RICARDO HSIEH

**Expressão da proteína p16, ciclina D1, CDK4
e proteína do retinoblastoma no melanoma
acral lentiginoso**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Dermatologia

Orientadora: Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto

São Paulo

2008

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Mirian Nacagami Sotto, por incentivar o meu progresso acadêmico e confiar no meu potencial; pela sua paciência, ajuda e dedicação durante todo este projeto, por toda sua dedicação à pesquisa, pela qual eu me inspiro. Agradeço a confiança e apoio nos bons momentos e também nas horas mais difíceis, e por estar sempre presente durante todas as etapas deste percurso, desde a iniciação científica até a pós-graduação, como professora e orientadora dedicada.

À Profa. Dra. Sílvia Vanessa Lourenço, por incentivar e ensinar o papel importante da pesquisa. Agradeço a confiança e apoio, desde a iniciação científica até a pós-graduação, como professora dedicada e como amiga.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, Professor Titular da disciplina de Patologia Geral da FOUSP, pela ajuda no fornecimento e padronização dos anticorpos utilizados neste trabalho.

À Aline Firmiano, por sua dedicação, apoio e auxílio na execução e realização deste trabalho.

À Sabrina Hitomi Uyekita e ao Fábio Rodrigues Gonçalves de Carvalho, grandes amigos, colegas de graduação, de iniciação científica e de pós-graduação. Obrigado pela amizade, apoio, ajuda e incentivo ao longo destes anos.

A todos os colegas do Instituto de Medicina Tropical (IMT), pela ajuda e cooperação e pelo ótimo ambiente que desfrutei ao longo destes anos.

Aos funcionários da Divisão de Dermatologia do HC-FMUSP por toda a ajuda e contribuição neste trabalho.

Aos meus pais pelo amor, apoio incondicional, educação, compreensão, ajuda nos momentos mais complicados e confiança nas minhas decisões.

A CAPES pelo incentivo à pesquisa através contemplação da bolsa de Mestrado (Portaria CAPES No. 52/002).

Sumário

Lista de abreviaturas e símbolos	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3.1 Melanoma Maligno.....	6
3.1.1 Conceitos clínico e histológico – MAL.....	9
3.1.2 Epidemiologia – MAL.....	10
3.2 Fatores etiológicos do melanoma.....	13
3.3 Ciclo celular.....	15
3.4 Controle do ciclo celular e melanoma.....	18
3.4.1 p16.....	19
3.4.2 Ciclina D1.....	22
3.4.3 CDK4.....	25
3.4.4 Retinoblastoma.....	25
4. MÉTODOS.....	29
4.1 Casuística.....	29
4.1.1 Aprovação do Comitê de Ética.....	29
4.2 Análise histopatológica.....	30
4.3 Técnica de Imunoistoquímica para a demonstração da expressão das proteínas p16, ciclina D1, CDK4 e retinoblastoma.....	30
4.4 Análise das reações imunoistoquímicas.....	35
4.5 Análise estatística dos resultados.....	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1 Dados clínico-epidemiológicos da casuística.....	37
5.2 Características histopatológicas dos tumores.....	37
5.3 Demonstração da expressão das proteínas da via pRB nos melanomas acrais lentiginosos.....	40
5.3.1 Proteína p16.....	40
5.3.2 Ciclina D1.....	41
5.3.3 CDK4.....	42
5.3.4 Proteína do retinoblastoma.....	42
5.4 Análise estatística dos resultados.....	54
6. DISCUSSÃO.....	58
7. CONCLUSÕES.....	72
8. ANEXO 1.....	73
9. REFERÊNCIAS.....	74

Lista de abreviaturas

ARF - alternate reading frame

BSA - soroalbumina bovina

CDK – quinase dependente de ciclina

DNA - *Desoxi-Ribonucleic-Acid* (ácido desoxirribonucléico)

GBM – Grupo Brasileiro de Melanoma

HMD2 – *Human Double Minute*

MAL – melanoma acral lentiginoso

M - Molar

p14 – proteína p14

p16 – proteína p16

p53 – proteína p53

pRb – proteína do retinoblastoma

TMA – tissue microarray

LOH – *Loss of heterozygosity* (perda de heterozigosidade)

et al. – e outros

Lista de símbolos

µm – micrômetros

mm – milímetros

°C – graus Celsius

< - menor que

≤ - menor igual a

> - maior que

Lista de tabelas

Tabela 1: Classificação anatomo-clínica do melanoma maligno cutâneo.....	8
Tabela 2: Expressão de p16 em lesões melanocíticas (modificado de Li <i>et al.</i> , 2006).....	21
Tabela 3: Expressão de ciclina D1 em lesões melanocíticas cutâneas (modificado de Li <i>et al.</i> , 2006).....	24
Tabela 4: Expressão de pRb em lesões melanocíticas (modificado de Li <i>et al.</i> , 2006).....	27
Tabela 5: Anticorpos Primários, origem, título de uso, técnicas de recuperação antigênica e tecidos controles.....	34
Tabela 6: Melanoma acral lentiginoso dados clínicos, espessura das lesões e presença ou ausência de ulceração.....	39
Tabela 7: Expressão de p16, ciclina D1, CDK4 e proteína do retinoblastoma em melanomas acrais lentiginosos delgados.....	50
Tabela 8: Expressão de p16, ciclina D1, CDK4 e proteína do retinoblastoma em melanomas acrais lentiginosos espessos.....	51

Tabela 9: Expressão de p16, ciclina D1, CDK4 e proteína do retinoblastoma em melanomas acrais lentiginosos não ulcerados.....52

Tabela 10: Expressão de p16, CDK4, ciclina D1 e proteína do retinoblastoma em melanomas acrais lentiginosos ulcerados.....53

Tabela 11. Comparação da expressão de p16, cdk4, ciclina D1 e pRb em melanomas acrais lentiginosos de acordo com a espessura (delgados x espessos) e ausência e presença de ulceração.....55

Tabela 12. Correlação das frequências de expressão das proteínas p16, ciclina D1, CDK4 e pRb no melanoma acral lentiginoso.....57

Lista de figuras

Legenda da Figura 1	44
Figura 1 - Melanoma acral lentiginoso. Expressão de p16 e expressão de ciclina D1	45
Legenda da Figura 2	46
Figura 2 - Melanoma acral lentiginoso. Expressão de CDK4 e expressão de pRb	47
Legenda da Figura 3.....	48
Figura 3 - Melanoma acral lentiginoso (caso 5)	49

Resumo

Hsieh R. Expressão da proteína p16, ciclina D1, CDK4 e proteína do retinoblastoma no melanoma acral lentiginoso [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 86p.

INTRODUÇÃO: O melanoma acral lentiginoso (MAL) tem frequência expressiva entre os casos de melanoma observados no nosso meio e difere dos outros tipos clinicopatológicos de melanoma cutâneos por não ter a exposição solar como fator predisponente. Poucos trabalhos da literatura enfocam as alterações dos genes supressores de tumores e a expressão de suas proteínas nas lesões de MAL. Por esses motivos propusemo-nos a realizar um estudo retrospectivo visando uma melhor compreensão das proteínas envolvidas na via p16^{INK4a}/ciclina D1/CDK4/pRb do ciclo celular, no MAL em casuística brasileira. **MÉTODOS:** Através de técnica de imunoistoquímica foi demonstrada a expressão das proteínas p16, ciclina D1, CDK4 e pRb em 32 lesões de MAL. Comparou-se a frequência de expressão desses marcadores nos tumores delgados (espessura de até 1,0mm) e espessos (mais de 1,0 mm de espessura), assim como de acordo com a presença ou ausência de ulceração. **RESULTADOS:** Houve expressão de p16 em 78% das lesões, de ciclina D1 em 61,5%, CDK4 em 84% e pRb em 85% dos MAL analisados. O padrão de imunomarcção das células neoplásicas foi nuclear para todos os anticorpos. Expressão nuclear associada à citoplasmática foi observada em 76% dos tumores positivos

para p16 e 81% dos casos positivos para CDK4. Não houve diferenças significativas entre as frequências de expressão de cada um dos marcadores quando comparados de acordo com sua espessura (delgados e espessos) e presença de ulceração. CONCLUSÕES: A expressão de ciclina D1 e CDK4, nos melanomas acrais lentiginosos, pode ser considerada aberrante e reflexo de provável alteração na via supressora de tumores p16/ciclinaD1/CDK4/pRb. A expressão tecidual de p16 e pRb, demonstrada pela técnica imunoistoquímica, pode não refletir as prováveis alterações da via supressora de tumores estudada. Esses marcadores, isoladamente, não devem ser considerados como fatores prognósticos no melanoma acral lentiginoso.

Descritores: 1. Melanoma; 2. Imunoistoquímica; 3. genes p16; 4. Ciclina D1; 5. Quinase 4 dependente de ciclina; 6. Proteína do retinoblastoma

Summary

Hsieh R. Expression of p16, cyclin D1, CDK4 and retinoblastoma protein in acral lentiginous melanoma [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 86p.

INTRODUCTION: Acral lentiginous melanoma (ALM) has an expressive frequency between melanoma cases in our country, and it differs from the others clinical pathological types of cutaneous melanoma, because it does not have sun exposure as a predisposing factor. There are few publications in the literature addressing the expression of tumor suppressor pathway proteins in ALM. For these reasons we proposed to carry out a retrospective study aiming at a better understanding of p16^{INK4a}/cyclin D1/CDK4/pRb pathway involvement in ALM lesions. **METHODS:** Expression of p16, cyclin D1, CDK4 and pRB in 32 ALM lesions was displayed by immunohistochemistry. We compared the frequency of the expression of these markers in thin (thickness up to 1.0 mm) and thick lesions (thickness above 1.0 mm), as well as in accordance with the presence or absence of ulceration. **RESULTS:** 76% of the tumors were positive to p16 and 81% of the cases were positive to CDK4. There was no significant difference between the frequency of the expression of each marker when comparing in accordance with the thickness (thin and thick lesions) and the presence of ulceration. **CONCLUSIONS:** The expression of cyclin D1 and CDK4 in acral lentiginous melanoma may be considered aberrant and as reflex of a

probable alteration in the p16/cyclin D1/CDK4/pRb tumor suppressor pathway. p16 and pRb tumor expression displayed by immunohistochemistry may not reflect probable alterations of the tumor suppressor pathway studied. The expression of these proteins, per se, may not be considered as prognostic factor in acral lentiginous melanoma.

Descriptors: 1. Melanoma; 2. Immunohistochemistry; 3. Genes p16; 4. Cyclin D1; 5. Cyclin-dependent Kinase 4; 6. Retinoblastoma Protein

1. INTRODUÇÃO

Melanoma maligno é uma neoplasia originada das células pigmentadas (melanócitos). No estágio fetal, precursores dos melanócitos migram da crista neural, se instalam na pele, no sistema nervoso e nas membranas mucosas (Czajkowski *et al.*, 2002).

O melanoma desenvolve-se a partir da transformação maligna de melanócitos que residem na camada basal da epiderme na pele humana (Chudnovsky *et al.*, 2005).

Os melanomas malignos cutâneos têm sido subdivididos em quatro grupos baseados na histopatologia, localização anatômica e padrão de crescimento: melanoma extensivo superficial, melanoma nodular, melanoma acral lentiginoso e lentigo maligno melanoma (Weyers *et al.*, 1999; Sampaio e Rivitti, 2000; Chudnovsky *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2005; Takata e Saida, 2006).

O melanoma maligno é neoplasia relativamente rara quando comparada aos outros cânceres de pele - sua frequência é menor que 5% (Dahl e Guldberg, 2007), porém é a causa de aproximadamente três quartos de todas as mortes por câncer de pele (Bastuji-Garin e Diepgen, 2002).

Os estudos epidemiológicos maiores têm focado o melanoma nos indivíduos caucasianos, entretanto, pouco é conhecido sobre a incidência e epidemiologia de melanoma dentre populações de outras etnias (Cress e Holly, 1997).

Assim como tem se verificado um aumento da incidência do melanoma na população branca em geral nos últimos anos, o mesmo tem sido observado em países de população amarela como o Japão (Saida, 2001).

Os estudos nos Estados Unidos revelam que o melanoma maligno é pouco freqüente em indivíduos não brancos (hispânicos, afro-americanos, índios americanos, asiáticos e miscigenados). Entretanto, o melanoma acral lentiginoso (MAL) têm alta incidência nesses indivíduos (Swan e Hudson, 2003; Cormier *et al.*, 2006). Nos afro-americanos o MAL localiza-se com maior freqüência na pele plantar (Bellows *et al.*, 2001).

O MAL é também mais freqüente em asiáticos quando comparado com sua freqüência em caucasianos, onde é muito raramente observado. O tipo de pele da população amarela é menos susceptível para melanomas relacionados com a radiação ultra-violeta, o que justifica a maior incidência relativa de MAL nesses indivíduos. Além disso, o trauma e contato direto com agroquímicos podem estar associados com o MAL nos indivíduos que se ocupam da agricultura nos países asiáticos (Chang *et al.*, 2004).

Segundo dados estatísticos do Grupo Brasileiro de Melanoma o MAL constitui cerca de 9,8% dos melanomas cutâneos protocolados pelo Grupo em nosso meio (Scramim AP - Melanoma Cutâneo: realidade dentro do Grupo Brasileiro de Melanoma.

BOLETIM INFORMATIVO DO GBM - ANO VIII - No. 28 JANEIRO, FEVEREIRO E MARÇO 2005) *.

O Brasil é um país de dimensões continentais e com diversidade étnica que varia de acordo com a região geográfica. Maia *et al.* (2002) chamaram a atenção para a variabilidade da incidência do MAL de acordo com as regiões do país, indicando menor incidência na Região Sul, em que há predomínio da raça branca, incidência maior na Região Sudeste e predominância nas regiões Nordeste e Norte do Brasil. Sendo assim, no Brasil o MAL tem importância epidemiológica, necessitando de uma melhor avaliação (Maia *et al.*, 2002 ; Maia *et al.*, 2003).

Alterações dos genes que controlam o ciclo celular têm sido demonstradas e implicadas na tumorigênese do melanoma maligno familiar e esporádico. O desenvolvimento do melanoma tem sido correlacionado com a inativação de genes das vias supressoras de tumores que controlam a fase G1 do ciclo celular: inativação de p16^{INK4a} da via p16/ciclina D/ciclina dependente de quinases 4 e 6/proteína do retinoblastoma (p16^{INK4a}/Ciclina D/CDK4,6/pRb) e de p14^{ARF}/human double minute 2/p53 (p14^{ARF}/HMD2/p53). Mutações do oncogene Ras e seus efetores também têm sido implicadas na gênese do melanoma. A identificação de mutações de BRAF é freqüente nos melanomas (Chudnovsky *et al.*, 2005).

O MAL tem freqüência expressiva entre os casos de melanoma observados no nosso meio e difere dos outros tipos

clinicopatológicos de melanoma cutâneos pela não relação com exposição solar como fator predisponente. Poucos trabalhos da literatura enfocam as alterações dos genes supressores de tumores e a expressão de suas proteínas nas lesões de MAL (Wang *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1997; Chana *et al.*, 2000; Vuhahula *et al.*, 2000).

Por esses motivos propusemo-nos a realizar um estudo retrospectivo de casuística brasileira de MAL visando uma melhor compreensão do papel das proteínas envolvidas na via p16^{INK4a}/ciclina D1/CDK4/pRb do ciclo celular, nesse tipo de melanoma.

* <http://www.gbm.org.br/gbm/boletim/2005/infor28.aspx>

2. OBJETIVOS

Gerais:

Este estudo tem por objetivo analisar, avaliar e comparar a expressão das proteínas envolvidas na via supressora de tumores p16/ciclina D1/CDK4/pRb do ciclo celular em melanomas acrais lentiginosos.

Específicos:

1. Verificar, através de técnicas de imunoistoquímica a expressão das proteínas p16, ciclina D1, CDK4 e do retinoblastoma em melanomas acrais.
2. Comparar a expressão dessas proteínas nos melanomas acrais lentiginosos delgados (com espessura menor ou igual 1,0 mm) e espessos (com espessura maior que 1,0 mm).
3. Comparar a expressão dessas proteínas nos melanomas acrais lentiginosos não ulcerados e ulcerados.
4. Verificar a correlação da expressão de p16, ciclina D1, CDK4 e pRb.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Melanoma maligno

O melanoma maligno é a neoplasia cutânea mais agressiva (Avbelj *et al.*, 2003). É relativamente pouco freqüente, quando comparado a outras neoplasias malignas da pele ($< 5\%$) (Dahl e Guldborg, 2007), porém representa a causa de aproximadamente três quartos de todas as mortes por tumores cutâneos (Bastuji-Garin e Diepgen, 2002). A excisão cirúrgica, dos melanomas primários delgados leva à cura. A doença metastática, por outro lado, é refratária a todas as formas atuais de tratamento, e o seu prognóstico é ruim (Dahl e Guldborg, 2007).

A epidemiologia do melanoma em populações de origem caucasiana tem sido extensivamente documentada, entretanto, poucos são os dados epidemiológicos dessa neoplasia em populações com ancestrais mistos (Swan e Hudson, 2003). Segundo Cress e Holly (1997), os estudos epidemiológicos mais amplos de melanoma focam a população da raça branca. Pouco é conhecido sobre a incidência e dados epidemiológicos do melanoma entre outras populações, uma vez que sua ocorrência é muito menor nos indivíduos de origem não caucasóide.

Assim como a incidência do melanoma maligno vem aumentando rapidamente nos países de população branca predominante, dados do Japão têm demonstrado que o número de

casos de melanoma têm também aumentado naquele país de população quase que exclusivamente da raça amarela (Saida, 2001).

O melanoma acomete adultos jovens e de meia-idade (Chudnovsky *et al.*, 2005; Dahl e Guldberg, 2007). Alguns estudos relatam que existe uma predileção de ocorrência da neoplasia no sexo feminino (Swan e Hudson, 2003).

Os melanomas malignos cutâneos são classificados, de acordo com suas características clínicas, histopatológicas, localização anatômica e padrão de crescimento em: lentigo maligno melanoma, melanoma extensivo superficial, melanoma nodular e melanoma acral lentiginoso. (Weyers *et al.*, 1999; Sampaio e Rivitti, 2000; Chudnovsky *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2005; Takata e Saida, 2006) (tabela 1).

Tabela 1 – Classificação anatomo-clínica do melanoma maligno cutâneo

Subgrupo	Frequência	Características clínicas	Características histopatológicas
Extensivo superficial	70%	Tipo mais comum de melanoma em caucasianos. Ocorre em áreas de exposição solar intermitente: parte superior do dorso nos homens e pernas nas mulheres.	Melanócitos atípicos com invasão das camadas superficiais da epiderme (disseminação pagetóide). Fase de crescimento vertical com invasão dérmica com formação de tecas e presença de infiltrado inflamatório linfocitário intra e peritumoral.
Nodular	10~25%	Melanoma com fase de crescimento vertical ao diagnóstico. Não exhibe componente macular (fase de crescimento radial).	Fase de crescimento vertical precoce com proliferação de melanócitos neoplásicos na derme. Componente intraepidérmico, se presente, não ultrapassa três cones epiteliais além da massa tumoral maior.
Acral lentiginoso	5%	Tipo mais freqüente de melanoma em asiáticos, polinésios, africanos e hispânicos. Ocorre na pele glabra das superfícies volares e aparelho ungueal.	Proliferação lentiginosa de melanócitos dendríticos epidérmicos, ao longo da camada basal e suas cercanias, hiperplasia epidérmica e ausência de elastose solar. Infiltrado inflamatório liquenóide.
Lentigno maligno	<1%	Tipo anatomoclínico da pele com foto-exposição crônica como a face. Mais freqüente em idosos.	Proliferação contígua de melanócitos atípicos, de aspecto dendrítico ao longo da camada basal e adelgaçamento da epiderme na fase de crescimento radial. Presença de sinais de dano actínico crônico com elastose solar acentuada.

Fonte: Weyers et al., 1999 ; Chudnovsky et al., 2005; Fernandes et al., 2005; Takata e Saída, 2006.

Melanoma Acral Lentiginoso (MAL)

3.1.1 Conceitos clínico e histológico

O melanoma acral lentiginoso (MAL) é a quarta variante clinicopatológica do melanoma maligno cutâneo. Acomete as regiões acrais e periféricas dos membros, principalmente as superfícies plantares ou palmares e áreas subungueais dos quirodáctilos e pododáctilos (Krementz *et al.*, 1982; Kim *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2004).

O MAL difere clínica e histologicamente dos demais tipos de melanoma como o lentigo maligno melanoma, melanoma extensivo superficial e o nodular (Krementz *et al.*, 1982). Caracteriza-se, nas fases iniciais, por lesão plana, de colorido acastanhado, marrom-enegrecido, geralmente com variações na sua coloração e bordas irregulares. Segue-se o aparecimento de pápulas, nódulos e ulceração. Acredita-se que o seu prognóstico é menos favorável do que o das outras formas clinicopatológicas de melanoma cutâneo (Kwon *et al.*, 2004).

O Mal apresenta fase de crescimento radial, com proliferação lentiginosa de melanócitos atípicos, que se estende ao longo da camada basal da epiderme, com posterior extensão desses melanócitos atípicos, isolados ou agrupados, às camadas mais superficiais da epiderme, que é geralmente espessada. Na fase de crescimento vertical ocorre a formação progressiva de placa infiltrada, nas porções centrais da lesão, que corresponde à invasão da derme

papilar pela proliferação neoplásica. A seguir ocorre o acometimento dos planos mais profundos, onde os melanócitos atípicos assumem, geralmente, morfologia fusiforme. A epiderme mostra-se hiperplásica, com formação de cones epiteliais alongados. Com o evoluir da neoplasia, geralmente ocorre ulceração nas porções centrais da lesão. A lesão pode apresentar na sua evolução, áreas de regressão parcial (Krementz *et al.*, 1982). Fernandes *et al.* (2005) destacam, como características microscópicas do MAL, a proliferação de melanócitos dendríticos atípicos ao longo da camada basal da epiderme, a hiperplasia epidérmica e ausência de elastose dérmica. Infiltrado inflamatório liquenóide, por vezes de grande intensidade é freqüentemente observado.

3.1.2 Epidemiologia

O MAL é relativamente incomum e tem comportamento clínico agressivo. Representa dois a 11% de todos os melanomas cutâneos diagnosticados nos países ocidentais (Chana *et al.*, 2000).

De acordo com Bellows *et al.* (2001), as publicações dos últimos 25 anos relatam que os melanomas de americanos de origem africana, localizam-se predominantemente na face plantar, com padrão morfológico de melanoma acral lentiginoso.

Segundo Hutcheson *et al.* (2007), os melanomas de pele acral representam 3% a 15% de todos melanomas cutâneos, porém nos

doentes americanos de origem africana, aproximadamente 60% dos melanomas diagnosticados localizam-se em região acral.

Nos Estados Unidos o melanoma maligno cutâneo é raro na população minoritária composta por hispânicos, americanos de origem africana, índios americanos e asiáticos, assim como nos indivíduos miscigenados. Entretanto, nessa população ocorre uma alta incidência de MAL, quando comparada à população branca (Swan e Hudson, 2003; Cormier *et al.* 2006).

Para Chang *et al.* (2004), a frequência de MAL nos asiáticos é alta, quando comparada à da população caucasiana. Esse autor ressalta que o tipo de pele da população taiwanesa é menos susceptível para melanomas relacionados com radiação ultra-violeta. Isso diminui a porcentagem dos outros tipos de melanoma e um conseqüente aumento relativo da porcentagem de MAL. Os autores referem que o trauma e o contato direto com agroquímicos podem estar associados com a maior incidência de MAL nos agricultores em Taiwan.

No nosso país, segundo dados estatísticos do Grupo Brasileiro de Melanoma, o melanoma de tipo acral lentiginoso corresponde à cerca de 9,8% dos melanomas cutâneos protocolados pelo Grupo (Scramim AP - Melanoma Cutâneo: realidade dentro do Grupo Brasileiro de Melanoma. BOLETIM INFORMATIVO DO GBM - ANO VIII - No. 28 JANEIRO, FEVEREIRO E MARÇO 2005) *.

* <http://www.gbm.org.br/gbm/boletim/2005/infor28.aspx>

Os sítios preferenciais onde se desenvolvem os MAL são: região palmar, plantar e tecido subungueal (Kim *et al.*, 2003; Soon *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2004). Segundo Kwon *et al.* (2004), em não caucasianos, a maior parte dos melanomas acrais afetam as superfícies volares e regiões subungueais, sendo a pele plantar a região mais prevalente. O melanoma plantar representa aproximadamente 75% dos melanomas acrais nos indivíduos de pele escura (Hutcheson *et al.*, 2007). O estudo de Bellows *et al.* (2001), também refere que o sítio mais comum de comprometimento do MAL é a região podálica.

O MAL incide em indivíduos de idade entre a quinta e sétima décadas de vida (Bellows *et al.*, 2001; Maia *et al.*, 2003; Soon *et al.*, 2003; Hutcheson *et al.*, 2007). Dados brasileiros recentes, de Ferrari *et al.* (2008), relatam num total de 145 doentes com idade ≤ 65 anos, uma frequência de 15,2% de MAL, sendo esta de 32,4% entre 105 doentes com idade >65 anos.

Nos países de população predominante caucasóide, o MAL não mostra qualquer predomínio quanto à variável sexo (Maia *et al.*, 2002).

O Brasil é um país de dimensões continentais e com diversidade étnica que varia de acordo com a região geográfica. Ocorre variabilidade da incidência de MAL de acordo com as regiões do país. A sua incidência é menor na Região Sul, em que há predomínio da raça branca. A incidência do MAL é crescente da

Região Sudeste para Nordeste e Norte do Brasil, onde predomina a população de origem africana, indígenas e miscigenados. Sendo assim, no Brasil o MAL tem importância epidemiológica e necessita de melhor avaliação e estudo (Maia *et al.*, 2002; Maia *et al.*, 2003).

3.2 Fatores etiológicos do melanoma

Assim como para várias neoplasias malignas, tanto os fatores predisponentes genéticos e de exposição aos agentes ambientais são fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma. O componente de radiação ultra-violeta da luz solar causa danos à pele e aumenta o risco para cânceres de pele e melanoma. O risco de melanoma é mais associado à exposição solar, intermitente e intensa, do que à exposição solar acumulativa. O lentigo maligno melanoma, por ocorrer em áreas fotoexpostas, parece ser exceção a essa regra (Chudnovsky *et al.*, 2005).

Características fenotípicas como pele, cabelos e olhos claros são também fatores de risco para o melanoma (Cress e Holly, 1997; Chang *et al.*, 2004; Hutcheson *et al.* 2007).

A radiação ultra-violeta pode induzir mutações de genes envolvidos na iniciação, promoção e progressão dos tumores. Estes genes participam das vias supressoras de tumor, oncogênica e sinalizadora do controle do ciclo celular. As suas mutações ou alterações podem resultar na perda normal do controle de

crescimento de células da pele, como os queratinócitos e melanócitos (Hussein, 2005).

A homeostase das células melanocíticas depende do balanço entre os processos de proliferação, necrose e apoptose. A radiação ultra-violeta e outros fatores de risco podem levar a uma desordem na regulação do ciclo celular. Melanócitos que tenham “escapado” do controle de proliferação prosseguem pelo ciclo celular para uma divisão rápida. O número de células com aparelhagem genética danificada aumenta, e o ciclo celular rápido favorece o surgimento de novas mutações. A duração do ciclo celular depende principalmente da fase G₁, o qual é o objeto de controle dos proto-oncogenes e anti-oncogenes constituindo as vias da proteína do retinoblastoma (pRb) e da proteína p53. O funcionamento anormal das proteínas reguladoras do ciclo celular é o elemento fundamental na iniciação e progressão dos processos neoplásicos (Czajkowski *et al.*, 2002).

A baixa incidência de melanoma em hispânicos, asiáticos e negros pode ser atribuída ao efeito protetor da pigmentação da pele mais escura (Cress e Holly, 1997).

Alguns autores acreditam que os fatores de risco para melanoma, em populações de não brancos, não estão relacionados ao fator de exposição solar, pois o MAL ocorre com frequência similar em indivíduos de regiões com diferentes latitudes e em grupos raciais de origem genética diferente. Além disso, o MAL ocorre nas áreas do corpo que são geralmente protegidas da exposição solar, pelo uso de

roupas e pela espessa camada de queratina da epiderme volar. Outros fatores etiológicos, que não a exposição direta à radiação solar estariam envolvidos na oncogênese do MAL (Cress e Holly, 1997; Chang *et al.*, 2004; Hutcheson *et al.*, 2007).

O trauma penetrante e o contato direto com agroquímicos têm sido apontados como fatores associados e predisponentes ao MAL (Chang *et al.*, 2004).

O esclarecimento dos fatores de risco para os melanomas acrais pode elucidar o real papel da exposição solar e de outros fatores na etiologia do melanoma. A identificação de fatores de risco para o melanoma na população composta por indivíduos não-brancos deve auxiliar a esclarecer os fatores etiológicos para o melanoma, mesmo nas populações brancas (Cress e Holly, 1997).

3.3 Ciclo celular

O ciclo celular é um processo altamente ordenado que resulta na duplicação e transmissão de informação genética de uma geração celular para outra. Durante esse processo o ácido desoxirribonucléico (DNA) precisa se replicar exatamente e distribuir cópias idênticas de cromossomos para as duas células filhas resultantes da divisão celular.

O ciclo celular é dividido nas seguintes fases: G₁ (gap1) que é o intervalo entre a mitose (fase M) e a fase de síntese (fase S) do

DNA. Durante G_1 a célula é sujeita aos estímulos mitogênicos extracelulares e a fatores de crescimento. Em resposta a esses estímulos, a célula passa da fase G_1 e procede a síntese do DNA na fase S.

A fase G_2 é o intervalo entre o término da síntese de DNA e a mitose. A fase M é marcada pela geração de fusos mitóticos bipolares, separação das cromátides irmãs e a divisão celular.

A regulação do ciclo celular precisa assegurar que os eventos em cada fase estejam completos antes de passar para a próxima fase. Portanto, pontos de checagem para monitoramento da integridade do DNA estão estrategicamente localizados no final da G_1 e na interface G_2/M para prevenir a progressão e propagação de células com mutações ou danificadas.

G_0 refere-se à fase quando a célula está quiescente (temporariamente ou permanentemente fora do ciclo celular). A célula normal depende de estímulos externos (mitógenos e fatores de crescimento) para sair da fase G_0 e entrar no início da fase G_1 . Em resposta aos estímulos externos, inicia-se uma cascata de reações de fosforilação e desfosforilação de proteínas relevantes, com regulação da expressão de ciclinas. Estas se associam com as quinases-dependentes de ciclinas (CDKs) (Israels e Israels, 2000; Czajkowski *et al.*, 2002; Chammas *et al.*, 2003).

O ciclo celular é impulsionado por uma série de proteína quinases, esses complexos CDKs com suas respectivas ciclinas, são

subseqüentemente fosforiladas por uma quinase ativadora. A ciclina é a unidade regulatória e a CDK é a unidade catalítica. Os complexos ciclina/CDK participam de diversos estágios do ciclo celular. Realizam a fosforilação de substratos de proteínas específicas para mover a célula através do ciclo celular, ativam a síntese do DNA e a formação de componentes estruturais associados com a mitose, para as fases seguintes. A periodicidade das ciclinas, mediada pela sua síntese e degradação proteolítica, garante a transição bem delineada dos estágios do ciclo celular.

Erros na codificação genômica resultam na formação de clones celulares defeituosos. Para que isso não ocorra existem sítios regulatórios para a estreita monitoração dos eventos do ciclo celular. O sítio mais importante como ponto de checagem é o ponto de restrição (R), no final da fase G_1 . Quando um erro corre em estágios tardios do ciclo celular, nas fases S ou em G_2/M é reconhecido em outros pontos de checagem. Dependendo do grau do dano, o defeito pode ser reparado ou a mitose é abortada (Israels e Israels, 2000).

Em resposta aos sinais de crescimento e mitóticos extracelulares, as células saem da fase G_0 e vão para a fase G_1 . Na ausência de sinalização mitótica, a célula é submetida ao processo de diferenciação, apoptose ou, passa para o estado de quiescência (G_0).

O ciclo celular inicia-se na fase G_1 , na via da proteína retinoblastoma, quando ocorre aumento da expressão de ciclinas D

(D₁, D₂, D₃). As ciclinas D associadas com CDK4 e CDK6 formam o complexo ciclinas D/CDK, o que resulta na fosforilação e ativação das CDKs. As CDKs ativadas fosforilam a proteína retinoblastoma (pRb). A proteína Rb exerce um papel crítico na regulação da progressão da fase G₁ pelo ponto de restrição. No caso de dano genômico, o ciclo celular precisa ser retardado ou abandonado (Israels e Israels, 2000; Czajkowski *et al.*, 2002).

Os membros da família Rb, quando desfosforilados ou hipofosforilados, têm a função de aderir ao fator de transcrição E2F e inibir a transcrição. Porém, quando ocorre a fosforilação da Rb pela CDK4/6, ocorre a dissociação da Rb e E2F, com liberação da E2F para transcrever um número de genes de reação (incluindo ciclina E) necessários para a passagem pelo ponto de restrição - R. A pRb atua como “guardiã” da célula. Quando hipofosforilada a pRb guarda o ponto de restrição prevenindo a progressão do ciclo celular. A sua hiperfosforilação, por outro lado, é associada com a liberação de E2F permitindo a passagem pelo ponto de restrição R. O Rb mantém seu estado de hiperfosforilação até o final da mitose, guiando a célula pelas fases S, G₂ e M (Israels e Israels, 2000).

3.4 Controle do ciclo celular e melanoma

O aumento da atividade proliferativa na ausência de estímulos externos é uma característica das neoplasias malignas. A aquisição de anormalidades no ponto de checagem G₁/S do ciclo celular é

passo crucial para a gênese e progressão do melanoma. A inativação das vias de pRb e p53 na transição G1/S é condição fundamental para a carcinogênese humana. As alterações da via do pRb são freqüentes no melanoma, por outro lado, as da via do p53 são raramente observadas (Li *et al.*, 2006).

3.4.1 P16

O gene CDKN2, também referido como INK4A, CDK4I e MTS1, é um gene supressor de tumor, localizado no cromossomo humano 9p21. Mutações genéticas de p16 têm sido relacionadas com o melanoma maligno familiar hereditário e também a outros cânceres humanos (Kamb *et al.*, 1994; Liggett Jr. e Sidransky, 1998).

O gene CDKN2 codifica uma proteína de 156 aminoácidos, designada p16, que especificamente liga-se às quinases-dependentes de ciclinas (CDKs) CDK4 e CDK6. Estas quinases são os principais parceiros catalíticos para as ciclinas D. Colaboram com a ciclina E-CDK2 no controle da transição da fase G₁ para S do ciclo celular (Hara *et al.*, 1996; Gray-Schopfer *et al.*, 2006).

Deleções ou mutações do gene p16 têm sido demonstradas em melanomas e linhagens celulares de melanoma, indicando a importância desse gene no desenvolvimento dessa neoplasia. A identificação das mutações do p16 em células germinativas de indivíduos com melanoma familiar, representa prova inequívoca da importância do p16 na predisposição ao melanoma (Hayward, 2003).

No ciclo de divisão celular, a superexpressão da p16 selvagem inibe a progressão pela fase G₁ do ciclo celular, através da sua ligação ao complexo CDK4/ciclina D. Desse modo, ocorre o bloqueio da atividade quinase da enzima. A perda funcional do p16 resulta na proliferação celular anormal pela remoção da chave do ponto de checagem do ciclo celular, o que permite que as células progridam, irrestritamente, para a fase S. As mutações do CDKN2A geram variantes de p16 que têm suas habilidades de inibir a atividade catalítica do complexo CDK4/ciclina D prejudicadas, não permitindo a formação de um complexo estável com a quinase (Castellano *et al.*, 1997; Czajkowski *et al.*, 2002).

O gene INK4a alterado participaria do estágio inicial da transformação neoplásica dos melanócitos e da progressão do melanoma maligno para doença invasiva (Czajkowski *et al.*, 2002).

A tabela 2 demonstra os trabalhos que enfocam expressão de p16 nas lesões melanocíticas.

Tabela 2. Expressão de p16 em lesões melanocíticas (modificado de Li *et al.*, 2006).

Autor e ano	Número de casos	Tipo de tumor	Expressão de p16	Avaliação prognóstica	Implicação prognóstica
Reed et al., 1995	103	MM in situ MM primário MM metastático	0% perda expressão 52% perda expressão 72% perda expressão	NT	NT
Wang et al., 1996	47	Nevo MM não familiar (15 MAL)	61% expressão 16% expressão	NT	NT
Sparrow et al., 1998	110	Nevos MM in situ MM primário MM metastático	89% expressão 92% expressão 50% expressão 64% expressão	NT	NT
Funk et al., 1998	92	Nevos MM primário MM metastático	25% expressão <10% 67% expressão <10% 100% expressão <10%	NT	NT
Keller-Melchior et al., 1998	108	Nevos MM in situ MM primário MM metastático	86% expressão 72% expressão 59% expressão 49% expressão	NT	NT
Talve et al., 1997	89	Nevos MM primário	0% perda de expressão 42% perda de expressão	NT	NT
Straume et al., 2000	270	MM primário	45% perda de expressão	Recorrência	Maior com a baixa expressão
Chana et al., 2000*	68	MAL subungueal MAL plantar	91% < 50% de expressão 66% < 30% de expressão	Sobrevida	Pior com a baixa expressão
Straume et al., 1997	102	MM de cabeça e pescoço Tronco e membros	0% de perda de expressão 12% de perda de expressão	Recorrência Sobrevida	Maior com a baixa expressão Pior com a menor expressão
Winnepenninckx et al., 2004	38	MM área não foto-exposta MM área fotoexposta	24% de perda de expressão 85% de perda de expressão		
Alonso et al., 2004	165	Nevos MM radial MM vertical MM metastático	100% expressão 88% expressão 89% expressão 71% expressão	Sobrevida	Piora com a baixa expressão

MM – melanoma; MAL – melanoma acral lentiginoso; NT – Não testado; * estudo por citometria de fluxo.

3.4.2 Ciclina D1

Ciclina D1 é codificada pelo gene CCN1 localizado no cromossomo 11q3, que é considerado um oncogene. O aumento da proliferação celular foi demonstrado em cultura de células com superexpressão da ciclina D1. A superexpressão da ciclina D1, com ou sem a amplificação do gene, tem sido relatada em diversos tumores malignos humanos (Motokura e Arnold, 1993; Inohara *et al.*, 1996).

O papel da ciclina D1 no desenvolvimento, progressão e prognóstico do melanoma é controverso. Alguns estudos mostram que não há diferença na expressão da ciclina D1 entre os nevos e o melanoma. Porém, outros trabalhos mostram superexpressão de ciclina D1 no melanoma. A ciclina D1 tem sido associada com pior prognóstico nos melanomas da úvea, mas não foi encontrada a mesma correlação em tumores de outras localizações (Ramirez *et al.*, 2005).

A ciclina D1 é expressa, com nível elevado, no meio e fim da fase G1 do ciclo celular (Müller *et al.*, 1994). A superexpressão das ciclinas D pode resultar na perda da função da pRb. Isso ocorre pela fosforilação inapropriada e conseqüente inativação da pRb. As células neoplásicas que têm expressão aumentada da atividade ciclinaD/CDK4 geralmente, mantém a expressão da pRb selvagem (Baker *et al.*, 2005).

Alguns trabalhos demonstram que a ciclina D1 não é apenas um promotor de crescimento da célula tumoral, mas também atua como fator de sobrevivência para células tumorais. A baixa regulação da ciclina D1 pode resultar em morte celular por apoptose (Sauter *et al.* 2002).

A tabela 3 demonstra os estudos de ciclina D1 em lesões melanocíticas.

Tabela 3. Expressão de ciclina D1 em lesões melanocíticas cutâneas (modificado de Li *et al.*, 2006)

Autor e ano	No de casos	Tipo de tumor	Expressão de Ciclina D1	Índice de positividade	Avaliação prognóstica	Implicação prognóstica
Florenes et al. 2000	255	Nevos MM primário, MM Metastático	0% 62% 29%		Sobrevida	Sem correlação
Georgieva et al., 2001	79	Nevos MM primário MM mestático	8% 14% 6%	(>25% cels. positivas)	NT	NT
Sauter et al., 2002	127	Melanócitos Nevos MM primário	0% 5% 30%	(>10% cels. positivas)	NT	NT
Bachmann et al. 2004	186	MM primário MM metastático	64% 54%	Índice de coloração ≥ 4	Sobrevida	Melhor com a expressão excessiva
Alonso et al. 2004 (TMA)	165	Nevos MM radial MM vertical MM metastático	0% 48% 14% 32%		Sobrevida	Sem correlação
Ramirez et al., 2005	126	Nevo composto Nevo intrad. MM in situ MM primário MM metastático	5% 11% 68% 33% 24%	($\geq 20\%$ cels. positivas)	NT	NT

MM – melanoma, intrad – intradérmico, cels – células, NT – não testado; TMA – estudo com *tissue micro array*.

3.4.3 CDK4

O gene CDK4, localizado no cromossomo 12q13, é considerado como proto-oncogene (Lukas *et al.* 1995).

Um processo que ocorre durante a oncogênese é a perda da regulação das CDKs que governam o ponto de checagem na fase G₁. CDK4 controla a fase inicial da fase G₁ do ciclo celular. A inibição de CDK4 pela perda de heterozigosidade (LOH) do p16 ou “silenciamento” do gene é também um achado comum nos cânceres humanos e contribui para a predisposição hereditária do câncer pancreático e do melanoma maligno. A ativação inapropriada dos complexos ciclina D/CDK4/6 parece ser um evento comum em neoplasias malignas humanas (Yu *et al.*, 2003).

Mutação de Arg24Cys no gene CDK4 em células de melanoma resulta numa proteína resistente à inibição normal da atividade catalítica do complexo ciclina D1/CDK4 exercida pela p16 (Piccinin *et al.*, 1997).

3.5 Retinoblastoma

O gene de susceptibilidade ao retinoblastoma humano está localizado no cromossomo 13p14. O produto do gene Rb, a proteína do retinoblastoma (pRb) é uma fosfoproteína nuclear, que está presente em todas as células e é necessária para o crescimento celular normal. A perda de um dos seus alelos normais (heterozigose) aparentemente é tolerada e não interfere no ciclo celular. Entretanto, quando ocorre a perda de ambos os alelos, a ausência completa da

proteína Rb (padrão homozigoto) propicia o aparecimento do câncer (Sawaguchi *et al.*, 1990).

A pRb é uma supressora de tumor arquetípica e reguladora do ciclo celular que controla a progressão da fase G₁ para S. Isso ocorre, em parte, devido a repressão da atividade do fator de transcrição conhecido por promover a proliferação celular. Em resposta aos estímulos mitogênicos a atividade supressiva do crescimento da pRb é cancelada pela sua fosforilação no final da fase G₁. Esse processo é dependente dos complexos ciclina D/CDKs. A perda de sua função, por mutações, contribui para ambas as formas de câncer, familiar e esporádico (Parry *et al.*, 1995; Lukas *et al.*, 1999). O controle do ciclo celular no melanoma maligno seria devido a uma falha na atividade da pRb e não na sua ausência de expressão ou mutação (Roesch *et al.*, 2005).

A tabela 4 apresenta os trabalhos sobre expressão de pRb em lesões melanocíticas.

Tabela 4. Expressão de pRb em lesões melanocíticas (modificado de Li *et al.*, 2006)

Autor e ano	Número de casos	Tipo de tumor	Expressão de pRb		Avaliação prognóstica	Implicação prognóstica
Bachmann et al., 2004	219	MM primário MM metastático	44% ↓ expressão 68% ↓ expressão	Índice de coloração <4	Sobrevida	s/correlação
Korabiowska et al., 2001	209	Nevo MM primário MM metastático	100% com expressão 77% com expressão 10% com expressão		Sobrevida	Melhor com a maior expressão
Saenz-Santamaria et al., 1995	31	Nevos MM primário MM metastático	1% com expressão 100% com expressão 100% com expressão		NT	NT
Alonso et al., 2004 (TMA)	165	Nevos MM radial MM vertical MM metastático	0% de expressão 48% com expressão 61% com expressão 55% com expressão		Sobrevida	Sem correlação

MM – melanoma; NT – não testado; TMA – estudo com *tissue micro array*

Não encontramos, na literatura consultada, trabalhos que verificam por técnica de imunoistoquímica, a expressão de todos os componentes da via do retinoblastoma no melanoma acral lentiginoso.

4. MÉTODOS

4.1 Casuística

Espécimes de melanoma acral lentiginoso foram coletados dos arquivos do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina USP.

Os critérios de inclusão para o estudo, além da revisão histopatológica para a confirmação do diagnóstico do tumor, compreenderam ausência de história de melanoma familiar e quantidade suficiente de tecido para a realização dos exames imunoistoquímicos.

Os dados clínico-epidemiológicos dos doentes foram obtidos por consulta de suas respectivas fichas de exame anatomopatológico e prontuários.

4.1.1 Aprovação do Comitê de Ética

O projeto de pesquisa foi submetido para análise da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, tendo sido aprovado (protocolo 867/05).

4.2 Análise histopatológica

Todos os casos foram analisados para a confirmação diagnóstica de MAL, para a medida de sua espessura e se exibiam ou não ulceração. Os casos foram classificados como melanomas delgados (de até 1,0 mm de espessura máxima) e espessos (com espessura maior que 1,0 mm). Os poucos casos produtos de biopsia incisional de lesão maior, foram incluídos no estudo somente quando espessos, já no espécime enviado para exame.

4.3 Técnica de Imunoistoquímica para a demonstração da expressão das proteínas p16, ciclina D1, CDK4 e retinoblastoma

Dos fragmentos, previamente fixados em formalina a 10% e embebidos em parafina e, mais representativos de cada um dos espécimes, foram obtidos cortes de 5 µm e colhidos em lâminas histológicas tratadas com solução adesiva de aminopropyl-triethoxysilane (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO/USA, cód A3648) na concentração de 3% em acetona PA.

Inicialmente os cortes histológicos foram desparafinizados, em xilol aquecido em estufa a 60 °C por trinta minutos, seguido de dois banhos em xilol à temperatura ambiente, durante 15 minutos cada. Fez-se a seguir a hidratação dos tecidos através de cadeia descendente de etanol, sendo dois banhos em etanol absoluto, dois banhos em etanol 95% (dois minutos para cada banho) finalizando em etanol 70%. Em seguida, as lâminas eram lavadas em água

corrente por cinco minutos e a seguir lavadas em água destilada, por cinco minutos.

A seguir procederam-se as técnicas de recuperação e exposição antigênica do tecido. Para as proteínas p16 e pRb fez-se a exposição antigênica com banho de tampão de ácido cítrico 0,01M, pH 6,0 em forno de microondas, com potência máxima, durante 20 minutos. Para a demonstração da proteína CDK4 fez-se a exposição antigênica por banho de tampão de ácido cítrico 0,01M, pH 6,0 aquecido em panela de pressão elétrica, por 25 minutos. Para a exposição de ciclina D1 foi utilizado tampão EDTA-Tris (0,01M Tris, 0,001M EDTA), pH 9,0 em *steamer* por 40 minutos (Ver tabela 5).

Após o esfriamento do material à temperatura ambiente, durante vinte minutos fez-se a lavagem em água corrente, por cinco minutos, e em água destilada por cinco minutos e, finalmente em banho de solução tampão Tris-HCl (0.05M Tris; 0,3M NaCl) pH 7,4 por cinco minutos.

A seguir aplicava-se o anticorpo primário sobre os tecidos e procedia-se à incubação a 4°C por uma noite.

Os anticorpos primários foram diluídos em soroalbumina bovina (BSA) a 2%. As diluições de uso, códigos, clones e laboratórios de procedência, estão apresentadas na tabela 5.

Após a incubação com os anticorpos primários, os espécimes eram lavados tampão TrisHCl (0.05M Tris; 0,3M NaCl), pH 7,4, por cinco minutos, por duas vezes. A seguir eram incubados com o

anticorpo secundário, utilizando-se o sistema EnVision G/2 AP, coelho/camundongo (K5355, DAKO, Denmark A/S Produktionsvej 42, DK-2600, Glostrup, Denmark): *Rabbit/Mouse (Link) - Secondary reagent* por 30 minutos; *AP Enzyme (Enhancer) - Tertiary Reagent* por 30 minutos. Foram feitas duas lavagens em tampão Tris-HCl (0.05M Tris; 0,3M NaCl), pH 7,4, por cinco minutos entre as duas incubações.

A seguir o material era lavado em dois banhos com tampão Tris-HCl (0.05M Tris; 0,3M NaCl), pH 7,4 por cinco minutos cada. Prosseguia-se com a revelação das reações com o cromógeno *Liquid Permanent Red* (K0640, Dako, Glostrup, Denmark), adicionando-se o bloqueador de fosfatase alcalina endógena *Levamisole Endogenous Alkaline Phosphatase Inhibitor* (X3021, DAKO, Carpinteria, CA, USA). A revelação das reações era controlada através dos controles positivos para cada um dos marcadores.

O cromógeno *permanent red* foi escolhido por possibilitar a diferenciação entre o produto da reação (vermelho) e o pigmento de melanina (negro ou castanho) das células neoplásicas.

Em seguida, o material era contracorado levemente, com hematoxilina de Carazzi, seguida de lavagem em água corrente e banho de água destilada, por cinco minutos cada. As lâminas eram secadas à temperatura ambiente e montadas com resina Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ /USA cód SP15-100) em lamínulas de vidro.

Em todas as reações, foram utilizados controles positivos que corriam em paralelo com os cortes histológicos dos casos de melanoma (Tabela 5). O controle negativo das reações foi obtido pela omissão dos respectivos anticorpos primários nos procedimentos

TABELA 5. Anticorpos Primários, origem, título de uso, técnicas de recuperação antigênica e tecidos controles.

Anticorpo	Origem	Título	Recuperação antigênica	Controle positivo
p16	Ab 4, clone 16P04 Labvision (Fremont, CA, USA)	1:40	Tampão ácido citrico pH 6,0 em forno de micro-ondas (20 min)	Nevo nevocelular ^a
Ciclina D1	Cyclin D1 (SP4) Catalog # RM-9104-S0 Neomarkers Inc. (Fremont, CA, USA)	1:200	Tampão Tris-EDTA pH 9,0 em <i>Steamer</i> (40 min)	Amígdala ^b
CDK4	CDK4 (C-22): SC-260 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)	1:200	Tampão ácido citrico pH 6,0 em panela de pressão (25 min)	Pele Normal ^c
pRb	clone 13A10, Novocastra Laboratories Ltd (Newcastle upon Tyne, NE, UK)	1:300	Tampão ácido citrico pH 6,0 em forno de micro-ondas (20 min)	Amígdala ^d

a – imunomarcção nuclear e citoplasmática; b – imunomarcção nuclear; c – leve imunomarcção citoplasmática em glândulas sudoríparas e queratinócitos; d – imunomarcção nuclear.

4.4 Análise das reações imunoistoquímicas

O material foi analisado por três observadores (R Hsieh, A Firmiano e MN Sotto). A expressão das proteínas pesquisadas foi considerada positiva quando pelo menos 10% das células neoplásicas, de campos microscópicos de 400× (de áreas *hot spot*) mostraram-se imunomarcadas pelos anticorpos utilizados (Tanaka *et al.*, 2001).

Para o anticorpo p16, considerou-se somente a marcação nuclear. Quando observada marcação citoplasmática, somente aquela que se acompanhou de marcação nuclear inequívoca concomitante foi valorizada. A marcação com o anticorpo anti-CDK4 ocorreu no núcleo e também no citoplasma das células neoplásicas. Os anticorpos anti ciclina D1 e anti pRb revelaram somente expressão nuclear nos casos positivos e respectivos espécimes controle das reações.

A expressão de ciclina D1 e CDK4, quando presente em 10% ou mais das células neoplásicas (como acima relatado), foi considerada como expressão excessiva (*over expression*), ou anormal, desses marcadores. A expressão de p16 e pRb em menos de 10% das células neoplásicas foi considerada como perda desses marcadores (como em Kishimoto *et al.*, 2008).

4.5 Análise estatística dos resultados

A frequência de expressão de cada um dos marcadores foi comparada entre os tumores agrupados como delgados e espessos e, se ulcerados ou não. As comparações foram feitas pelo teste exato de Fisher. Utilizou-se o programa estatístico GraphPad Prism, versão 3, para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Considerou-se o nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Dados clínico-epidemiológicos da casuística

Foram analisados 32 casos de melanoma acral lentiginoso.

A média das idades dos doentes foi de 62,4 anos, com idade mínima de 41 anos e máxima de 86 anos. Não havia referência à idade de três doentes em seus respectivos prontuários.

Vinte e um casos eram de doentes do sexo feminino e 11 do sexo masculino.

Quanto à raça dos pacientes analisados, encontramos seis doentes da raça negra e oito brancos. De 18 pacientes não foram encontrados relatos de suas raças nos prontuários clínicos ou fichas de encaminhamento de exame anatomopatológico.

Dezessete tumores localizavam-se na região plantar, nove na pele da região talar, dois no hálux, um na borda medial do pé, um na região palmar e dois em quirodáctilos.

5.2 Características histopatológicas dos tumores

Dentre os 32 casos de MAL que compreenderam o estudo, sete eram melanomas delgados (com espessura até 1,0 mm) e 25 casos espessos (com espessura maior que 1,0 mm). Dentre os melanomas delgados três casos eram tumores *in situ*.

Dezessete tumores não apresentavam ulceração e quinze eram ulcerados.

A tabela 6 apresenta os dados clínico-epidemiológicos dos pacientes, assim como o índice de Breslow (espessura das lesões em milímetros) e presença ou ausência de ulceração dos tumores.

Tabela 6. Melanoma acral lentiginoso dados clínicos, espessura das lesões e presença ou ausência de ulceração.

Caso	Idade (anos)	Sexo	Raça	Localização das lesões	Breslow (mm)	Ulceração
1	62	F	NR	R. talar	0.7	Não
2	41	F	NR	R. talar	1.0	Não
3	NR	F	Negra	R. palmar	<i>in situ</i>	Não
4	67	F	Negra	R. talar	0.5	Não
5	42	F	NR	Hálux	1.0	Não
6	45	M	NR	Borda medial do pé	<i>in situ</i>	Não
7	78	F	NR	R. plantar	<i>in situ</i>	Não
8	NR	F	NR	R. plantar	1.4	Não
9	68	F	Negra	R. plantar	3.3	Não
10	56	F	Branca	R. plantar	2.0	Sim
11	62	M	NR	R. plantar	1.2	Não
12	64	M	Branca	R. plantar	2.6	Sim
13	63	M	NR	R. plantar	1.3	Sim
14	NR	M	Negra	R. plantar	6.5	Sim
15	60	M	Negra	R. plantar	6.2	Não
16	62	F	Negra	R. plantar	3.0	Não
17	76	M	NR	R. talar	1.8	Não
18	51	M	NR	Base 5o QD	6.0	Não
19	71	F	NR	R. talar	3.6	Sim
20	52	M	NR	R. talar	8.0	Sim
21	57	F	NR	R. plantar	3.1	Sim
22	63	F	NR	R. talar	6.0	Sim
23	86	M	NR	R. talar	4.6	Sim
24	75	F	NR	R. plantar	5.0	Sim
25	73	F	NR	2o QD	2.0	Não
26	85	F	NR	Hálux	3.0	Sim
27	69	F	Branca	R. plantar	4.6	Sim
28	69	F	Branca	R. talar	7.0	Sim
29	70	F	Branca	R. plantar	2.4	Sim
30	69	F	Branca	R. plantar	6.0	Não
31	52	M	Branca	R. plantar	2.3	Não
32	85	F	Branca	R. plantar	7.5	Sim

F – sexo feminino; M – sexo masculino; NR – não relatado; R – região; QD - quirodáctilo

5.3 Demonstração da expressão das proteínas da via pRB nos melanomas acrais lentiginosos.

5.3.1 Proteína p16

Dos 32 casos de MAL analisados para a expressão de p16, 25 mostraram-se positivos (78%). Todos os casos positivos apresentaram imunomarcção de padrão nuclear (figura 1A) que, por vezes, era associada com marcação citoplasmática (19/25 tumores).

Dentre os casos que expressaram p16, quatro eram tumores delgados e 21 espessos. Treze tumores não eram ulcerados e 12 mostravam-se ulcerados.

Sete MAL não apresentaram expressão de p16, sendo três tumores delgados e quatro espessos. Três tumores não ulcerados e quatro lesões ulceradas não exibiram imunomarcção para essa proteína reguladora do ciclo celular. Todos os casos negativos foram submetidos às reações imunoistoquímicas por duas vezes.

A expressão de p16 em seis tumores mais espessos não era homogênea, mas apresentava-se em mosaico (figura 1B), com agrupamentos de células neoplásicas com expressão de p16, ao lado de agrupamentos celulares sem imunomarcção (casos 8, 10, 18, 19, 20, 23). Nos demais tumores os melanócitos neoplásicos do componente invasivo dérmico mostravam-se homogeneamente imunomarcados pelo anticorpo p16 (figura 1C). Em três casos de melanomas espessos (casos 17 e 24)

houve imunomarcção apenas no componente *in situ* do tumor (figura 1D).

5.3.2 Ciclina D1

Vinte e seis tumores foram submetidos à reação imunoistoquímica com o anticorpo monoclonal anti-ciclina D1 e 16 exibiram expressão da proteína (61,5%). Nos casos positivos os núcleos das células neoplásicas apresentaram-se imunomarcados (figura 1E).

Dois dos tumores delgados e 14 dos espessos apresentaram expressão de ciclina D1. Quando as lesões foram divididas de acordo com a presença de ulceração verificamos que oito de 13 tumores não ulcerados e ulcerados, respectivamente expressaram ciclina D1.

Em dois tumores (casos 2 e 12) observou-se expressão de ciclina D1 somente pelas células neoplásicas intraepidérmicas. Em outras duas lesões a expressão do componente intraepidérmico foi concomitante com a das células neoplásicas do componente invasivo da derme (figura 1F) (casos 10 e 20).

A expressão de ciclina D1, como o observado no material imunomarcado para a proteína p16, apresentou-se ora de forma difusa, ora em mosaico. Expressão dérmica difusa ocorreu em três tumores (casos 10, 16 e 18). Os demais apresentaram o padrão de marcação em mosaico no componente invasivo dos tumores, isto é, imunomarcção de agrupamentos de células neoplásicas ao lado de blocos celulares que não expressavam a proteína (figura 1 G e H).

5.3.3 CDK4

Vinte e cinco tumores foram submetidos à imunomarcção para CDK4. Vinte e uma lesões expressaram a proteína CDK4 (84%). Observou-se imunomarcção nuclear associada à marcação citoplasmática, como a descrita para a proteína p16, em 16/21 tumores (figura 2A).

Expressão do componente intraepidérmico dos tumores associada ao do componente invasivo (figura 2B), foi observada em quatro lesões (casos 1, 2, 5, 17). Os melanócitos intraepidérmicos do caso 6 classificado como MAL *in situ* também expressaram CDK4.

O padrão de expressão de CDK4 nos componentes invasivos dos tumores estudados foi de tipo difuso em 17 lesões (figura 2C) e, em mosaico, como o observado com os marcadores acima descritos, em apenas três lesões (figura 2D).

Todos os quatro tumores delgados (de até 1,0 mm de espessura), que foram submetidos à imunomarcção, expressaram CDK4. Dezesete dos tumores espessos apresentaram imunomarcção positiva. Onze dos 13 tumores não ulcerados submetidos à reação apresentaram expressão de CDK4, sendo que dez dos 12 tumores ulcerados mostraram-se imunomarcados pelo anticorpo.

5.3.4 Proteína do retinoblastoma

Vinte e seis lesões de MAL foram submetidas à técnica imunoistoquímica com o anticorpo anti-pRb e 22 foram imunomarcados

(85%). A expressão de pRb foi observada somente com o padrão nuclear (figura 2E).

Todos os quatro tumores delgados testados exibiram expressão de pRb. Dezoito das 22 lesões espessas mostraram-se imunomarcadas pelo anticorpo.

Onze de 13 tumores não ulcerados e ulcerados, respectivamente expressaram pRB.

Doze tumores apresentaram expressão de pRb no seu componente intraepidérmico associada a expressão do componente invasivo das lesões (figura 2F) (casos 1, 5, 10, 11,12, 16, 17, 18, 19, 23, 24, 28). O caso 6 (MAL *in situ*) e somente o componente *in situ* do caso 2 apresentaram expressão de pRb nos melanócitos intraepidérmicos.

Houve um predomínio do padrão de expressão em mosaico de pRb no componente invasivo dos tumores. Este foi observado em 16 das 22 lesões que expressavam pRb (figura 2G). Em somente três lesões observou-se imunomarcção difusa da massa tumoral dérmica (figura 2H).

Em 11 casos observou-se expressão concomitante dos quatro marcadores estudados (casos 2, 5, 8, 10, 14, 16, 18, 19, 20,23 e 29) (figura 3).

Somente um dos casos (caso 32) apresentou expressão de p16+/pRb+ e ciclinaD1-/CDK4-.

As tabelas 7, 8, 9 e 10 demonstram os resultados da expressão das proteínas da via do retinoblastoma nos casos de MAL estudados, de acordo com sua espessura e ausência ou presença de ulceração.

Figura 1. **Melanoma acral lentiginoso. Expressão de p16 (A – D).** A – Expressão de p16 dos núcleos de melanócitos intraepidérmicos do caso 6 (×200). B – Expressão de p16 com padrão em mosaico no componente invasivo do caso 8 (×100). C – Expressão de p16 com padrão difuso do caso 16 (×100). D – Expressão de p16 no componente intraepidérmico e da derme superficial – caso 17 (×200). **Expressão de ciclina D1 (E-H).** E – Expressão de ciclina D1 com padrão nuclear – caso 23 (×200). F – Expressão de ciclina D1 no componente intraepidérmico da lesão 12 (×200). G – Ciclina D1 com padrão difuso – caso 16 (×200). H – Expressão de ciclina D1 no componente dérmico do caso 20 com padrão em mosaico (×200). (Técnica imunoistoquímica - EnVision G/2 fosfatase alcalina e cromógeno *permanent red*).

Figura 1

Figura 2. **Melanoma acral lentiginoso. Expressão de CDK4 (A – D).** A – Expressão de CDK4 com padrão nuclear e citoplasmático no componente epidérmico da lesão 5 (×200). B – Melanócitos atípicos intraepidérmicos e invasivos com expressão nuclear e citoplasmática de CDK4 – caso 5 (×100). C – Caso 20 com expressão difusa de CDK4 no componente dérmico da lesão (×200). D – Expressão de CDK4 em mosaico no componente invasivo do caso 13 (×100). **Expressão de pRb (E – H).** E – Notar núcleos imunomarcados para pRb – caso 5 20 com expressão difusa de CDK4 no componente dérmico da lesão (×400). F – Expressão de pRb no componente intraepidérmico do caso 24 (×200). G – Padrão irregular de imunomarcção como anticorpo anti pRb nas células neoplásicas da derme do caso 8 (×200). H – Expressão de pRb de padrão difuso – caso 14 (×200). (Técnica imunoistoquímica - EnVision G/2 fosfatase alcalina e cromógeno *permanent red*).

Figura 2

Figura 3. **Melanoma acral lentiginoso** (caso 5). A – Expressão de p16 de padrão nuclear e citoplasmático no componente epidérmico e da derme superficial. B – Expressão nuclear de ciclina D1. C – Expressão nuclear e citoplasmática de CDK4. D – Expressão nuclear de pRb. (aumento original ×200) (Técnica imunoistoquímica - EnVision G/2 fosfatase alcalina e cromógeno *permanent red*).

Figura 3

Tabela 7. Expressão de p16, ciclina D1, CDK4 e proteína do retinoblastoma em melanomas acrais lentiginosos delgados.

Caso	P16		Ciclina D1		CDK4		pRb	
	Expressão	Padrão	Expressão	Padrão	Expressão	Padrão	Expressão	Padrão
1	Ausente	---	Ausente	---	Positiva	IS/derme difuso	Positiva	IS/derme difuso
2	Positiva (NC)	IS/derme focal	Positiva	IS*	Positiva (NC)	IS/derme superf.	Positiva	IS*
3	Ausente	---	NR	NR	NR	NR	NR	NR
4	Positiva	Difuso	NR	NR	NR	NR	NR	NR
5	Positiva	IS/derme difuso	Positiva	Mosaico/derme superficial	Positiva (NC)	IS/derme difuso	Positiva	IS/derme mosaico
6	Positiva (NC)	IS	Ausente	---	Positiva (NC)	IS	Positivo	IS
7	Ausente	---	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	4/7		2/4		4/4		4/4	

NC – expressão nuclear e citoplasmática; IS – componente intraepidérmico do tumor; IS* - expressão somente no componente in situ do tumor; derme superf. – componente dérmico superficial do tumor; derme S-P – componente dérmico do tumor superficial e profundo; NR – não realizada

Tabela 8. Expressão de p16, ciclina D1, CDK4 e proteína do retinoblastoma em melanomas acrais lentiginosos espessos.

Caso	P16		Ciclina D1		CDK4		pRB	
	Expressão	Padrão	Expressão	Padrão	Expressão	Padrão	Expressão	Padrão
8	Positiva (NC)	Mosaico	Positiva	Mosaico/derme profunda	Positiva	Difuso	Positiva	Mosaico
9	Positiva	Difuso	NR	NR	NR	NR	NR	NR
10	Positiva (NC)	Mosaico	Positiva	IS/derme superf.	Positiva (NC)	Difuso	Positiva	IS/derme mosaico
11	Positiva	Difuso	Ausente	---	Positiva (NC)	Difuso/derme superf.	Positiva	IS/derme mosaico
12	Ausente	---	Positiva	IS	NR	NR	Positiva	IS/derme superficial
13	Ausente	---	Ausente	---	Positiva (NC)	Mosaico/derme prof.	Positiva	Mosaico
14	Positiva	Difuso	Positiva	Mosaico/derme sup.	Positiva (NC)	Difuso	Positiva	Difuso
15	Ausente	---	Positiva	Mosaico/derme prof.	Ausente	---	Positiva	Mosaico
16	Positiva (NC)	Difuso	Positiva	Difuso	Positiva (NC)	Difuso	Positiva	IS/derme mosaico
17	Positiva	IS/derme ausente	Ausente	---	Positiva	IS/derme sup.	Positiva	IS/derme mosaico
18	Positiva (NC)	Mosaico	Positiva	Difuso	Positiva (NC)	Difuso	Positiva	IS/derme mosaico
19	Positiva (NC)	IS/derme mosaico	Positiva	Mosaico	Positiva (NC)	Difuso	Positiva	IS/mosaico
20	Positiva (NC)	IS/derme mosaico	Positiva	Mosaico/derme superf.	Positiva (NC)	Difuso	Positiva	Mosaico
21	Ausente	---	NR	NR	NR	NR	NR	NR
22	Positiva (NC)	Difuso	NR	NR	NR	NR	NR	NR
23	Positiva (NC)	Mosaico	Positiva	Mosaico	Positiva	Mosaico	Positiva	IS/derme difuso
24	Positiva (NC)	IS/derme ausente	Positiva	IS/derme mosaico	Ausente	---	Positiva	IS/derme mosaico
25	Positiva (NC)	Difuso	Positiva	Mosaico	ausente	---	Positiva	Mosaico
26	Positiva (NC)	Difuso	Ausente	---	Positiva (NC)	Difuso	Ausente	---
27	Positiva (NC)	Difuso	Ausente	---	Positiva (NC)	Difuso	Ausente	---
28	Positiva (NC)	IS/derme ausente	Ausente	---	Positiva (NC)	Difuso	Positiva	IS/derme mosaico
29	Positiva (NC)	Difuso	Positiva	Mosaico	Positiva (NC)	Difuso	Positiva	Mosaico
30	Positiva (NC)	Difuso	Positiva	IS/derme mosaico	Positiva (NC)	Difuso	Ausente	---
31	Positiva (NC)	Difuso	Ausente	---	Positiva	Mosaico/derme profunda	Ausente	---
32	Positiva (NC)	Difuso	Ausente	---	Ausente	---	Positiva	mosaico
21/25			14/22		17/21		18/22	

NC – expressão nuclear e citoplasmática; IS – componente intraepidérmico do tumor; sup – superficial; prof. – profunda; derme S-P – componente dérmico do tumor superficial e profundo; NR – não realizada.

Tabela 9. Expressão de p16, ciclina D1, CDK4 e proteína do retinoblastoma em melanomas acrais lentiginosos não ulcerados.

Caso	P16		Ciclina D1		CDK4		pRB	
	Expressão	Padrão	Expressão	Padrão	Expressão	Padrão	Expressão	Padrão
1	Ausente	---	Ausente	---	Positiva	IS/derme difuso	Positiva	IS/derme difuso
2	Positiva (NC)	IS/derme focal	Positiva	IS*	Positiva (NC)	IS/derme superf.	Positiva	IS*
3	Ausente	---	NR	NR	NR	NR	NR	NR
4	Positiva	Difuso	NR	NR	NR	NR	NR	NR
5	Positiva	IS/derme difuso	Positiva	Mosaico/derme superficial	Positiva (NC)	IS/derme difuso	Positiva	IS/derme mosaico
6	Positiva (NC)	IS	Ausente	---	Positiva (NC)	IS	Positiva	IS
7	Ausente		NR	NR	NR	NR	NR	NR
8	Positiva (NC)	Mosaico	Positiva	Mosaico/derme profunda	Positiva (NC)	Difuso	Positiva	Mosaico
9	Positiva	Difuso	NR	NR	NR	NR	NR	NR
11	Positiva	Difuso	Ausente	---	Positiva (NC)	Difuso/derme superf.	Positiva	IS/derme mosaico
15	Ausente	---	Positiva	Mosaico/derme profunda	Ausente	---	Positiva	Mosaico
16	Positiva (NC)	Difuso	Positiva	Difuso/derme S-P	Positiva (NC)	Difuso	Positiva	IS/derme mosaico
17	Positiva	IS/derme ausente	Ausente	---	Positiva	IS/derme superficial	Positiva	IS/derme mosaico
18	Positiva (NC)	Mosaico	Positiva	Difuso	Positiva (NC)	Difuso	Positiva	IS/derme mosaico
25	Positiva (NC)	Difuso	Positivo	Mosaico	Ausente	---	Positiva	Mosaico
30	Positiva (NC)	Difuso	Positivo	IS/derme mosaico	Positiva (NC)	Difuso	Ausente	---
31	Positiva (NC)	Difuso	Ausente	---	Positiva	Mosaico/derme profunda	Ausente	---
13/17			8/13		11/13		11/13	

NC – expressão nuclear e citoplasmática; IS – componente intraepidérmico do tumor; IS* - expressão somente no componente *in situ* do tumor; derme superf. – componente dérmico superficial do tumor; derme S-P – componente dérmico do tumor superficial e profundo; NR – não realizada.

Tabela 10. Expressão de p16, CDK4, ciclina D1 e proteína do retinoblastoma em melanomas acrais lentiginosos ulcerados.

<i>Caso</i>	P16		Ciclina D1		CDK4		pRB	
	<i>Expressão</i>	<i>Padrão</i>	<i>Expressão</i>	<i>Padrão</i>	<i>Expressão</i>	<i>Padrão</i>	<i>Expressão</i>	<i>Padrão</i>
10	Positiva (NC)	Mosaico	Positiva	IS/derme superficial	Positiva (NC)	Difuso	Positiva	IS/derme mosaico
12	Ausente	---	Positiva	IS	NR	NR	Positiva	IS/derme superficial
13	Ausente	---	Ausente	---	Positiva (NC)	Mosaico/derme profunda	Positiva	mosaico
14	Positiva	Difuso	Positiva	Mosaico/derme S-P	Positiva (NC)	Difuso	Positiva	difuso
19	Positiva (NC)	IS/mosaico na derme	Positiva	Mosaico	Positivo (NC)	Difuso	Positiva	IS/derme mosaico
20	Positiva (NC)	IS/ mosaico na derme	Positiva	Mosaico/derme S-P	Positivo (NC)	Difuso	Positiva	Mosaico
21	Ausente	---	NR	NR	NR	NR	NR	NR
22	Positiva (NC)	Difuso	NR	NR	NR	NR	NR	NR
23	Positiva (NC)	Mosaico	Positivo	Mosaico	Positiva	Mosaico	Positiva	IS/derme difuso
24	Positiva (NC)	IS/derme ausente	Positivo	IS/derme mosaico	Ausente	---	Positiva	IS/derme mosaico
26	Positiva (NC)	Difuso	Ausente	---	Positiva (NC)	Difuso	Ausente	---
27	Positiva (NC)	Difuso	Ausente	---	Positiva (NC)	Difuso	Ausente	---
28	Positiva (NC)	IS/derme ausente	Ausente	---	Positiva (NC)	Difuso	Positiva	IS/derme mosaico
29	Positiva (NC)	Difuso	Positivo	Mosaico	Positiva (NC)	Difuso	Positiva	mosaico
32	Positiva (NC)	Difuso	Ausente	---	Ausente	---	Positiva	mosaico
	12/15		8/13		10/12		11/13	

NC – expressão nuclear e citoplasmática; IS – componente intraepidérmico do tumor; derme S-P – componente dérmico do tumor superficial e profundo; NR – não realizada.

5.4 Análise estatística dos resultados.

A tabela com os dados categóricos da expressão de cada um dos marcadores nos casos de MAL estudados estão no anexo 1.

As comparações da expressão de p16, ciclina D1, CDK4 e pRb dos tumores agrupados por espessura (delgados e espessos), assim como pela ausência ou presença de ulceração não demonstraram diferenças estatisticamente significativas (ver tabela 11).

Tabela 11. Comparação da expressão de p16, cdk4, ciclina D1 e pRb em melanomas acrais lentiginosos de acordo com a espessura (delgados x espessos) e ausência e presença de ulceração.

Expressão	MAL Delgado			MAL espesso			
	Positiva	Ausente	n	Positiva	Ausente	n	
P16	4 (57%)	3 (43%)	7	21 (84%)	4 (16%)	25	NS
Ciclina D1	2 (50%)	2 (50%)	4	14 (64%)	8 (36%)	22	NS
CDK4	4 (100%)	0	4	17 (81%)	4 (19%)	21	NS
pRb	4 (100%)	0	4	18 (82%)	4 (18%)	22	NS

Expressão	MAL não ulcerado			MAL ulcerado			
	Positiva	Ausente	n	Positiva	Ausente	n	
P16	13 (76%)	4 (24%)	17	12 (80%)	3 (20%)	15	NS
Ciclina D1	8 (62%)	5 (38%)	13	8 (62%)	5 (62%)	13	NS
CDK4	11 (85%)	2 (15%)	13	10 (83%)	2 (17%)	12	NS
pRb	11 (85%)	2 (15%)	13	11 (85%)	2 (15%)	13	NS

MAL – melanoma acral lentiginoso; NS – diferença não significativa ($p > 0,05$)
 Comparação pelo teste exato de Fisher – bicaudal.

Fez-se também a correlação da expressão positiva dos diferentes marcadores que se associam a expressão positiva e negativa desses mesmos marcadores (Kishimoto *et al.*, 2008). Observou-se haver diferença entre a expressão positiva de pRb associada com expressão positiva de ciclina D1, e a expressão positiva de pRb com a expressão negativa de ciclina D1 (pRb+/Ciclina D1+ e pRb+/Ciclina D1-), assim como da expressão positiva de ciclina D1 associada com expressão positiva de pRb e a expressão positiva de ciclina D1 associada com expressão negativa de pRb (ciclina D1+/pRb+ e ciclina D1+/pRb-) (ver tabela 12).

Tabela 12. Correlação das frequências de expressão das proteínas p16, ciclina D1, CDK4 e pRb no melanoma acral lentiginoso.

	n	p16+	Ciclina D1 +	CDK4+	pRb+
p16					
+	22	<i>blank</i>	14 (70%)	18 (82%)	16 (73%)
-	7	<i>blank</i>	3 (43%)	3 (43%)	5 (71%)
			NS	NS	NS
Ciclina D1					
+	16	14 (87%)	<i>blank</i>	12 (75%)	15 (94%)
-	10	8 (80%)	<i>blank</i>	9 (90%)	6 (60%)
		NS		NS	$p < 0,05$
CDK4					
+	21	19 (90%)	12 (57%)	<i>blank</i>	16 (76%)
-	5	3 (60%)	3 (60%)	<i>blank</i>	5 (100%)
		NS	NS		NS
pRb					
+	21	17 (81%)	15 (71%)	16 (76%)	<i>blank</i>
-	4	3 (75%)	1 (25%)	3(75%)	<i>blank</i>
		NS	$P < 0,05$	NS	

Comparação pelo teste exato de Fisher bicaudal.

6. DISCUSSÃO

A casuística de nosso estudo compreendeu 32 lesões de melanoma acral lentiginoso, selecionados dos arquivos do Laboratório de Dermatopatologia da Divisão de Clínica Dermatológica do HCFMUSP, do período de 1991 a 2007, cujo critério de seleção, além do diagnóstico de MAL foi o de haver material tecidual suficiente para o estudo.

A idade dos doentes (média de 62,4 anos) é semelhante àquela dos dados da literatura que relatam a maior incidência de MAL na sexta e sétima década de vida (; Kato *et al.*, 1999; Kuchelmeister *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Maia *et al.*, 2003; Swan e Hudson, 2003; Chang *et al.*, 2004; Ferrari *et al.*, 2008).

Verificamos uma maior proporção de doentes do sexo feminino (21 mulheres: 11 homens). Segundo os dados da literatura a frequência do MAL não demonstra diferenças quanto ao sexo dos doentes (Kato *et al.*, 1999; Kuchelmeister *et al.*, 2000; Ishihara *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2004;). Na pesquisa de Chana *et al.* (2000) os autores encontraram uma proporção de 41 mulheres: 27 homens.

Em nosso estudo, por ser de natureza retrospectiva, não obtivemos, para todos os doentes, os dados quanto à raça ou cor da pele. Dos 32 doentes estudados havia a referência de raça, em seus prontuários ou fichas de requisição de exame anatomopatológico, em apenas quinze. Oito eram referidos como da raça branca e seis negros.

O MAL é a variante anatomoclínica de melanoma com maior incidência em indivíduos de origem africana, asiáticos e miscigenados (Cress e Holly, 1997; Sampaio e Rivitti, 2000; Ishihara *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 2004). Acredita-se que a etnia teria uma influência fundamental na incidência, distribuição anatômica, tipo histológico e evolução do melanoma maligno (Swan e Hudson, 2003).

Apesar de não podermos afirmar a origem étnica de todos os doentes estudados, os dados do censo populacional do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística de 2000, relatam que 45% de nossa população é composta por indivíduos da raça negra, pardos e indígenas. Mesmo na região Sudeste do Brasil, 36% da população é composta por esses grupos étnicos (www.ibge.gov.br/servidor-arquivos-est). De acordo com esses dados, e pelas características dos doentes que procuram atendimento no Hospital das Clínicas FMUSP, podemos sugerir que muitos dos 17 doentes, cuja cor ou raça não foi relatada, podem pertencer à raça negra ou serem de origem miscigenada.

Vinte e nove dos MAL estudados localizavam-se na pele espessa dos pés e somente três na pele palmar e quirodáticos. Os dados de nossa casuística, quanto à localização dos tumores é concordante com os da literatura (Cress e Holly, 1997; Kato *et al.*, 1999; Kuchelmeister *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Swan e Hudson, 2003; Kwon *et al.*, 2004).

A alta incidência de MAL na pele da região plantar fez Chang *et al.* (2004) sugerirem a possibilidade da exposição a agrotóxicos como provável

fator etiológico do MAL na população taiwanesa. Na nossa casuística não encontramos dados quanto às atividades laborais dos doentes.

Os tumores espessos (espessura > 1,0mm) predominaram na casuística estudada (25/32 casos ou 78%) e 15 das 32 lesões eram ulceradas (47%). Os MAL são diagnosticados numa fase mais avançada, muitas vezes com metástases regionais, em doentes asiáticos e negros, quando comparados com população branca (Cress e Holly, 1997). Apesar de haver predomínio de tumores espessos e mesmo ulcerados no nosso estudo, não encontramos referências de metástases comprovadas nos prontuários dos doentes.

O MAL difere dos outros tipos clinicopatológicos do melanoma por não haver a influência da exposição solar como fator predisponente.

A maioria dos trabalhos que enfocam as alterações genéticas e expressão de proteínas relacionadas ao controle do ciclo celular no melanoma maligno, têm em sua casuística tumores primários e metastáticos de tipos clinicopatológicos mais frequentes que o MAL (revisados por Li *et al.*, 2006).

São poucos os estudos que analisam a expressão das proteínas envolvidas na via do retinoblastoma, através de técnicas de imunoistoquímica (Wang *et al.*, 1996; Morita *et al.*, 1998; Vuhahula *et al.*, 2000) ou por citometria de fluxo de material celular tumoral (Chana *et al.*, 2000) no MAL.

Realizamos a demonstração, através de técnica imunoistoquímica, das proteínas p16, ciclina D1, CDK4 e pRb nas lesões de MAL.

Optamos por fazer uma análise comparativa da expressão desses marcadores nos tumores agrupados quanto à sua espessura e presença de ulceração. Esses dois parâmetros do microestadiamento dos melanomas são os que têm maior valor prognóstico (Balch *et al.*, 2001).

Expressão de p16

Vinte e cinco tumores (78%) apresentaram expressão de p16. Todos exibiram imunomarcção nuclear, que foi a considerada como expressão positiva. A presença de imunomarcção citoplasmática concomitante com a nuclear foi observada em 75% dos casos. Na literatura, outros autores também observaram marcação citoplasmática e nuclear de p16 no melanoma (Wang *et al.* 1996; Sanki *et al.*, 2007).

A marcação nuclear e citoplasmática com o anticorpo anti-p16, segundo a literatura, é relacionada com a proteína p16 selvagem. Alguns autores relacionam a expressão citoplasmática de p16, como artefactual e resultante de possíveis alterações devidas às técnicas de exposição antigênica, como a do uso do tampão citrato aquecido em forno de micro-ondas (Talve *et al.*, 1997; Alonso *et al.*, 2004). Entretanto, a localização citoplasmática de proteína p16 foi demonstrada através de técnicas de microscopia de varredura confocal (Keller-Melchior *et al.*, 1997) e por técnicas de imunoelétrón microscopia (Evangelou *et al.*, 2004).

Em seis casos de MAL o padrão de marcação do componente invasivo do tumor não foi difuso, mas em mosaico. Aspecto semelhante foi observado em melanomas nodulares espessos (Straume *et al.*, 2000).

Dois tumores *in situ* (casos 3 e 7) e um delgado (caso 1) não expressaram p16. Por outro lado, em três casos de MAL espessos (casos 17, 24 e 28) observamos expressão de p16 somente no seu componente intraepidérmico. Esse aspecto foi também observado por outros autores (Sparrow *et al.*, 1998) e que sugeriram que a perda de expressão de p16 seria evento estritamente temporal na tumorigênese do melanoma (Sanki *et al.*, 2007).

Ao compararmos a frequência de positividade de p16 nas lesões de MAL de nosso estudo com os da literatura, verificamos que Wang *et al.* (1996) encontraram expressão de p16 em apenas 16% de 19 melanomas por eles estudados, sendo 15 lesões do tipo MAL. Vuhahula *et al.* (2000) descrevem haver perda de expressão de p16 em 50% de 28 MAL de sua casuística.

Poderíamos interpretar a alta frequência da expressão de p16 de nossa casuística como uma supervalorização da imunomarcção dos componentes celulares dos tumores. Entretanto, consideramos expressão positiva de p16 quando mais de 10% das células neoplásicas de campos microscópicos de 400× eram imunomarcadas pelo anticorpo específico, como o proposto na literatura (Tanaka *et al.*, 2001). Além disso, permanece a dúvida se a técnica de imunoistoquímica pode identificar, com certeza, as lesões melanocíticas com alteração gênica de p16 (Sparrow *et al.*, 1998).

Não encontramos diferenças significativas entre a expressão de p16 nos tumores delgados e espessos. O número de tumores delgados (7 casos) foi pequeno em relação ao dos espessos (25 casos). Talvez se tivéssemos

comparado grupos com maior número de casos delgados poderíamos ter observado diferenças. De acordo com os dados da literatura, as lesões de MAL, por ocasião de seu diagnóstico, são lesões de curso mais avançado e, portanto, já em fase de crescimento vertical e de espessura maior (Cress e Holly, 1997).

Os dados da literatura são conflitantes quanto à perda de expressão de p16 nos melanomas mais espessos. Alguns autores referem haver uma correlação entre a espessura do tumor e a perda da expressão de p16 (Sparrow *et al.*, 1998). Haveria uma tendência para a perda de expressão de p16 à medida que os tumores tornam-se mais espessos (Pavey *et al.*, 2002). Por outro lado, outros autores não encontraram relação entre espessura do melanoma e perda de expressão de p16 (Reed *et al.*, 1995; Straume *et al.*, 2000; Sanki *et al.*, 2007). Nos tumores metastáticos os dados da literatura são também divergentes. Há relatos de perda de expressão de p16 nas lesões metastáticas (Alonso *et al.*, 2004), índices de imunomarcacão semelhantes aos de tumores primários (Sparrow *et al.*, 1998; Sanki *et al.*, 2007) e mesmo, expressão de p16 por melanócitos metastáticos cujas lesões primárias exibiam perda de expressão dessa proteína (Morita *et al.*, 1998).

Em trabalho recente, com vários tipos clinicopatológicos de melanoma, não encontramos relação entre a expressão de p16, avaliada pela técnica de imunoistoquímica, e a espessura das neoplasias (Hsieh *et al.*, 2006).

A frequência de expressão de p16 também não diferiu quando os tumores foram comparados de acordo com a presença de ulceração, apesar de esta ser a segunda característica de maior importância prognóstica dos melanomas em geral (Balch *et al.*, 2001). Essa observação está de acordo com dados da literatura para outros tipos clinicopatológicos de melanoma (Sanki *et al.*, 2007).

O MAL é melanoma não relacionado ao fator predisponente da fotoexposição excessiva. Dados da literatura demonstram a manutenção de expressão de p16 em melanomas, de outros tipos clinicopatológicos, localizados em pele de áreas protegidas da radiação ultra-violeta. Essas observações sugerem a possibilidade de que outras proteínas supressoras poderiam estar envolvidas no desenvolvimento desses melanomas (Winnepenninckx e van der Oord, 2004).

Pelos resultados obtidos, assim como pela análise daqueles dados conflitantes da literatura acima comentados, podemos especular se as técnicas de imunoistoquímica podem realmente identificar as lesões melanocíticas com alteração gênica de p16.

Expressão de ciclina D1

A ciclina D1 é uma proteína nuclear codificada pelo gene CCND1 e é sintetizada na fase G1 inicial do ciclo celular. É um regulador positivo da transição G1-S do ciclo celular. A sua expressão no melanoma é considerada como evidência de seu papel oncogênico na patogenia do melanoma (Li *et al.* 2006).

A imunomarcção para ciclina D1 por 5% ou mais das células neoplásicas de um tumor já é considerada como uma expressão excessiva da proteína (Kishimoto *et al.* 2008). Além disso, há ausência de sua expressão nas lesões melanocíticas benignas (Alonso *et al.*, 2004)

Demonstramos, através de técnica de imunoistoquímica, a expressão de ciclina D1 em 61,5% dos MAL (16/22 tumores). Observou-se imunomarcção somente nuclear com esse anticorpo. A expressão de ciclina D1 do componente invasivo dos tumores ocorreu, como o observado para p16, de forma difusa ou em focos (padrão em mosaico). Essa imunomarcção em mosaico foi também descrita em outros tipos de neoplasias, como o carcinoma gástrico (Kishimoto *et al.* 2008).

Não houve diferença significativa quanto à expressão de ciclina D1 entre os tumores delgados e espessos, assim como quando comparados pela ausência ou presença de ulceração. Não encontramos dados da literatura sobre a expressão de ciclina D1 no MAL. Entretanto, nossos resultados são concordantes com os da literatura que analisaram a expressão de ciclina D1 em melanomas de tipo extensivo superficial, nodular e lentigo maligno (Georgieva *et al.*, 2001; Ramirez *et al.* 2005).

Cinco MAL apresentaram expressão de ciclina D1 no seu componente intraepidérmico (casos 2, 10, 12, 24 e 30), sendo um deles delgado e os demais espessos. Outros trabalhos relatam maior expressão desse marcador nos melanomas intraepidérmicos ou em fase radial, que nas lesões invasivas de fase vertical (Sauter *et al.*, 2002; Alonso *et al.*, 2004; Ramirez *et al.*, 2005).

O papel da ciclina D1 no desenvolvimento e progressão do melanoma é controverso. Alguns trabalhos referem não haver diferenças entre a expressão de ciclina D1 entre nevos e melanoma (Florenes *et al.*, 2000; Georgieva *et al.*, 2001). Outros relatam produção excessiva dessa ciclina nos melanomas (Inohara *et al.*, 1996; Coupland *et al.*, 1998). Além disso, a expressão de ciclina D1 em melanomas primários não se correlaciona com a presença de metástases e, portanto, não teria papel importante na progressão do melanoma para um fenótipo metastático (Ramirez *et al.*, 2005).

Entre os casos de MAL estudados não havia referência de metástases comprovadas por ocasião da retirada das lesões. Entretanto, a frequência de expressão de ciclina D1 foi observada em 64% das lesões espessas, que têm potencial metastático inequívoco.

Expressão de CDK4

A expressão de CDK4 foi observada em 84% dos MAL estudados. A imunomarcção pelo anticorpo anti-CDK4 mostrou padrão nuclear que se associou em 16 lesões (64%) ao padrão citoplasmático. Wang *et al.* (1996) ao estudar 19 melanomas, entre os quais 15 MAL, observaram imunomarcção nuclear e citoplasmática em 11 lesões (58%).

A expressão citoplasmática de CDK4 é explicada pelo fato de que o transporte de ciclinas do citoplasma para o núcleo celular se faz sob a forma de complexos com as CDK. Nas neoplasias haveria uma alteração do

balanço da produção de CDK4 em comparação com a de ciclina D1 (Wang *et al.*, 1996).

Em 15 tumores houve imunomarcacão difusa da lesão e o padrão em mosaico foi observado em três. A expressão heterogênea de CDK4 poderia ser explicada como uma alteração dinâmica que ocorreria durante a progressão tumoral (Wang *et al.*, 1996).

Em seis lesões (casos 1, 2, 5, 6, 11 e 17) observamos expressão de CDK4 pelo componente *in situ* ou nas porções superficiais do componente invasivo do tumor. Esse aspecto foi também relatado por outros autores (Wang *et al.*, 1996; Georgieva *et al.* 2001). A expressão de CDK4 na fase radial de crescimento dos melanomas sugere que a atividade de CDK4 é um evento precoce na tumorigênese do melanoma (Wang *et al.*, 1996).

Assim como para os outros marcadores, não se observou diferenças significativas quanto à imunoexpressão de CDK4 de acordo com a espessura ou ulceração dos tumores. Georgieva *et al.* (2001) também não encontraram correlação entre a expressão dessa proteína e o microestadiamento de melanomas.

A expressão de CDK4 é observada somente nos melanomas, sendo negativa nas lesões melanocíticas benignas (Wang *et al.*, 1996). A imunomarcacão nuclear de CDK4 foi relatada em 81% dos casos de melanoma nodular. A maior freqüência de expressão associou-se com a espessura das lesões (Bachmann *et al.*, 2004).

Poderíamos, desse modo, valorizar a alta freqüência, em nosso estudo, de lesões de MAL que expressaram CDK4, como reflexo de uma

produção excessiva dessa proteína que poderia estar relacionada com alterações da via p16/ciclina D1/CDK4/pRb do controle celular, na tumorigênese do MAL.

Expressão de pRb

A proteína pRb atua como um controlador (*gate-keeper*) que previne que as células passem da fase G1 para a fase S do ciclo celular. A inativação de pRb nos melanomas pode ocorrer como resultado de sua fosforilação de sítios na região C-terminal, pela atuação dos complexos ciclina/CDK (Chamas *et al.*, 2003).

Houve expressão de pRb em 85% dos Mal estudados. Todos os quatro tumores delgados e 82% dos tumores espessos expressaram esse marcador.

A imunomarcação ocorreu somente com o padrão nuclear e em 16 casos a marcação do componente invasivo foi irregular, do tipo em mosaico como o observado para os outros marcadores. Padrão de marcação heterogênea de pRb (em *hot spots*) na massa tumoral de melanomas nodulares foi também descrita por Bachmann *et al.* (2004) em seu estudo.

Expressão de pRb no componente intraepidérmico esteve presente em 14 das lesões de MAL, associada ou não a expressão no componente invasivo.

Não encontramos diferenças significativas na expressão de pRb quando comparados os tumores de acordo com a espessura e presença de ulceração. Relatos da literatura demonstram que nos melanomas primários

ocorre correlação da perda de expressão de pRb com o nível de invasão das lesões (Korabiowska *et al.*, 2001).

Os dados da literatura também são conflitantes quanto à expressão de pRb e seu significado no melanoma. A expressão de pRb nos melanomas seria maior que a de lesões melanocíticas benignas, e é observada tanto nas lesões primárias como metastáticas (Saenz-Santamaria *et al.*, 1995). Outros dados da literatura, por outro lado, referem haver correlação da perda de expressão de pRb com o maior nível de invasão das lesões (nível de Clark) e sobrevida dos doentes (Korabiowska *et al.*, 2001).

Observamos que, no MAL, a expressão de pRb é conservada na grande maioria das lesões, mesmo que espessas e ulceradas. Uma explicação para isso seria a observação de Roesch *et al.* (2005) que demonstraram haver um homólogo da pRb – o homólogo 1 da pRb-2, que estaria diminuído ou ausente na progressão do melanoma e atuaria como fator modulador da pRb. Segundo os autores o controle do ciclo celular no melanoma maligno seria devido a uma falha na atividade da pRb e não na ausência de sua expressão ou mutação.

Correlação da expressão de p16/ciclina D1/CDK4/pRb no MAL.

Esperaríamos encontrar lesões de MAL que apresentassem padrão de expressão p16-/ciclina D1+/CDK4+/pRb-. Entretanto, em nenhum dos casos foi verificado esse padrão de expressão das proteínas envolvidas na via do pRB. Por outro lado, encontramos somente uma lesão (caso 32) com

padrão p16+/ciclina D1-/CDK4-/pRb+. Em 11 casos houve a expressão concomitante de todos os marcadores estudados.

Nos melanomas nodulares a presença de expressão de pRb relacionou-se à perda de expressão de p16 (Bachmann *et al.*, 2004). Em nossa casuística somente quatro lesões apresentaram expressão de pRb e ausência de expressão de p16.

Ao fazermos uma comparação da associação de presença de expressão de cada um dos quatro marcadores com os casos positivos e negativos, para os quatro marcadores (como o proposto por Kishimoto *et al.* (2008) para o carcinoma gástrico) observamos haver uma correlação entre a expressão de pRb e ciclina D1. Nessa análise houve diferença entre o número de casos que expressam pRb associados com a ausência de expressão de ciclina D1 e também o oposto (ciclina D1+/pRb-).

É importante, ainda comentar que, o padrão em mosaico de expressão para os marcadores estudados foi observado com frequência nos tumores analisados. Podemos descartar a possibilidade de que essa observação represente problemas com a fixação dos tecidos, com conseqüente ausência de imunomarcacão. Tumores com marcação em mosaico para um dos anticorpos, apresentaram imunomarcacão difusa e homogênea para outros anticorpos. Além disso, outros autores também referem o padrão de imunomarcacão em mosaico no melanoma (Wang *et al.*, 1996; Straume *et al.*, 2000; Bachmann *et al.*, 2004) e mesmo em outros processos neoplásicos (Kishimoto *et al.*, 2008). Essa observação é importante principalmente quando do estudo de séries de tumores através

de *tissue microarrays* (TMA). Os arranjos teciduais por TMA têm a grande vantagem de se poder analisar séries grandes de tumores, submetidos ao mesmo tempo às técnicas de imunoistoquímica o que confere confiabilidade maior à técnica e aos resultados obtidos. Entretanto, como as amostras para estudo de cada um dos tumores são pequenas, estas poderiam ser colhidas nas áreas dos tumores onde não ocorre a expressão dos marcadores estudados.

O conjunto dos nossos resultados sugere que a expressão das proteínas da via p16/ciclina D1/CDK4/pRb é aberrante no MAL, uma vez que apesar da alta frequência de expressão de proteínas supressoras do ciclo celular ocorre, igualmente com alta frequência, a expressão de ciclina D1/CDK4 promotoras da divisão celular.

Além disso, a análise de cada um dos marcadores isoladamente pode não refletir essa provável alteração e, portanto os mesmos não teriam utilidade como marcadores prognósticos das lesões.

Embora o MAL represente um tipo anatomoclínico menos frequente do melanoma, a análise de coleções maiores desses tumores, com abordagem não apenas por imunoistoquímica, mas também em nível molecular, faz-se necessária para a melhor compreensão desse tipo peculiar de melanoma.

7. CONCLUSÕES

- A expressão das proteínas da via p16/ciclinaD1/CDK4/pRb foi observada em 78% (p16), 61,5 % (ciclina D1), 84% (CDK4) e 85% (pRb) das lesões de melanoma acral lentiginoso.
- Não houve diferença na expressão de cada um dos marcadores quando comparados os melanomas acrais lentiginosos delgados (até 1,0 mm de espessura) e espessos (mais de 1,0 mm de espessura).
- Não houve diferença de expressão de cada uma das proteínas quando foram comparadas as lesões não ulceradas e ulceradas de melanoma acral lentiginoso.
- A expressão de ciclina D1 e CDK4, nos melanomas acrais lentiginosos, pode ser considerada aberrante e reflexo de provável alteração na via supressora de tumores p16/ciclinaD1/CDK4/pRb.
- A expressão tecidual de p16 e pRb, demonstrada pela técnica imunoistoquímica, pode não refletir as prováveis alterações da via supressora de tumores estudada.
- Esses marcadores, isoladamente, não devem ser considerados como fatores prognósticos no melanoma acral lentiginoso.

8. Anexo 1 – Expressão das proteínas p16, ciclina D1, CDK4 e do retinoblastoma em melanomas acrais lentiginosos.

	p16	Ciclin	CDK4	pRb
1	0	0	1	1
2	1	1	1	1
3	0	NR	NR	NR
4	1	NR	NR	NR
5	1	1	1	1
6	1	0	1	1
7	0	NR	NR	NR
8	1	1	1	1
9	1	NR	NR	NR
10	1	1	1	1
11	1	0	1	1
12	0	1	NR	1
13	0	0	1	1
14	1	1	1	1
15	0	1	0	1
16	1	1	1	1
17	1	0	1	1
18	1	1	1	1
19	1	1	1	1
20	1	1	1	1
21	0	NR	NR	NR
22	1	NR	NR	NR
23	1	1	1	1
24	1	1	0	1
25	1	1	0	1
26	1	0	1	0
27	1	0	1	0
28	1	0	1	1
29	1	1	1	1
30	1	1	1	0
31	1	0	1	0
32	1	0	0	1

CDK4 – quinase dependente de ciclina 4; pRb – proteína do retinoblastoma; 1 – expressão positiva; 0 – ausência de expressão; NR – reação não realizada.

9. REFERENCIAS

1. 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: 193–203.
2. Avbelj M, Hocevar M, Trebusak-Podkrajsek K, Krzisnik C, Battelino T. A novel L94Q mutation in the CDKN2A gene in a melanoma kindred. *Melanoma Res.* 2003; 13: 567-70.
3. Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Altered expression of cell cycle regulators Cyclin D1, p14, p16, CDK4 and Rb in nodular melanomas. *Int J Oncol.* 2004; 25: 1559-65.
4. Baker GL, Landis MW, Hinds PW. Multiple functions of D-type cyclins can antagonize pRb-mediated suppression of proliferation. *Cell Cycle.* 2005; 4: 330-8.
5. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 3635–48.

6. Bastuji-Garin S, Diepgen TL. Cutaneous malignant melanoma, sun exposure, and sunscreen use: epidemiological evidence. *Br J Dermatol*. 2002; 146 (Suppl 61): 24-30.

7. Bellows CF, Belafsky P, Fortgang IS, Beech DJ. Melanoma in African-Americans: trends in biological behavior and clinical characteristics over two decades. *J Surg Oncol*. 2001; 78: 10-6.

8. Castellano M, Pollock PM, Walters MK, Sparrow LE, Down LM, Gabrielli BG, Parsons PG, Hayward NK. CDKN2A/p16 is inactivated in most melanoma cell lines. *Cancer Res*. 1997; 57: 4868-75.

9. Chammas R, Duarte APM, Otake AH, Costa M. 1. Genética e biologia molecular do melanoma e de sua progressão. In Oliveira Filho RS. Melanoma cutâneo localizado e linfonodo sentinela. São Paulo. Lemar. 2003. pp. 1-19.

10. Chana JS, Grover R, Wilson GD, Hudson DA, Forders M, Sanders R, Grobbelaar AO. An analysis of p16 tumour suppressor gene expression in acral lentiginous melanoma. *Br J Plast Surg*. 2000; 53: 46-50.

11. Chang JW, Yeh KY, Wang CH, Yang TS, Chiang HF, Wei FC, Kuo TT, Yang CH. Malignant melanoma in Taiwan: a prognostic study of 181 cases. *Melanoma Res*. 2004; 14: 537-41.

12. Chang TG, Wang J, Chen LW, Hsu CY, Chang HW, Chen JS *et al.* Loss of expression of the p16 gene is frequent in malignant skin tumors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 230: 85-8.
13. Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest.* 2005; 15: 813-24.
14. Cormier JN, Xing Y, Ding M, Lee JE, Mansfield PF, Gershenwald JE, Ross MI, Du XL. Ethnic differences among patients with cutaneous melanoma. *Arch Intern Med.* 2006; 166: 1907-14.
15. Coupland SE, Bechrakis N, Schüler A, Anagnostopoulos I, Hummel M, Bornfeld N, Stein H. Expression patterns of cyclin D1 and related proteins regulating G1-S phase transition in uveal melanoma and retinoblastoma. *Br J Ophthalmol.* 1998; 82: 961-70.
16. Cress RD, Holly EA. Incidence of cutaneous melanoma among non-Hispanic whites, Hispanics, Asians, and blacks: an analysis of California cancer registry data, 1988-93. *Cancer Causes Control.* 1997; 8: 246-52.
17. Czajkowski R, Drewa T, Woźniak A, Krzyżyńska-Malinowska E. Cell cycle in sporadic melanoma. *Int J Dermatol.* 2002; 41: 550-6.

18. Dahl C, Guldberg P. The genome and epigenome of malignant melanoma. *APMIS*. 2007; 115: 1161-76.
19. Evangelou K, Bramis J, Peros I, Zacharatos P, Dasiou-Plakida D, Kalogeropoulos N, Asimacopoulos PJ, Kittas C, Marinos E, Gorgoulis VG. Electron microscopy evidence that cytoplasmic localization of the p16(INK4A) “nuclear” cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) in tumor cells is specific and not an artifact. A study in non-small cell lung carcinomas. *Biotech Histochem*. 2004; 79: 5–10.
20. Fernandes NC, Calmon R, Maceira JP, Cuzzi T, Silva CSC. Melanoma cutâneo: estudo prospectivo de 65 casos. *Anais Bras Dermatol*. 2005; 80: 25-34.
21. Ferrari Júnior NM, Muller H, Ribeiro M, Maia M, Sanches Junior JA. Cutaneous melanoma: descriptive epidemiological study. *Sao Paulo Med J*. 2008;126: 41-7.
22. Florenes VA, Faye RS, Maelandsmo GM, Nesland JM, Hola 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: 3614-20.

23. Funk JO, Schiller PI, Barrett MT, Wong DJ, Kind P, Sander CAa. p16^{ink4a} expression is frequently decreased and associated with 9p21 loss of heterozygosity in sporadic melanoma. *J Cutan Pathol.* 1998; 25: 291-6.

24. 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: 229-35.

25. Gray-Schopfer VC, Cheong SC, Chong H, Chow J, Moss T, Abdel-Malek ZA, Marais R, Wynford-Thomas D, Bennett DC. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer.* 2006; 95: 496-505.

26. Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol.* 1996; 16: 859-67.

27. Hayward, NK. Genetics of melanoma predisposition. *Oncogene.* 2003; 22: 3053-3062.

28. Hsieh R, Sousa FB, Firmiano A, Nunes FD, Magalhães MHCG, Sotto MN. Estudo genético do gene p16 pela técnica de PCR-SSCP e expressão de proteína p16 em melanomas de mucosa oral e melanomas cutâneos. *An bras Dermatol.* 2006; 81: 433-41.

29. Hussein MR. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *J Cutan Pathol*. 2005; 32: 191-205.
30. Hutcheson AC, McGowan JW 4th, Maize JC Jr, Cook J. Multiple primary acral melanomas in African-Americans: a case series and review of the literature. *Dermatol Surg*. 2007; 33: 1-10.
31. Inohara S, Kitagawa K, Kitano Y. Expression of cyclin D1 and p53 protein in various malignant skin tumors. *Dermatology*. 1996; 192: 94-8.
32. Ishihara K, Saida T, Yamamoto A. Updated statistical data for malignant melanoma in Japan. *Int J Clin Oncol*. 2001; 6: 109–116.
33. Israels ED, Israels LG. The cell cycle. *Oncologist*. 2000; 5: 510-3.
34. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitian SV et al. A cell regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*. 1994; 264: 436-40.
35. Kato T, Suetake T, Tabata N, Takahashi K, Tagami H. Epidemiology and prognosis of plantar melanoma in 62 Japanese patients over a 28-year period. *Int J Dermatol*. 1999; 38: 515-519.

36. 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: 932–8.
37. Kim YC, Lee MG, Choe SW, Lee MC, Chung HG, Cho SH. Acral lentiginous melanoma: an immunohistochemical study of 20 cases. *Int J Dermatol.* 2003; 42: 123-129.
38. Kishimoto I, Mitomi H, Ohkura Y, Kanazawa H, Fukui N, Watanabe M. Abnormal expression of p16(INK4a), Cyclin D1, Cyclin-Dependent Kinase 4 and Retinoblastoma protein in gastric carcinomas. *J Surg Oncol.* 2008; 15: 1-7.
39. Korabiowska M, Ruschenburg I, Stachura BH, Schiott T, Cardo CC, Brinck U. Downregulation of the retinoblastoma gene expression in the progression of malignant melanoma. *Pathobiology.* 2001; 69: 274-80.
40. Krementz ET, Feed RJ, Coleman WP 3rd, Sutherland CM, Carter RD, Campbell M. Acral lentiginous melanoma. A clinicopathologic entity. *Ann Surg.* 1982; 195: 632-45.
41. Kuchelmeister C, Schaumburg-Lever G, Garbe C. Acral cutaneous melanoma in caucasians: clinical features, histopathology and prognosis in 122 patients. *Br J Dermatol.* 2000; 143: 275-280.

42. Kwon IH, Lee JH, Cho KH. Acral lentiginous melanoma in situ: a study of nine cases. *Am J Dermatopathol*. 2004; 26: 285-9.
43. 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: 287- 301.
44. Liggett Jr WH, Sidransky D. Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 1197-1206.
45. Lukas J, Aagaard L, Strauss M, Bartek J. Oncogenic aberrations of p16INK4/CDKN2 and cyclin D1 cooperate to deregulate G1 control. *Cancer Res*. 1995; 55: 4818-23.
46. Lukas J, Sørensen CS, Lukas C, Santoni-Rugiu E, Bartek J. p16INK4a, but not constitutively active pRb, can impose a sustained G1 arrest: molecular mechanisms and implications for oncogenesis. *Oncogene*. 1999; 18: 3930-5.
47. Maia M, Ferrari N, Russo C. Reflexões em relação à epidemiologia do melanoma cutâneo no Brasil. *Anais bras Dermatol*. 2002; 77: 163-170.

48. Maia M, Ferrari N, Russo C, Ribeiro MC. Melanoma acrolentiginoso: um desafio ao diagnóstico precoce. *Anais bras Dermatol.* 2003; 78: 553-560.
49. Morita R, Fujimoto A, Hatta N, Takehara K, Takata M. Comparison of genetic profiles between primary melanomas and their metastases reveals genetic alterations and clonal evolution during progression. *J Invest Dermatol.* 1998; 111: 919–924.
50. Motokura T; Arnold A. Cyclins and oncogenesis. *Biochem Biophys Acta.* 1993; 1155: 63-78.
51. Müller H, Lukas J, Schneider A, Warthoe P, Bartek J, Eilers M, Strauss M. Cyclin D1 expression is regulated by the retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91: 2945-9.
52. Parry D, Bates S, Mann DJ, Peters G. Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product. *EMBO J.* 1995; 14: 503-11.
53. Pavey SJ, Cummings MC, Whiteman DC, Castellano M, Walsh MD, Gabrielli BG, Green A, Hayward NK. Loss of p16 expression is associated with histological features of melanoma invasion. *Melanoma Res.* 2002; 12: 539–547.

54. Piccinin S, Doglioni C, Maestro R, Vukosavljevic T, Gasparotto D, D'Orazi C, Boiocchi M. p16/CDKN2 and CDK4 gene mutations in sporadic melanoma development and progression. *Int J Cancer*. 1997; 74: 26-30.
55. Ramirez JA, Guitart J, Rao MS, Diaz LK. Cyclin D1 expression in melanocytic lesions of the skin. *Ann Diagn Pathol*. 2005; 9: 185-8.
56. Reed JA, Loganzo F Jr, Shea CR, 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: 2713–8.
57. Roesch A, Becker B, Meyer S, Wild P, Hafner C, Landthaler M, Vogt T. Retinoblastoma-binding protein 2-homolog 1: a retinoblastoma-binding protein downregulated in malignant melanomas. *Modern Pathol*. 2005; 18: 1249–1257.
58. Saenz-Santamaria MC, McNutt NS, Shea CR. Immunohistochemical expression of retinoblastoma protein in cutaneous melanoma. *Br J Dermatol*. 1995; 133: 890-5.
59. Saida T. Recent advances in melanoma research. *J Dermatol Sci*. 2001; 26: 1-13.

60. Sampaio SAP, Rivitti EA. 78. Lesões e nevos melanocíticos. Melanoma maligno. In: Sampaio; Rivitti. Dermatologia. 2ª edição. São Paulo: Artes Médicas, 2000; pp. 869-887.
61. 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: 551-7.
62. 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: 3200-3206.
63. Sawaguchi S, Peng Y, Wong F, Tso MO. An immunopathologic study of retinoblastoma protein. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1990; 88: 51-61.
64. Soon SL, Solomon AR Jr, Papadopoulos D, Murray DR, McAlpine B, Washington CV. Acral lentiginous melanoma mimicking benign disease: the Emory experience. *J Am Acad Dermatol*. 2003; 48: 183-8.
65. Sparrow LE, Eldon MJ, English DR, Heenan PJ. p16 and p21WAF1 protein expression in melanocytic tumors by immunohistochemistry. *Am J Dermatopathol*. 1998; 20: 255-61.

66. Straume O; Akslen LA. Alterations and prognostic significance of p16 and p53 protein expression in subgroups of cutaneous melanoma. *Int J Cancer*. 1997; 74: 535-9.
67. 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: 1845-53.
68. Swan M.C.; Hudson D.A. Malignant melanoma in South Africans of mixed ancestry: a retrospective analysis. *Melanoma Res*. 2003; 3: 415-419.
69. Takata M, Saida T. Genetic alterations in melanocytic tumors. *J Dermatol Sci*. 2006; 43: 1-10.
70. 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: 255-9.
71. Tanaka N, Odajima T, Mimura M, Ogi K, Dehari H, Kimijima Y et al. Expression of Rb, pRb2/p130, p53 and p16 proteins in malignant melanoma of oral mucosa. *Oral Oncol*. 2001; 37: 308-14.

72. Vuhahula E, Straume O, Akslen LA. Frequent loss of p16 protein expression and high proliferative activity (Ki-67) in malignant melanoma from black Africans. *Anticancer Res.* 2000; 20: 4857-62.
73. Wang Y-L, Uhara H, Yamazaki Y, Nikaido T, Saida T. Immunohistochemical detection of CDK4 and p16^{INK4} proteins in cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol.* 1996; 134: 269-275.
74. Weyers W, Euler M, Diaz-Cascajo C, Schill WB, Bonczkowitz M. Classification of cutaneous malignant melanoma: a reassessment of histopathologic criteria for the distinction of different types. *Cancer.* 1999; 86: 288-99.
75. Winnepenninckx V, van der Oord JJ. P16^{INK4A} expression in malignant melanomas with or without a contiguous naevus remnant: a clue to their divergent pathogenesis? *Melanoma Res.* 2004; 14: 321-22.
76. Yu BD, Becker-Hapak M, Snyder EL, Vooijs M, Denicourt C, Dowdy SF. Distinct and nonoverlapping roles for pRB and cyclin D: cyclin-dependent kinases 4/6 activity in melanocyte survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 14881-6.

Figura 1