Cancer Res* 1994;54(23):6041-4.
 28. Gruis NA, van der Velden PA, Sandkuijl LA, Prins DE, Weaver-Feldhaus J, Kamb A, Bergman W, Frants RR. Homozygotes for CDKN2 (p16)

- germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds. *Nat Genet* 1995;10(3):351-3.
29. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 1999;340(17):1341-8.
30. Miller AJ, Mihm MC, Jr. Melanoma. *N Engl J Med* 2006;355(1):51-65.
31. Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, Bergman W, Bishop JN, Bressac-de Paillerets B, Chompret A, Ghiorzo P, Gruis N, Hansson J, Harland M, Hayward N, Holland EA, Mann GJ, Mantelli M, Nancarrow D, Platz A, Tucker MA. Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(12):894-903.
32. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005;365(9460):687-701.
33. Wick MM, Sober AJ, Fitzpatrick TB, Mihm MC, Kopf AW, Clark WH, Blois MS. Clinical characteristics of early cutaneous melanoma. *Cancer* 1980;45(10):2684-6.

34. Abbasi NR, Shaw HM, Rigel DS, Friedman RJ, McCarthy WH, Osman I, Kopf AW, Polsky D. Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *Jama* 2004;292(22):2771-6.
35. Argenziano G, Fabbrocini G, Carli P, De Giorgi V, Sammarco E, Delfino M. Epiluminescence microscopy for the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. Comparison of the ABCD rule of dermatoscopy and a new 7-point checklist based on pattern analysis. *Arch Dermatol* 1998;134(12):1563-70.
36. Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 2004;351(10):998-1012.
37. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, Mozzillo N, Elashoff R, Essner R, Nieweg OE, Roses DF, Hoekstra HJ, Karakousis CP, Reintgen DS, Coventry BJ, Glass EC, Wang HJ. Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med* 2006;355(13):1307-17.
38. Weinstein A, Belfort FA. Conduta no melanoma cutâneo. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2004;31:204-14.
39. Jansen L, Koops HS, Nieweg OE, Doting MH, Kapteijn BA, Balm AJ, Vermey A, Plukker JT, Hoefnagel CA, Piers DA, Kroon BB. Sentinel node biopsy for melanoma in the head and neck region. *Head Neck* 2000;22(1):27-33.

40. Morton DL, Cochran AJ, Thompson JF, Elashoff R, Essner R, Glass EC, Mozzillo N, Nieweg OE, Roses DF, Hoekstra HJ, Karakousis CP, Reintgen DS, Coventry BJ, Wang HJ. Sentinel node biopsy for early-stage melanoma: accuracy and morbidity in MSLT-I, an international multicenter trial. *Ann Surg* 2005;242(3):302-11; discussion 311-3.
41. Ang KK, Peters LJ, Weber RS, Morrison WH, Frankenthaler RA, Garden AS, Goepfert H, Ha CS, Byers RM. Postoperative radiotherapy for cutaneous melanoma of the head and neck region. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;30(4):795-8.
42. Ballo MT, Strom EA, Zagars GK, Bedikian AY, Prieto VG, Mansfield PF, Lee JE, Gershenwald JE, Ross MI. Adjuvant irradiation for axillary metastases from malignant melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;52(4):964-72.
43. Kirkwood JM, Ibrahim JG, Sosman JA, Sondak VK, Agarwala SS, Ernstoff MS, Rao U. High-dose interferon alfa-2b significantly prolongs relapse-free and overall survival compared with the GM2-KLH/QS-21 vaccine in patients with resected stage IIB-III melanoma: results of intergroup trial E1694/S9512/C509801. *J Clin Oncol* 2001;19(9):2370-80.
44. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995;81(3):323-30.

45. Beausejour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, Campisi J. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J* 2003;22(16):4212-22.
46. Bennett DC. How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res* 2008;21(1):27-38.
47. Sharpless E, Chin L. The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene* 2003;22(20):3092-8.
48. Reed JA, Loganzo F, Jr., Shea CR, Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, Bogdany JK, Shiel MJ, Haluska FG, Fountain JW, et al. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res* 1995;55(13):2713-8.
49. Talve L, Sauroja I, Collan Y, Punnonen K, Ekfors T. Loss of expression of the p16INK4/CDKN2 gene in cutaneous malignant melanoma correlates with tumor cell proliferation and invasive stage. *Int J Cancer* 1997;74(3):255-9.
50. Alonso SR, Ortiz P, Pollan M, Perez-Gomez B, Sanchez L, Acuna MJ, Pajares R, Martinez-Tello FJ, Hortelano CM, Piris MA, Rodriguez-Peralto JL. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with

distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol* 2004;164(1):193-203.

51. Sparrow LE, Eldon MJ, English DR, Heenan PJ. p16 and p21WAF1 protein expression in melanocytic tumors by immunohistochemistry. *Am J Dermatopathol* 1998;20(3):255-61.

52. Straume O, Sviland L, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res* 2000;6(5):1845-53.

53. Wang YL, Uhara H, Yamazaki Y, Nikaido T, Saida T. Immunohistochemical detection of CDK4 and p16INK4 proteins in cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 1996;134(2):269-75.

54. Funk JO, Schiller PI, Barrett MT, Wong DJ, Kind P, Sander CA. p16INK4a expression is frequently decreased and associated with 9p21 loss of heterozygosity in sporadic melanoma. *J Cutan Pathol* 1998;25(6):291-6.

55. Sanki A, Li W, Colman M, Karim RZ, Thompson JF, Scolyer RA. Reduced expression of p16 and p27 is correlated with tumour progression in cutaneous melanoma. *Pathology* 2007;39(6):551-7.

56. Keller-Melchior R, Schmidt R, Piepkorn M. Expression of the tumor suppressor gene product p16INK4 in benign and malignant melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 1998;110(6):932-8.
57. Sirigu P, Piras F, Minerba L, Murtas D, Maxia C, Colombari R, Corbu A, Perra MT, Ugalde J. Prognostic prediction of the immunohistochemical expression of p16 and p53 in cutaneous melanoma: a comparison of two populations from different geographical regions. *Eur J Histochem* 2006;50(3):191-8.
58. Sauter ER, Yeo UC, von Stemm A, Zhu W, Litwin S, Tichansky DS, Pistritto G, Nesbit M, Pinkel D, Herlyn M, Bastian BC. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer Res* 2002;62(11):3200-6.
59. Florenes VA, Faye RS, Maelandsmo GM, Nesland JM, Holm R. Levels of cyclin D1 and D3 in malignant melanoma: deregulated cyclin D3 expression is associated with poor clinical outcome in superficial melanoma. *Clin Cancer Res* 2000;6(9):3614-20.
60. Karim RZ, Li W, Sanki A, Colman MH, Yang YH, Thompson JF, Scolyer RA. Reduced p16 and increased cyclin D1 and pRb expression are correlated with progression in cutaneous melanocytic tumors. *Int J Surg Pathol* 2009;17(5):361-7.

61. Georgieva J, Sinha P, Schadendorf D. Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. *J Clin Pathol* 2001;54(3):229-35.
62. de Sa BC, Fugimori ML, Ribeiro Kde C, Duprat Neto JP, Neves RI, Landman G. Proteins involved in pRb and p53 pathways are differentially expressed in thin and thick superficial spreading melanomas. *Melanoma Res* 2009;19(3):135-41.
63. Ramirez JA, Guitart J, Rao MS, Diaz LK. Cyclin D1 expression in melanocytic lesions of the skin. *Ann Diagn Pathol* 2005;9(4):185-8.
64. Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Altered expression of cell cycle regulators Cyclin D1, p14, p16, CDK4 and Rb in nodular melanomas. *Int J Oncol* 2004;25(6):1559-65.
65. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Brocker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005;353(20):2135-47.
66. Muthusamy V, Hobbs C, Nogueira C, Cordon-Cardo C, McKee PH, Chin L, Bosenberg MW. Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45(5):447-54.

67. Tchernev G, Orfanos CE. Downregulation of cell cycle modulators p21, p27, p53, Rb and proapoptotic Bcl-2-related proteins Bax and Bak in cutaneous melanoma is associated with worse patient prognosis: preliminary findings. *J Cutan Pathol* 2007;34(3):247-56.
68. Korabiowska M, Ruschenburg I, Betke H, Stachura J, Schlott T, Cardo CC, Brinck U. Downregulation of the retinoblastoma gene expression in the progression of malignant melanoma. *Pathobiology* 2001;69(5):274-80.
69. Li W, Sanki A, Karim RZ, Thompson JF, Soon Lee C, Zhuang L, McCarthy SW, Scolyer RA. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology* 2006;38(4):287-301.
70. Whiteman DC, Parsons PG, Green AC. p53 expression and risk factors for cutaneous melanoma: a case-control study. *Int J Cancer* 1998;77(6):843-8.
71. Yamamoto M, Takahashi H, Saitoh K, Horikoshi T, Takahashi M. Expression of the p53 protein in malignant melanomas as a prognostic indicator. *Arch Dermatol Res* 1995;287(2):146-51.
72. Karjalainen JM, Eskelinen MJ, Kellokoski JK, Reinikainen M, Alhava EM, Kosma VM. p21(WAF1/CIP1) expression in stage I cutaneous malignant

- melanoma: its relationship with p53, cell proliferation and survival. *Br J Cancer* 1999;79(5-6):895-902.
73. Hieken TJ, Ronan SG, Farolan M, Shilkaitis AL, Das Gupta TK. Molecular prognostic markers in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. *Cancer* 1999;85(2):375-82.
74. Trotter MJ, Tang L, Tron VA. Overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/CIP1) in human cutaneous malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 1997;24(5):265-71.
75. Maelandsmo GM, Holm R, Fodstad O, Kerbel RS, Florenes VA. Cyclin kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in malignant melanoma: reduced expression in metastatic lesions. *Am J Pathol* 1996;149(6):1813-22.
76. Ferrari Junior NM, Muller H, Ribeiro M, Maia M, Sanches Junior JA. Cutaneous melanoma: descriptive epidemiological study. *Sao Paulo Med J* 2008;126(1):41-7.
77. Pacifico MD, Grover R, Richman P, Daley F, Wilson GD. Validation of tissue microarray for the immunohistochemical profiling of melanoma. *Melanoma Res* 2004;14(1):39-42.