

Beatriz Areias Sangiuliano

**Expressão da dermicidina e correlações clínico-patológicas em
melanomas malignos**

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

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. José Ernesto Belizário

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Sangiuliano, Beatriz Areias

Expressão da dermicidina e correlações clínico-patológicos em melanomas malignos / Beatriz Areias Sangiuliano. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientador: José Ernesto Belizário.

Descritores: 1.Dermicidina 2.Melanoma 3.Imuno-histoquímica 4.Análise serial de tecidos 5.Marcadores biológicos 6.Peptídeo antimicrobiano 7.Estudos de coortes

USP/FM/DBD-452/15

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos pacientes com câncer. Que algo presente nestas páginas possa um dia lhes ser útil.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades que eu tenho na vida e pelas pessoas maravilhosas que eu pude conhecer durante esses anos.

Aos amigos espirituais, que estão sempre ao nosso lado nos momentos em que necessitamos, mesmo quando nem sabemos que momentos são esses.

Aos meus pais, principalmente à minha mãe, pelo amor, dedicação incondicional e apoio em todas as minhas decisões.

Ao Prof. Belizário, pela confiança, pelos ensinamentos, por me apresentar à pesquisa científica ainda na IC, e por me orientar desde então.

Aos Drs. Fernando Augusto Soares e Clóvis Lopes Pinto, do Hospital A.C. Camargo, que gentilmente cederam o TMA utilizado neste trabalho, e à doutoranda Ana Cláudia Urvanegia, pela incrível paciência me ajudando a levantar os prontuários de todos estes pacientes.

Ao Dr. Venâncio Avancini Alves e à Sra. Alda Wakamatsu, pelos minuciosos preparo e análise das lâminas.

À Dra. Mirian Nakagami Sotto, por gentilmente nos ceder os casos utilizados como controle de nossas reações.

Ao grupo de Patologia Molecular do ICESP, Aline, Paulo e Maiara, por me receberem e ajudarem com a padronização de várias técnicas.

Aos meus antigos amigos de laboratório, Olivia, Ana, Dayson, Guiomar, Mauro, Paulo, Fellipe, Fabiane, Aline, Marcela e Carla, pela amizade e ensinamentos durante todos esses anos. Foi um prazer conviver com todos vocês.

Aos meus atuais amigos de laboratório, Jennifer, Bia Viana, Dayble e Victor, por me incentivarem durante este trabalho. É um prazer conviver com todos vocês.

Às minhas amigas e companheiras de mestrado, Paula e Izabela, por compartilharem comigo horas de estudo, incertezas sobre o futuro e alegrias quando as coisas finalmente dão certo.

Aos meus amigos Andrew e Bia Toledo, que entraram na minha vida pelo laboratório e continuam até hoje.

Aos meus queridos Priscila, José Pedro, Deyvid, Henrique, Rodrigo e Stella, amigos de longa data, por me fazerem rir e por me ouvirem (e eu não falo pouco...).

À minha querida amiga Patricia, por me ajudar de diversas maneiras, no laboratório e fora dele, e por atualizar a definição da expressão “com emoção”.

À Universidade de São Paulo, por me dar uma formação e transformar a minha forma de ver o mundo.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado que permitiu minha dedicação a este projeto.

A todas as pessoas que me esqueci de citar aqui, mas que ao longo desses anos me desejaram boas vibrações e me ajudaram a concluir esse trabalho. Muito obrigada.

Este projeto de pesquisa foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Celular do departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sob a forma de bolsa (Processo nº 2013/14423-0).

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância.”

John F. Kennedy

LISTA DE ABREVIATURAS

- DCD – Dermicidina (Dermcidin)
- DCD-SV – DCD splice variante
- DAB – Diaminobenzidina
- PIF – Fator Indutor de Proteólise (Proteolysis-Inducing Factor)
- Y-P30 – Peptídeo de Sobrevivência Celular (Survival Peptide Y)
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- RNA – Ácido Ribonucleico
- RNAi – RNA de interferência
- RNAm – RNA mensageiro
- RNAs_h – RNA de interferência em formato de grampo
- BRAF – “B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase”
- NRAS – “Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog”
- MAPK – “Mitogen-activated protein kinase”
- AMP – Peptídeo antimicrobiano
- GTP – Guanosina trifosfatada
- GDP – Guanosina difosfatada
- MITF – “Microphthalmia-associated transcription factor”
- CDKN2A – “Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A”
- ERRB4 – “Erb-b2 receptor tyrosine kinase 4”
- TMA – Microarranjo de tecido (Tissue-microarray)
- RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
- HSP70 – “Heat Shock Protein 70”
- Nck1 – “NCK adaptor protein 1”
- NF- κ B – Fator Nuclear κ B (Nuclear Factor κ B)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Visão esquemática da pele.....	08
Figura 2:	Representação das duas isoformas conhecidas da proteína precursora Dermicidina e seus principais peptídeos.....	11
Figura 3:	Efeito da proteína DCD no crescimento de tumores em camundongos BALB/c Nude.....	15
Figura 4:	Fotomicrografia de pele humana saudável mostrando a expressão da proteína DCD.....	25
Figura 5:	Vista panorâmica das lâminas de TMA.....	27
Figura 6:	Fotomicrografias mostrando detalhes da análise histopatológica individual de 6 casos.....	28
Figura 7:	Padrões de positividade da expressão de DCD revelados com DAB como cromógeno da reação de imuno-histoquímica.....	30
Figura 8:	Comparação entre as revelações da expressão de DCD com cromógenos DAB e Bajoran.....	31
Figura 9:	Padrões de positividade da expressão de DCD revelados com Bajoran como cromógeno da reação de imuno-histoquímica....	32
Figura 10:	Expressão de DCD em tumores melanocíticos e amelanocíticos.....	34
Figura 11:	Expressão de DCD em tumores primários e metástases.....	35
Figura 12:	Distribuição das frequências relativas à localização dos tumores primários de 53 pacientes do Hospital A.C. Camargo..	40
Figura 13:	Distribuição das frequências relativas à localização das metástases de 25 pacientes do TMA IMGENEX.....	43
Figura 14:	Correlação entre expressão de DCD e localização dos tumores.....	48
Figura 15:	Curvas de sobrevida câncer-específica de pacientes com tumores DCD-positivos e DCD-negativos.....	50
Figura 16:	Esquema de um possível modelo para a ação da Dermicidina no melanoma.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Dados clínico-demográficos de 53 pacientes com melanoma tratados no Hospital A.C. Camargo.....	36
Tabela 2.	Dados clínico-demográficos de 48 pacientes com melanoma do TMA da IMGENEX.....	37
Tabela 3.	Dados clínico-demográficos de 29 pacientes com melanoma DCD-negativo tratados no Hospital A.C. Camargo.....	38
Tabela 4.	Dados clínico-demográficos de 24 pacientes com melanoma DCD-positivo tratados no Hospital A.C. Camargo.....	39
Tabela 5.	Dados clínico-demográficos de 22 pacientes com melanoma DCD-negativo provenientes do TMA IMGENEX.....	41
Tabela 6.	Dados clínico-demográficos de 26 pacientes com melanoma DCD-positivo provenientes do TMA IMGENEX.....	42
Tabela 7.	Correlação entre as variáveis clínico-demográficas e expressão de DCD dos pacientes tratados no Hospital A.C. Camargo.....	45
Tabela 8.	Correlação entre as variáveis clínico-demográficas e expressão de DCD dos pacientes referentes ao TMA da IMGENEX.....	46
Tabela 9.	Correlação entre as variáveis clínico-demográficas e expressão de DCD de todos os pacientes do estudo.....	47
Tabela 10.	Correlação entre mutações em DCD e outros genes alterados no melanoma baseadas em dados de 4 estudos reportados na literatura.....	52

RESUMO

Sangiuliano BA. *Expressão da dermicidina e correlações clínico-patológicas em melanomas malignos* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

O melanoma cutâneo é a neoplasia de pele de maior mortalidade e grande imprevisibilidade na sua evolução. Na doença disseminada, as opções terapêuticas são pouco eficazes. A pesquisa de novos marcadores tumorais permite a melhor compreensão da patogênese do melanoma e possibilita a descoberta de alvos moleculares. A proteína Dermicidina (DCD) foi identificada entre os 9 genes de uma assinatura gênica de predição de diagnóstico clínico do melanoma humano, porém vários autores divergem sobre o papel desta na doença e os mecanismos moleculares pelos quais a DCD atua nos tumores permanecem incertos. O presente estudo teve como objetivo investigar o papel da DCD na tumorigênese do melanoma maligno e correlacionar sua expressão com dados clínicos, demográficos e patológicos dos pacientes. Através da técnica de imuno-histoquímica em lâminas de TMAs (tissue-microarray), o padrão de expressão de DCD foi analisado em tecido tumoral de duas coortes de pacientes, a primeira com 53 casos tratados no Hospital A.C. Camargo, predominantemente caucasianos, e a segunda com 48 casos, todos asiáticos, obtidos comercialmente da empresa IMGEX. A análise *in situ* da Dermicidina mostrou que a proteína está expressa de forma heterogênea nas células tumorais, e pode ocorrer tanto em tumores amelanocíticos como melanocíticos. Em melanomas primários, a expressão de DCD foi mais frequente em tumores localizados nas regiões do tronco e membros superiores, já nas metástases, a proteína foi detectada predominantemente em células em trânsito nos linfonodos (69,23% dos casos). Analisando os resultados dos 101 pacientes das duas coortes em conjunto, pelo método de Kaplan-Meier, foi confirmado que nos indivíduos com tumores DCD-negativo, a taxa de sobrevida foi de 65,54% em 60 meses, e de 62,86% em 130 meses. Já indivíduos com tumor DCD-positivo tiveram sobrevida de 43,33% em 5 anos, e

28,12% em 130 meses, sendo a diferença significativa entre os grupos ($p=0,0229$). A taxa de óbito dos pacientes com tumor DCD-positivo foi mais elevada, 56%, quando comparada à taxa dos indivíduos com tumor DCD-negativo, 33,33% ($p=0,0281$). Também foi encontrada uma tendência de tumores expressando DCD se relacionarem a pacientes com idade superior a 50 anos ($p=0,1057$). Em uma consulta de 4 estudos diferentes que reuniram os dados de sequenciamento de DNA de tumores de 515 pacientes, observamos que o gene DCD, em melanomas, não se encontra predominantemente amplificado, mas sim mutado. A substituição E43K foi a alteração mais frequente, correspondendo a 70% dos casos com mutação no gene. Ao relacionarmos os casos disponíveis de mutação em DCD com os genes BRAF, NRAS, MITF, CDKN2A e ERBB4, encontrou-se uma associação com a mutação BRAF V600E nos casos em que ocorria a mutação DCD E43K. Por ter alta frequência em melanomas (variando entre 45 e 54%), e ser um indicador de pior prognóstico para a neoplasia, a expressão de DCD pode ser considerada um potencial biomarcador.

Descritores: dermicidina; melanoma; imuno-histoquímica; análise serial de tecidos; marcadores biológicos; peptídeo antimicrobiano; estudos de coortes.

ABSTRACT

Sangiuliano BA. *Dermcidin expression and clinicopathological correlations in malignant melanomas* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Cutaneous melanoma is the skin neoplasia with the highest mortality rate and great unpredictability in its evolution. In disseminated disease, the treatment options are little effective. The research for new tumor markers allows a better understanding of the pathogenesis of melanoma and enables the discovery of molecular targets. The Dermcidin protein (DCD) was identified among the nine genes of a gene signature predicting clinical diagnosis of human melanoma, although many authors differ on its role in the disease and the molecular mechanisms by which DCD acts in tumors remain unclear. The present study aimed to investigate the role of DCD in the tumorigenesis of malignant melanoma and to correlate its expression with clinical, demographic and pathologic data of patients. Using the technique of immunohistochemistry in TMA slides (tissue microarray), the expression pattern of DCD was analyzed in tumoral tissue of two cohorts of patients, the first with 53 cases treated in hospital AC Camargo, predominantly caucasians, and the second with 48 cases, all Asians, commercially obtained from IMGENEX company. The *in situ* analysis of Dermcidin showed that the protein is expressed in a heterogeneous manner in tumor cells, and can occur in non-melanocytic as well as in melanocytic tumors. In the primary melanoma, DCD expression was more seen in tumors located in the regions of torso and upper limbs. In the metastases, the protein was found predominantly in cells in transit in the lymph nodes (69.23% of cases). Analyzing the 101 patients of the two cohorts together, by the Kaplan-Meier method, it was confirmed that patients with DCD-negative, the survival rate was 65.54% in 60 months, and 62.86% in 130 months, while the group of patients with DCD-positive tumor had 43.33% in 5 years, and 22.12% in 130 months, knowing that a difference between the groups was significative

($p=0.0229$). The death rate of patients with DCD-positive tumor was higher, 56%, when compared with the death rate of individuals with DCD-negative tumor, 33.33% ($p=0.0281$). It was also found a trend of tumors expressing DCD related to patients older than 50 years ($p=0.1057$). In a search of 4 different studies grouping the DNA sequencing tumor of 515 patients we observed that the DCD gene, in melanoma, is not predominantly amplified, but mutated. The E43K substitution was the most frequent alteration, corresponding to 70% of cases of gene mutation. When comparing the available cases of mutations in DCD with the genes BRAF, NRAS, MITF, CDKN2A, ERBB4, we found an association with the BRAF V600E mutation in cases where occurred the DCD E43K. By having high frequency in melanomas (ranging between 45 and 54%) and being an indicator of poor prognosis for the neoplasia, DCD expression can be considered as a potential biomarker.

Descriptors: dermcidin; melanoma; immunohistochemistry; tissue array analysis; biological markers; antimicrobial peptide; cohort studies.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO

1.1	O melanoma.....	03
1.2	A pele e a Dermicidina.....	07
1.3	A Dermicidina no contexto tumoral.....	12
1.4	Estudo preliminar.....	13
2.	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivos gerais.....	17
2.2	Objetivos específicos.....	17
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1	Casuística.....	19
3.2	Determinação da expressão de DCD por imuno-histoquímica.....	19
3.3	Análise estatística.....	21
3.4	Plataformas de bioinformáticas e análise genômica.....	22
4.	RESULTADOS.....	24
4.1	Análises <i>in situ</i>	24
4.1.1	Expressão de DCD em glândulas écrinas da pele humana.....	24
4.1.2	Expressão de DCD em melanomas.....	26
4.1.3	Padrões de positividade da expressão de DCD.....	29
4.1.4	Expressão de DCD em tumores melanocíticos e amelanocíticos.....	33
4.1.5	Expressão de DCD em melanomas primários e metástases.....	35
4.2	Dados clínico-demográficos dos pacientes.....	36
4.2.1	Dados clínico-demográficos dos pacientes em função da expressão de DCD.....	38
4.2.2	Teste de associação entre as variáveis.....	44
4.2.3	Sobrevida câncer-específica.....	49
4.3	Análise das alterações estruturais do gene DCD em melanomas.....	51
5.	DISCUSSÃO.....	54
6.	CONCLUSÕES.....	67
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
8.	ANEXOS.....	78

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença complexa, em que células sofrem alterações e param de responder corretamente aos mecanismos que regem o crescimento e a manutenção de um tecido normal, causando o aparecimento de uma população celular que se multiplica de maneira descontrolada e é capaz de invadir outros tecidos (Weinberg, 2008). A doença tem origem multifatorial, sendo resultado de interações entre fatores genéticos e ambientais, e, geralmente, um único fator ambiental, ou uma única alteração genética, não são suficientes para acarretar o desenvolvimento tumoral (Weinberg, 2008).

A tumorigênese em humanos tem se mostrado um processo de múltiplos passos, em que cada passo reflete alterações genéticas que dirigem a transformação de células normais em malignas (Hanahan & Weinberg, 2000). Essas alterações podem ser anomalias cromossômicas qualitativas ou quantitativas, que podem causar instabilidade genômica e aneuploidias, permitindo assim que erros durante a segregação dos cromossomos levem à seleção progressiva de clones de células alteradas (Vogelstein & Kinzler, 2004). Para que estes clones sejam bem sucedidos, eles devem passar por uma evolução clonal (que leva aproximadamente 30-50 anos) quando novas mutações, translocações, deleções e ampliações são introduzidas em genes críticos, tais como proto-oncogenes, genes supressores de tumor e enzimas de reparo do DNA, para assim adquirir certas habilidades e capacidades biológicas. Em seu trabalho notável, Hanahan & Weinberg (2000) organizam seis dessas habilidades fundamentais para o desenvolvimento de um câncer. São elas a capacidade adquirida de autossuficiência de fatores de crescimento, insensibilidade a sinais anti-crescimento, invasão de tecidos e metástase, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e evasão à apoptose. Anos mais tarde, em artigo de 2011, os autores incluíram mais quatro habilidades atribuídas às células tumorais. Estas novas habilidades são: evasão à resposta imunológica, inflamação induzida pelo tumor, instabilidade genômica e reprogramação do metabolismo energético (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.1 O melanoma

O melanoma maligno cutâneo é o câncer que tem origem nos melanócitos da pele e está frequentemente associado à exposição solar. Dentre os vários tipos de câncer da pele, os melanomas são os tumores de pior prognóstico devido à alta resistência a quimioterapia convencional (Kwong et al., 2007; Nelson & Tsao, 2009).

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), as neoplasias da pele são responsáveis por cerca de 25% dos casos totais de câncer no Brasil. Dentre os cânceres da pele, 4% correspondem a melanomas, e estima-se que o país registre aproximadamente 6 mil casos novos da doença por ano (INCA, 2015). As estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam o surgimento de 132 mil novos casos anuais de melanoma no mundo. Além disso, a OMS ainda calcula que uma redução de 10% nos níveis de ozônio atmosférico (que absorve uma parte da radiação ultravioleta do Sol) pode resultar em um acréscimo de 4.500 casos da neoplasia, apontando um crescimento global na incidência da doença para os próximos anos (OMS, 2015).

A progressão do melanoma costuma seguir sucessivamente algumas fases já descritas na literatura. Em geral, estas fases são: nevus melanocítico, nevus displásico, melanoma de crescimento horizontal (fase de crescimento radial), melanoma de crescimento invasivo (fase de crescimento vertical) e melanoma metastático (Hipfel et al., 2001). Quando detectada nos estágios iniciais e tratada com a remoção cirúrgica do tumor, a doença possui elevados índices de cura.

Existem algumas classificações possíveis para os casos de melanoma, baseadas no tipo histológico em que se origina o tumor primário. Além da localização, estes subtipos da doença também costumam apresentar perfis genéticos distintos. O melanoma de crescimento superficial é o tipo mais frequente da doença na população caucasiana. Ele tem origem na epiderme, e inicialmente seu crescimento é radial, com mínima extensão para a camada

dérmica. Somente após anos de desenvolvimento do tumor, ele chegará à fase de crescimento vertical e se expandirá para a região dérmica, onde se torna potencialmente perigoso (Walker et al., 2011). Já o melanoma nodular é associado ao tumor primário situado na derme, e à falta da extensão radial na epiderme, representando assim, uma forma mais avançada da neoplasia (Zalaudek et al., 2008). O melanoma lentigo é o único subtipo da doença totalmente associado à exposição solar crônica e aos danos causados pela radiação UV. É aceito que ele se origina em melanócitos epidérmicos, embora também tenha sido proposto que melanócitos de folículos pilosos possam dar início à doença (Box et al., 2010). Seu início é caracterizado pelo crescimento radial, e após vários anos de danos causados pelo Sol a derme é atingida, na fase de crescimento vertical. O melanoma acral é aquele que acomete as regiões palmoplantar, e de extremidades, como ponta dos dedos (incluindo a região localizada sob as unhas). Essas regiões tipicamente apresentam menor quantidade de melanócitos, e o melanoma acral é considerado um tipo de melanoma independente dos danos causados pela radiação UV (Walker et al., 2011). Já o melanoma mucoso surge em regiões de tecido da mucosa, começando seu desenvolvimento na camada basal e depois expandindo para a derme (Smoller, 2006). Por fim, o melanoma uveal, é o tipo de tumor que atinge estruturas oculares, como coróide, corpo ciliar, íris, conjuntiva e pálpebra. O melanoma uveal é a neoplasia intraocular mais comum em adultos, e a população caucasiana é a mais propensa a este tipo de tumor. Apesar de alguns autores apontarem um papel da radiação UV no desenvolvimento da doença (Meyle & Guldborg, 2009; Schmidt-Pokrzywniak et al., 2009; Shields & Shields, 2007), ainda não há consenso se a exposição solar é um fator de risco para este tipo de melanoma ou não.

Isoladamente, nenhum gene tem a capacidade de iniciar e desenvolver um tumor, e é aceito que vários eventos independentes são necessários para o acúmulo de defeitos genéticos que levem ao fenótipo maligno. Os dois genes mais mutados em melanomas são BRAF (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase) e NRAS (neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog) (Platz et al., 2008). Eles fazem parte da via RAS-RAF-MEK-ERK-

MAPK, que promove proliferação, sobrevivência, diferenciação e motilidade das células (Hill et al., 2013). BRAF é um membro da família das RAF quinases, e é ativado por RAS. Aproximadamente 60% dos melanomas apresentam mutação em BRAF, sendo que mais de 90% destas mutações correspondem à substituição V600E (Ascierto et al., 2012). Essa mutação provoca a ativação constitutiva do gene, o que faz com que a via de sinalização intracelular fique ativada mesmo sem os estímulos extracelulares iniciais necessários, causando assim proliferação e sobrevivência celulares muito mais elevadas do que o normal, com BRAF selvagem. Devido à alta frequência dessa mutação, inibidores seletivos de BRAF, como Vemurafenib e Dabrafenib, foram desenvolvidos e têm apresentando bons resultados no tratamento de pacientes que apresentam a mutação BRAF V600E (Sullivan & Faherty, 2013). NRAS é um membro da família das RAS GTPases que se encontra ancorado à membrana celular e que, quando estimulado pelo seu respectivo receptor passa do estado inativo ligado a GDP (guanosine diphosphate) para o estado ativo ligado a GTP (guanosine triphosphate), e assim recruta as proteínas RAF que darão continuidade à via (Hill et al., 2013). Em melanomas, mutações em NRAS aparecem em aproximadamente 20% dos casos, e a mutação mais frequente impede que NRAS retorne à forma inativada de GTPase, fazendo com que a via de MAPK (mitogen-activated protein kinase) fique ativada constitutivamente. Diversos estudos até o momento demonstraram que mutações em BRAF e NRAS são mutuamente exclusivas.

Diversos outros genes fortemente associados ao desenvolvimento de melanomas já foram identificados. O gene MITF (microphthalmia-associated transcription factor) tem sido considerado um oncogene por ter influência em vários processos celulares, como proliferação, sobrevivência, motilidade, proteção contra estresse oxidativo, e reparo de DNA (Ploper & De Robertis, 2015). Ele codifica um fator de transcrição, e regula a diferenciação e o desenvolvimento de melanócitos. Em melanomas, a amplificação do gene MITF é observada em aproximadamente 15% dos casos.

Proteínas tirosina quinase são frequentemente associadas a diversos tipos de câncer. Estudos feitos por sequenciamento de DNA em melanomas

metastáticos mostraram que o gene ERBB4 (erb-b2 receptor tyrosine kinase 4) apresenta mutação em 19% dos casos, sendo o membro dessa superfamília que apareceu mais frequentemente mutado (Prickett et al., 2009). Este gene faz parte de uma família composta por quatro receptores de fator de crescimento epidérmico: ERBB1 (EGFR ou HER1), ERBB2 (HER2), ERBB3 (HER3) e ERBB4 (HER4). Esses receptores são proteínas transmembranas que contêm um sítio de ligação extracelular, uma hélice transmembrana, um domínio tirosina quinase citoplasmático e uma cauda C-terminal. A família ERBB possui 13 tipos de ligantes conhecidos, sendo que os ligantes podem apresentar especificidade para o receptor ou se ligar aos receptores com maior afinidade. ERBB4 tem como ligantes as Neuregulinas (NRG1, NRG2, NRG3, NRG4), o Fator de Crescimento semelhante ao EGF ligado a Heparina (HB-EGF) e a Epregulina (EREG) (Moreira, 2011). Após a ativação dos receptores pelos ligantes, diversas vias podem ser acionadas, como RAS-RAF-MEK-ERK e PI3K-mTOR, com consequente ativação de fatores de transcrição e indução da proliferação celular. Mutações em ERBB4 conferem à célula maior atividade quinase e capacidade de transformação maligna, fazendo com que o gene seja considerado um potencial oncogene para melanoma (Kunz, 2014).

Apesar da maioria das alterações genéticas associadas ao melanoma serem somáticas, ou seja, adquiridas por algumas células ao longo da vida da pessoa, cerca de 10% dos casos da doença têm origem em mutações herdadas, através de células germinativas. Assim, além de estarem presentes em todas as células do indivíduo, essas mutações também podem ser passadas para as próximas gerações. Um dos genes mais associados ao melanoma familiar é CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) (Read et al., 2015). Este gene é conhecido por codificar algumas proteínas, entre elas p16 e p14, que atuam como reguladoras negativas do ciclo celular. Mutações em CDKN2A levam a produção deficiente ou não-funcional destas proteínas, o que pode acarretar em crescimento celular descontrolado e formação de tumores. Por essa razão, CDKN2A é considerado um importante gene supressor de tumor e suas mutações estão envolvidas na oncogênese de diversos tipos tumorais.

A identificação dos genes alterados no câncer é de fundamental importância para o avanço em prevenção, diagnóstico e tratamento dos pacientes com terapias mais poderosas e dirigidas a múltiplos alvos. Assim vários grupos têm se dedicado aos estudos de identificação de marcadores moleculares para o diagnóstico e prognóstico destes tumores (Timar et al., 2010, Wilson et al., 2012), bem como de novos alvos que levem ao desenvolvimento de fármacos mais poderosos e específicos (Sullivan & Faherty, 2013, Evans et al., 2013).

1.2 A pele e a Dermicidina

A pele é o maior órgão do corpo humano, possuindo múltiplas funções que permitem a manutenção da homeostase, como por exemplo, papel de barreira contra o meio externo, percepção e termorregulação. Para tais funções a pele conta com a presença de diversos componentes, incluindo alguns tipos de glândulas com diferentes funções e distribuições. Um esquema representando a estrutura da pele pode ser visto na Figura 1.

As glândulas sebáceas, distribuídas por todo o corpo, com exceção das palmas das mãos e plantas dos pés, produzem uma secreção oleosa constituída predominantemente por lipídios, com função de lubrificar e proteger os pêlos e a superfície da pele (Smallegange et al., 2011). As glândulas sudoríparas são divididas tradicionalmente em duas categorias, apócrinas e écrinas. As glândulas apócrinas são encontradas na derme, na região das axilas e nas áreas genital e anal, associadas aos folículos pilosos. Elas secretam lipídios, esteroides e proteínas que possuem papel na comunicação química. Já as glândulas écrinas, diferentemente de outros mamíferos, mesmo outros primatas, estão distribuídas por todo o corpo em humanos. As maiores densidades destas glândulas estão nas palmas das mãos e em plantas dos pés. Glândulas écrinas são cruciais para a função de termorregulação, tendo sua secreção composta predominantemente por água.

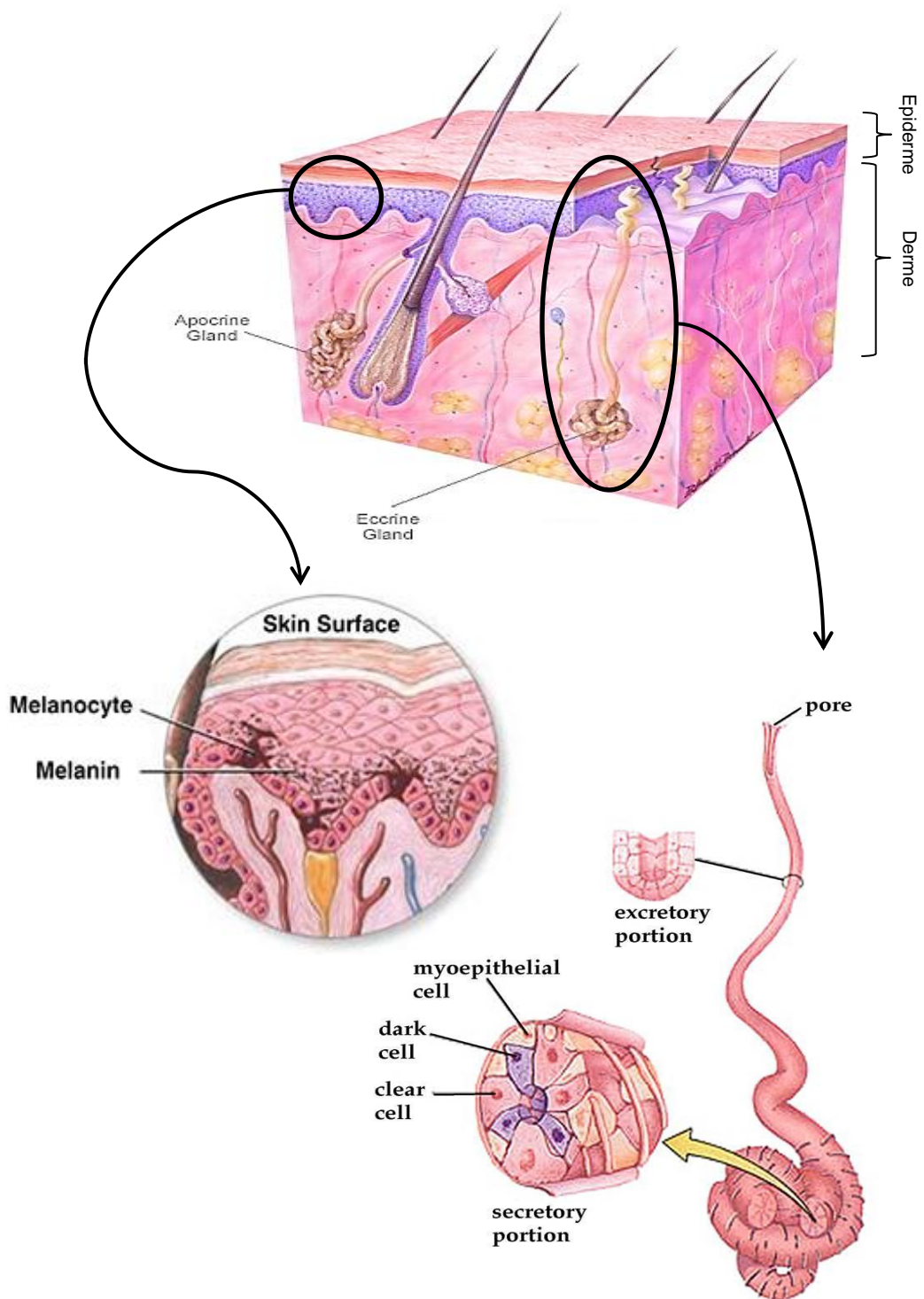


Figura 1: Visão esquemática da pele. Na ilustração à cima, podem ser observadas as camadas de epiderme e derme, a qual abriga vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, pêlos e glândulas. No detalhe, à esquerda, são mostradas as camadas epidérmicas, incluindo a camada basal (em rosa escuro) que abriga os melanócitos. No detalhe à direita, está representada a estrutura de uma glândula écrina. Adaptado de <http://pathologyoutlines.com>.

Outros componentes como sódio, potássio, cálcio, magnésio, aminoácidos, proteínas, ureia, amônia e ácido láctico também são encontrados no suor, em diminutas quantidades (Wilke et al., 2007). Dentre as proteínas encontradas no suor, foi detectada a Dermicidina (DCD).

A Dermicidina surge evolutivamente na ordem dos primatas. Seu transcrito mais frequente é originado de 5 éxons e resulta em uma proteína de 110 aminoácidos, com peso molecular de 11,2 kDa. A DCD também possui uma forma variante, DCD-SV (isoforma 2), cujo transcrito possui um éxon diferente na região C-terminal, quando comparados à isoforma 1.

O gene DCD é expresso constitutivamente pelas células escuras das glândulas écrinas de suor e, após a secreção, a proteína precursora é então processada, dando origem ao peptídeo que dá nome ao gene (Schitteck, 2012). A DCD-SV também é encontrada no suor da pele normal, concomitantemente com a isoforma 1 (Markovic, 2003).

A pele é considerada a primeira linha de defesa da resposta inata contra agentes patogênicos como fungos e bactérias. Ainda na pele, a maioria dos patógenos pode ser detectada devido aos seus componentes microbianos estruturais conservados e únicos, como polissacáridos e polinucleotídeos, e é então iniciada uma resposta inflamatória (Sangiuliano et al., 2014), resultando na secreção de peptídeos antimicrobianos (AMPs). O peptídeo DCD é membro de uma nova família desses peptídeos antimicrobianos, possuindo amplo espectro de atividade e nenhuma similaridade com outros AMPs conhecidos. Ele tem expressão constitutiva e não responde a estímulos inflamatórios (Rieg et al., 2004), ao contrário de outros AMPs, por isso está estabelecido que a função primária de DCD é modular a colonização da pele por microrganismos.

Pode-se notar a importância da DCD na microbiota da pele sadia quando é levado em consideração o caso de indivíduos com dermatite atópica. Esta é uma doença inflamatória crônica da pele, em que os pacientes possuem expressão anormal de AMPs. Cerca de 30% destas pessoas apresentam infecções na pele causadas por vírus ou bactéria (Namjoshi et al., 2008). Estudos também confirmaram que o suor leva a uma redução de bactérias na

pele de indivíduos saudáveis, e que o mesmo não ocorre em pacientes portadores de dermatite atópica, que possuem concentrações de DCD reduzidas em seu suor (Wilke et al., 2007).

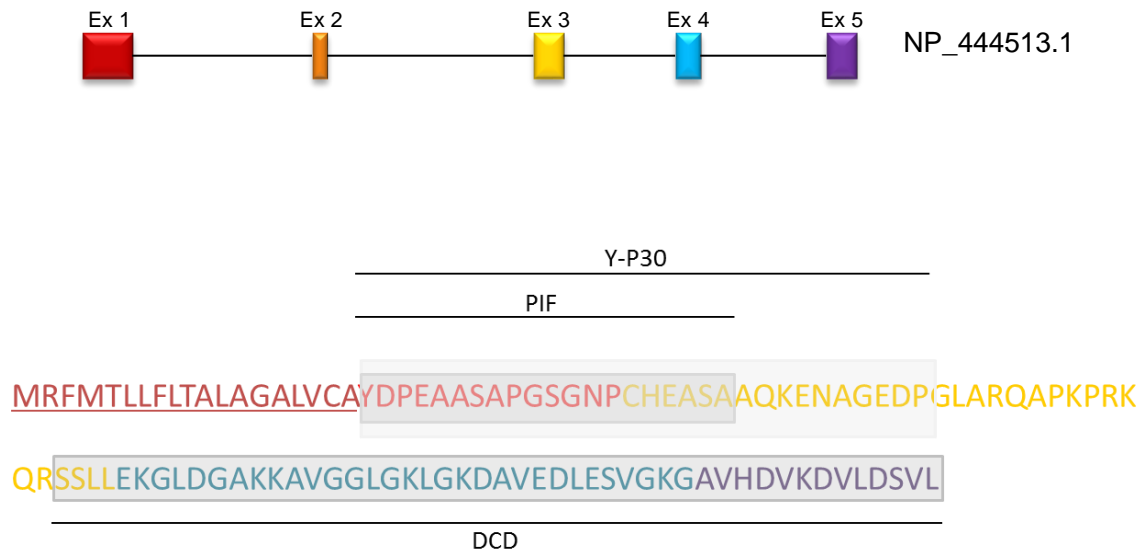
Da mesma forma, o trabalho de Arai e colaboradores, 2014, mostrou que a DCD possui atividade antimicótica dose-dependente contra o fungo *Trichophyton rubrum*, que é um agente comum nas micoses cutâneas, e é responsável por doenças como “pé de atleta”. Pacientes com esta micose também possuem concentração de DCD reduzida no suor, em comparação a indivíduos saudáveis (Arai et al., 2014).

Essa atividade antimicrobiana da DCD já foi reportada para diversos outros organismos, como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Salmonella typhimurium* e *Candida albicans* (Steffen et al., 2006; Senyurek et al., 2009; Burian & Schitteck, 2015).

Atualmente, o modelo mais aceito para explicar a ação antibiótica da Dermicidina é aquele em que, após o processamento da proteína, peptídeos DCD formam um hexâmero composto por dímeros antiparalelos, e esta estrutura, com arquitetura de canal, interage com fosfolipídios da membrana dos microrganismos presentes na pele. Com a permeabilização da membrana, o fluxo de água e íons é severamente alterado, resultando na morte do organismo (Song et al., 2013).

Além do peptídeo encontrado no suor, outros peptídeos resultantes do processamento da proteína foram identificados por diversos autores, em outros contextos biológicos. Um deles é o peptídeo PIF (Proteolysis-Inducing Factor), fator de indução de proteólise, associado à caquexia neoplásica de roedores MAC-16 (Todorov et al., 1996) e de tumores humanos (Belizário et al., 1991). Outro peptídeo, Y-P30, é considerado um fator de sobrevivência induzido por estresse oxidativo, produzido por células neurais (Cunningham et al., 1998). Mesmo DCD já foi detectado fora de seu contexto natural, em melanócitos malignos (Hipfel et al., 2000). As sequências da Dermicidina, e a representação dos peptídeos citados à cima, podem ser vistas na Figura 2.

A - Isoforma 1



B - Isoforma 2

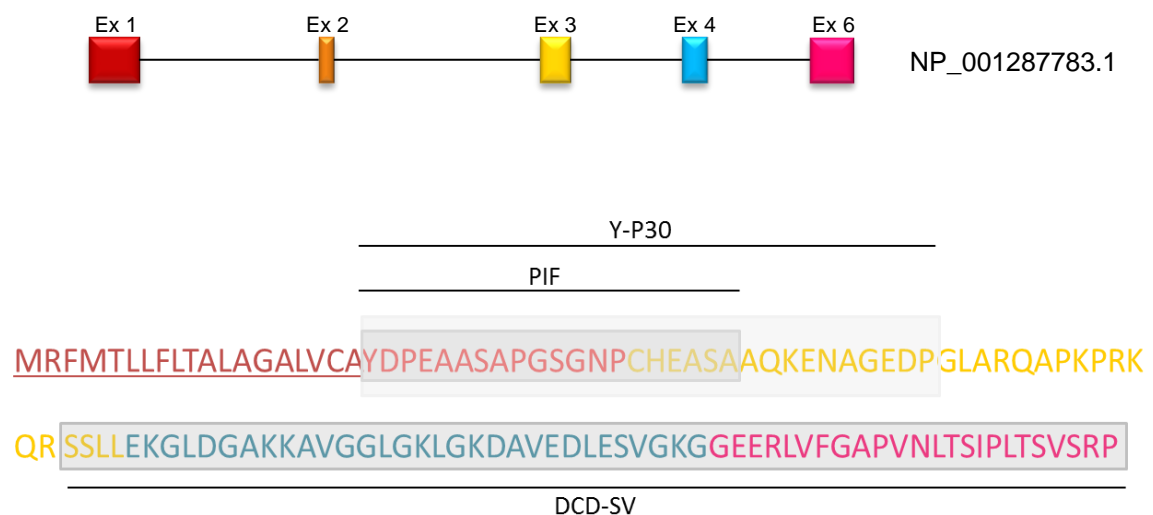


Figura 2: Representação das duas isoformas conhecidas da proteína precursora Dermicidina e seus principais peptídeos. Em **A**, esquema da isoforma de 5 éxons, código de acesso: **NP_444513.1** e em **B**, o esquema da isoforma 2, com éxon alternativo, código de acesso: **NP_001287783.1**. A região sublinhada nas sequências de aminoácidos corresponde ao peptídeo sinal. Na porção N-terminal encontram-se os peptídeos Y-30 e PIF, já na região C-terminal da proteína, encontra-se o peptídeo DCD ou DCD-SV. Adaptado de National Center for Biotechnology Information (NCBI).

1.3 A Dermicidina no contexto tumoral

A expressão do gene DCD já foi encontrada aumentada em tumores primários e metastáticos cutâneos (Sagawa et al., 2003; Minami et al., 2004), nevus e melanomas malignos (Hipfel et al., 2000), carcinomas da próstata (Wang et al., 2003), gastrointestinais (Deans et al., 2006), hepáticos (Lowrie et al., 2006) e no carcinoma ductal de mama *in situ* (DCSI) e invasivo (DCI) (Porter et al., 2003).

Em um grande estudo realizado por pesquisadores do nosso laboratório em colaboração com pesquisadores externos, foi analisado o papel da DCD na tumorigênese da mama, através da superexpressão e do silenciamento do gene (Bancovik et al., 2015). Células da linhagem humana MDA-MB-361 de câncer de mama foram transduzidas com vetor lentiviral para expressar RNAi contra DCD (clones IBC-I), causando o silenciamento do gene. As células expressando esta construção apresentaram habilidade de formação de colônias significativamente menor, em comparação ao controle. Elas também tiveram resistência reduzida contra morte celular causada por H₂O₂, estaurosporina, e TNF- α . O ensaio com camundongos imunodeficientes mostrou que a inoculação com os clones MDA-MB-361IBC-I resultou na formação de tumores menores quando comparados aos tumores resultantes dos clones MDA-MB-361 pLKO (controle). Já os ensaios referentes à superexpressão de DCD na linhagem celular MCF-7 mostraram aumento na proliferação celular e na sobrevivência contra agentes citotóxicos, bem como volumes tumorais maiores em camundongos Nude, em comparação ao grupo controle. Através do ensaio de microarray com os clones MDA-MB-361, pLKO e IBC-I, com posterior análise de enriquecimento de vias e redes regulatórias, foi demonstrado que os genes mais alterados pela expressão de DCD estavam relacionados à família ERBB. Esses resultados sugerem que na tumorigênese da mama, o gene DCD exerce seus efeitos de proliferação e sobrevivência através da modulação desta via de sinalização (Moreira et al., 2008; Bancovik et al., 2015).

Foram as pesquisas de Hipfel e colegas que mostraram pela primeira vez um aumento de expressão de transcritos do DCD em linhagens de melanomas (Hipfel et al., 2000; Schitteck et al., 2001). Anos depois, em um estudo apresentado por Liu e colaboradores em 2012, encontrou-se uma assinatura molecular de 200 genes para melanoma, e entre eles estava DCD. Mais recentemente foi publicado que DCD é um dos 9 genes que compõem uma assinatura gênica de diagnóstico clínico do melanoma humano (Brunner et al., 2013), e que o gene representa fator protetivo quanto ao prognóstico da doença. Já o trabalho de Timar e colaboradores, 2010, verificou que a expressão de DCD não tem valor preditivo em melanomas metastáticos. Portanto, os melanomas podem surgir por vias causais diferentes e envolver a participação de vários oncogenes. Também podemos assumir que a expressão anormal de DCD em melanócitos tem algum papel na progressão de melanomas.

A confirmação da expressão de DCD em melanomas seria de grande interesse, já que habilitaria um novo biomarcador para o diagnóstico, e um potencial alvo para tratamentos individualizados.

1.4 Estudo preliminar

Baseado no destaque que a DCD apresenta em melanomas, realizamos estudos *in vivo* para avaliar o papel da proteína na evolução tumoral (Sangiuliano, 2012). Camundongos imunodeficientes BALB/c Nude foram divididos em três grupos e receberam clones derivados da linhagem celular G-361 (linhagem celular de melanoma humano, metastático, com expressão constitutiva de DCD e mutação BRAF V600E) por injeção na região dorsal. O grupo controle recebeu $0,5 \times 10^6$ células G-361 pLKO (clones transduzidos com vetor vazio), um segundo grupo recebeu $1,0 \times 10^6$ células G-361 IBC-I (clones que possuem a construção para expressão de shRNA contra uma região do gene DCD, causando o seu silenciamento), e o terceiro grupo foi injetado com $1,0 \times 10^6$ células G-361 pLKO, e, após uma semana, passou a receber doses

semanais de anticorpo policlonal da Abgent Inc. (San Diego, CA, USA), produzido em coelho, contra a porção C-terminal da DCD (2mg/kg), durante 4 semanas.

Através dos resultados obtidos no ensaio *in vivo*, apresentados na Figura 3, demonstrou-se que quando as células de melanoma humano G-361 possuíam expressão constitutiva de DCD (clone pLKO), os animais apresentaram tumores maiores, de crescimento repentino e agressivo, enquanto os tumores originados pelas células G-361 com silenciamento do gene (clone IBC-I) desenvolveram-se menos e de forma consideravelmente mais lenta, mesmo com os animais recebendo o dobro de células tumorais em relação ao grupo controle (pLKO).

Os animais que receberam os clones G-361 pLKO e foram tratados com anticorpo anti-DCD tiveram tumores de evolução mais lenta em relação ao grupo controle e, por volta do 27^o dia do experimento, apresentaram uma estagnação no crescimento e até mesmo a redução da massa tumoral em alguns casos.

Os resultados destes experimentos mostraram, portanto, que a DCD tem um papel importante estimulando o crescimento de células tumorais humanas em camundongos. No atual estudo, pretendemos investigar se de fato a DCD é expressa em tumores humanos e qual o seu papel na patogênese do melanoma maligno.

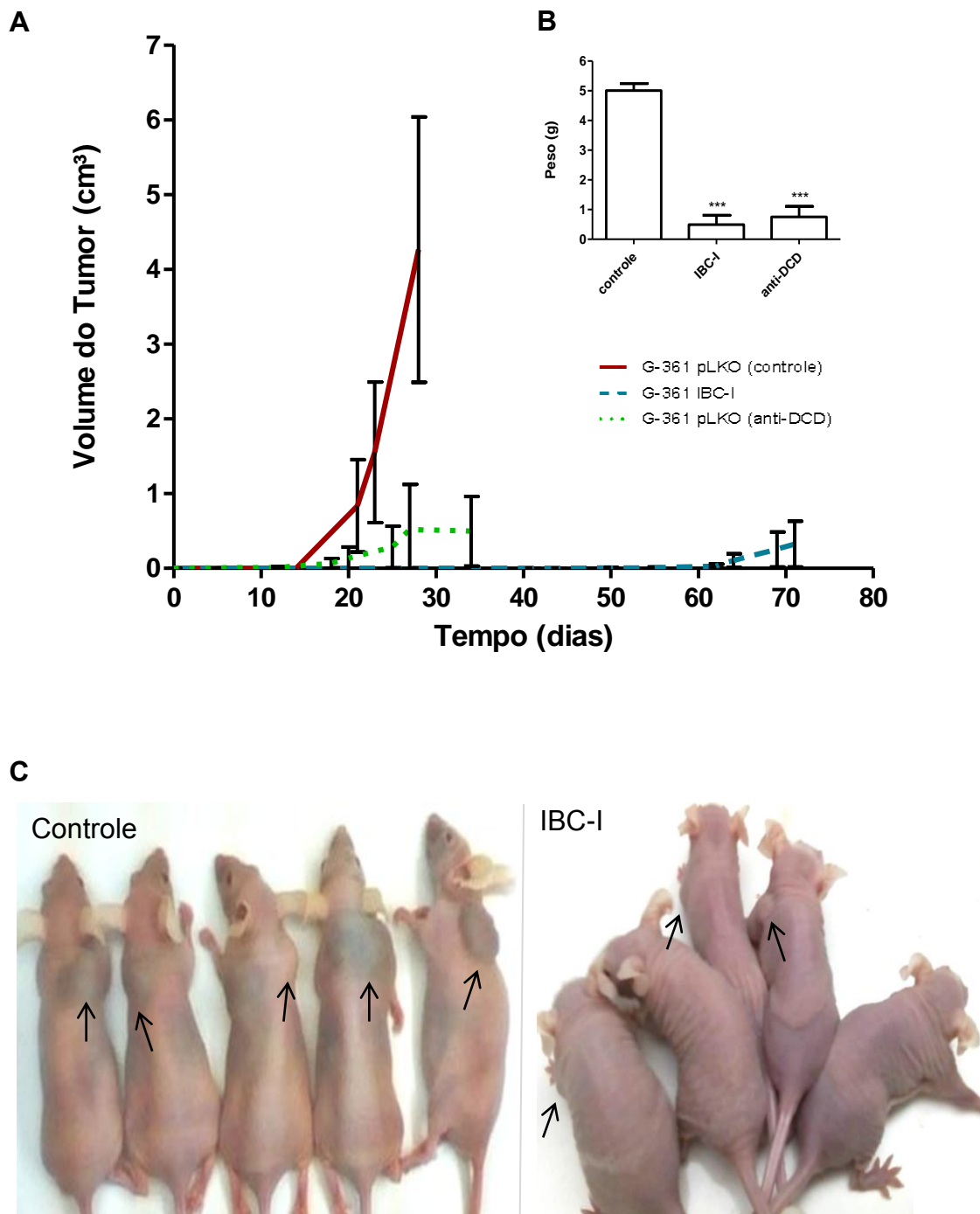


Figura 3: Efeito da proteína DCD no crescimento de tumores em camundongos BALB/c Nude. Os animais foram divididos em três grupos e injetados por via subcutânea dorsal como se segue: $0,5 \times 10^6$ células G-361 pLKO (controle); $1,0 \times 10^6$ células G-361 IBC-I (IBC-I); e $1,0 \times 10^6$ células G-361 pLKO com tratamento por anticorpo policlonal anti-DCD, em doses semanais durante 4 semanas (anti-DCD). Em **A**, gráfico da evolução dos volumes tumorais e em **B**, peso final dos tumores. Valores das médias \pm erro padrão. *** $p < 0,0001$, pelo teste *t*. Em **C**, fotos ilustrativas dos camundongos BALB/c Nude 27 dias após a injeção de células tumorais. À esquerda, animais do grupo controle, e à direita, animais do grupo IBC-I.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Investigar o papel da Dermicidina na patogênese do melanoma maligno em humanos, explicitando as principais características da expressão da proteína na doença.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão da proteína DCD em TMAs (tissue-microarray) de melanomas primários e metastáticos através de ensaios de imunohistoquímica;
- Correlacionar a expressão da DCD com características clínicas e patológicas dos pacientes;
- Analisando sequenciamento de DNA de tumores DCD-positivos disponível em plataformas de dados genômicos, investigar ampliações, deleções e mutações do gene DCD e suas correlações com biomarcadores de melanoma.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Para este estudo foram usados cortes histológicos derivados de amostras de melanomas depositados em duas lâminas de TMA. A primeira delas, conforme descrito na tese de mestrado de Aline Shiga, Hospital A.C. Camargo (Shiga, 2012), com amostras de 66 pacientes diagnosticados e tratados por médicos oncologistas do Hospital A.C. Camargo no período de 2003 a 2007. Esta lâmina é composta apenas por amostras de melanomas primários. Casos de pacientes com outros tipos de câncer, ou com histórico de patologia prévia predisponente foram excluídos do grupo amostral. A segunda lâmina foi obtida comercialmente (**IMGENEX: IMH-369**) e traz casos de 59 pacientes diagnosticados com melanoma, com tumores primários e metástases, sem critérios de exclusão.

Das amostras de pacientes do Hospital A.C. Camargo, 53 *spots* de pacientes diferentes foram válidos para análise. Já da lâmina obtida com a IMGENEX, dos 59 casos disponíveis, apenas 48 *spots* atendiam às condições de análise. Essa diferença entre o número de casos iniciais e quantidade de casos válidos para análise ocorre porque durante o processo de montagem do TMA ou de marcação por imuno-histoquímica, alguns *spots* podem se soltar da lâmina, e estes casos são perdidos. Outro fator para o descarte de um *spot* é a falta de tecido tumoral representativo para a análise na amostra.

3.2 Determinação da expressão de DCD por imuno-histoquímica

Para a detecção da proteína foi utilizado o anticorpo comercial da Abgent Inc. (San Diego, CA, USA), **DCD Antibody (C-term) Cat# AP6718b**, policlonal, produzido em coelho, contra a porção C-terminal da DCD, na

concentração 1:100, e o kit de revelação da Spring Bioscience (Pleasanton, CA, USA) "REVEAL Polyvalent HRP-DAB Detection System". Como controle positivo foram usadas amostras de pele, sem tumor, em que apenas células de glândulas écrinas são coradas. Para controle negativo, amostras dos mesmos blocos de pele foram submetidas à reação de imuno-histoquímica, mas sem a incubação com anticorpo primário.

As reações de imuno-histoquímica iniciam-se com a desparafinização das lâminas em dois banhos de xilol por 10 minutos cada. A seguir, os cortes são reidratados em cadeia descendente de etanol (2 banhos de álcool 100% por 2 minutos cada, 2 banhos em álcool 90% por 2 minutos cada e 1 banho em álcool 80% também por 2 minutos) e imersos em água destilada durante 5 minutos. A seguir, é realizada a recuperação antigênica, onde as lâminas são incubadas em tampão citrato (pH 6) pré-aquecido, e colocadas em banho-maria ou panela a vapor por 30 minutos. Após as lâminas resfriarem gradualmente por 20 minutos, elas são lavadas com água destilada e incubadas em PBS (pH 7) por 5 minutos. É feito então o bloqueio da peroxidase endógena, com a aplicação do "Hydrogen Peroxide Block" sobre os cortes, por 3 vezes de 5 minutos cada, com posterior lavagem em água destilada e incubação em PBS por 5 minutos. O bloqueio de proteínas é feito com a aplicação do "Protein Block" sobre os cortes por 1 hora. Após a retirada do excesso do bloqueio, sem realizar lavagem, o anticorpo primário é colocado sobre os cortes, e deixado incubando por 16 horas. Após a incubação, é feita a lavagem com 3 banhos de 10 minutos em TBST (0,1% Tween-20). A revelação é realizada com a aplicação do "HRP conjugate" sobre os cortes por 1 hora, seguida pela mesma série de 3 banhos de 10 minutos com TBST. Em seguida, os cortes são cobertos com DAB (2,5 µl de "DAB Chromogen" diluído em 1 ml de "DAB Substrate") por 10 minutos. Após a revelação, as lâminas são lavadas em água corrente e contra-coradas com hematoxilina. Depois de passarem por bateria de desidratação e montagem, as lâminas são finalmente examinadas em microscópio óptico e fotografadas em scanner digital Axio Z1 (Zeiss, Alemanha).

Ao analisarmos os melanomas corados com DAB, tivemos grande dificuldade de visualizar nossa marcação, pois a melanina destes tecidos se confunde com a coloração marrom do cromógeno. Assim, decidimos repetir a reação, desta vez substituindo o DAB pelo Bajoran Purple Chromogen Kit, Biocare Medical Inc. (Concord, CA, USA), que resulta em uma coloração lilás forte, contrastando com o marrom da melanina. A reação é conduzida da mesma forma, trocando apenas a aplicação da mistura com DAB pela mistura com Bajoran (32 µl de “Stabilizer”, 32 µl de “Chromogen” e 32 µl de “Hydrogen Peroxide” diluídos em 2,5 ml de “Bajoran Purple Buffer”). O tempo de incubação no cromógeno e as demais etapas permaneceram iguais.

Devido à pouca variação de intensidade na coloração entre as amostras, e à pequena área de tecido contida em cada *spot* do TMA, o que portanto permite a avaliação de poucas células tumorais, os tumores foram simplificarmente classificados como “DCD-positivos” ou “DCD-negativos”. Para que a amostra fosse considerada positiva, ela deveria conter um número mínimo de 25 células coradas.

Além das amostras presentes nos TMAs, lâminas contendo o tumor total de alguns pacientes também foram analisadas com a finalidade de confirmar a positividade da expressão de DCD nos melanomas. Estas lâminas foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Mirian Nakagami Sotto (Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) e utilizadas como referência, mas não foram incluídas em nossas análises estatísticas.

3.3 Análise estatística

Para a construção dos gráficos de sobrevida utilizamos o método de Kaplan-Meier, e o teste de log-rank para a comparação entre as curvas. A curva de sobrevida câncer-específica foi montada com o tempo de seguimento

entre a data do diagnóstico e a data do último retorno do paciente ao hospital, ou data de óbito pela doença.

A análise das variáveis “gênero”, “idade”, “metástase”, “seguimento”, “status do paciente” e “óbitos” foi feita através do teste exato de Fischer, enquanto a variável “localização do tumor” foi avaliada pelo teste X^2 .

As análises estatísticas foram construídas com software Graphpad Prism da GraphPad Software, Inc. (La Jolla, CA . USA). Todos os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3.4 Plataformas de bioinformática e análise genômica

Os dados da expressão gênica de tumores incluídos em nosso estudo foram obtidos nas seguintes plataformas:

- TCGA, The Cancer Genome Atlas (<https://tcga-data.nci.nih.gov>);
- cBioPortal for Cancer Genomics” (<http://www.cbioportal.org>);
- “COSMIC - Catalogue of Somatic Mutations in Cancer” (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic>).

Esses bancos agrupam dados de sequenciamento de DNA de diversos estudos independentes realizados em vários países. Foram utilizadas, para nossas análises, amostras de 4 grupos de estudo, totalizando 515 casos disponíveis. As amostras foram compostas tanto por tumores primários quanto por tecidos metastáticos. Como nem todos os estudos contam com dados de expressão de RNAm, baseamos nossas observações apenas em ampliações, deleções e mutações, que estavam disponíveis para todas as amostras.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Análises *in situ*

4.1.1 Expressão de DCD em glândulas écrinas da pele humana

A análise da pele humana normal, tecido usado como controle positivo da reação, confirmou o que foi apresentado por Rieg et al., 2005. A porção secretora das glândulas écrinas apresenta expressão intracelular da proteína DCD. A DCD também é detectada já secretada, nos ductos destas glândulas. Queratonócitos e melanócitos não foram encontrados expressando a proteína (Figura 4).

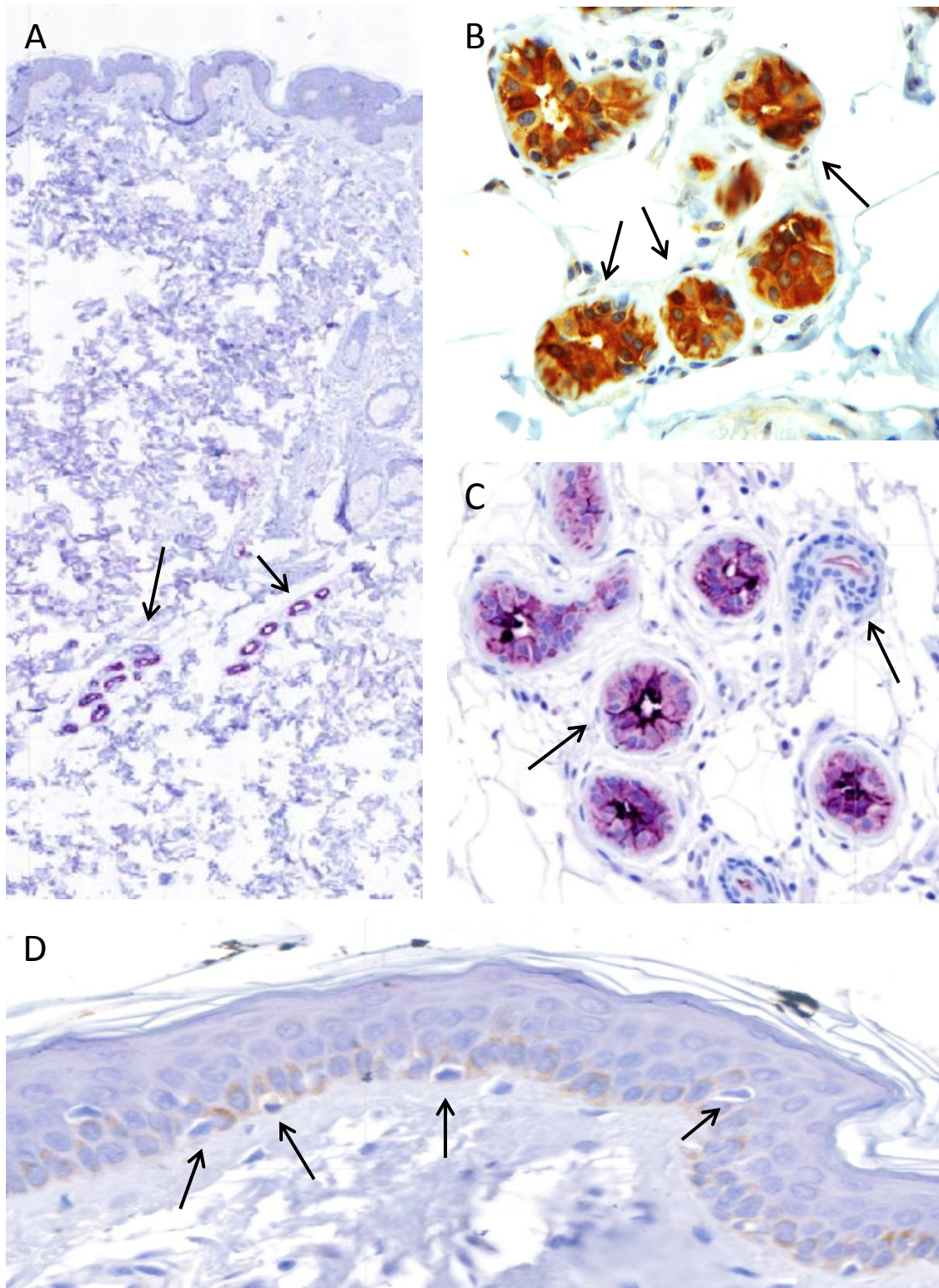


Figura 4: Fotomicrografia de pele humana saudável mostrando a expressão da proteína DCD. Em **A**, são observadas as regiões epidérmica, camada superior mais escura do tecido, e dérmica, camada mais espessa rica em colágeno e elastina que contém as glândulas écrinas (indicadas pelas setas). Em **B**, glândulas écrinas com expressão positiva de DCD reveladas com cromógeno DAB (setas) e em **C**, reveladas com Bajoran (setas). Em **D**, detalhe da região epidérmica, composta por queratinócitos e melanócitos (setas), a qual pode apresentar traços de melanina (pigmento em marrom). Não foi detectada expressão de DCD na epiderme em nenhuma das reações. Reações de imuno-histoquímica feitas com anticorpo policlonal de coelho anti-DCD na diluição de 1:100. Aumentos de 40x em **A**, 100x em **B** e **C** e 200x em **D**.

4.1.2 Expressão de DCD em melanomas

Durante a análise das amostras de melanomas contidas nos TMAs tivemos uma dificuldade nunca encontrada com tumores da mama ou peles, tecidos nos quais a reação de imuno-histoquímica fora padronizada em nosso laboratório. Devido à coloração marrom da marcação com DAB ser semelhante à tonalidade da melanina presente em diversas amostras dos tumores, as reações realizadas com o cromógeno DAB tiveram grande dificuldade de interpretação. Assim, optamos por repetir as reações, desta vez com o cromógeno Bajoran. A vista panorâmica das lâminas utilizadas no estudo e alguns exemplos da observação dos *spots* são mostrados nas Figuras 5 e 6, respectivamente.

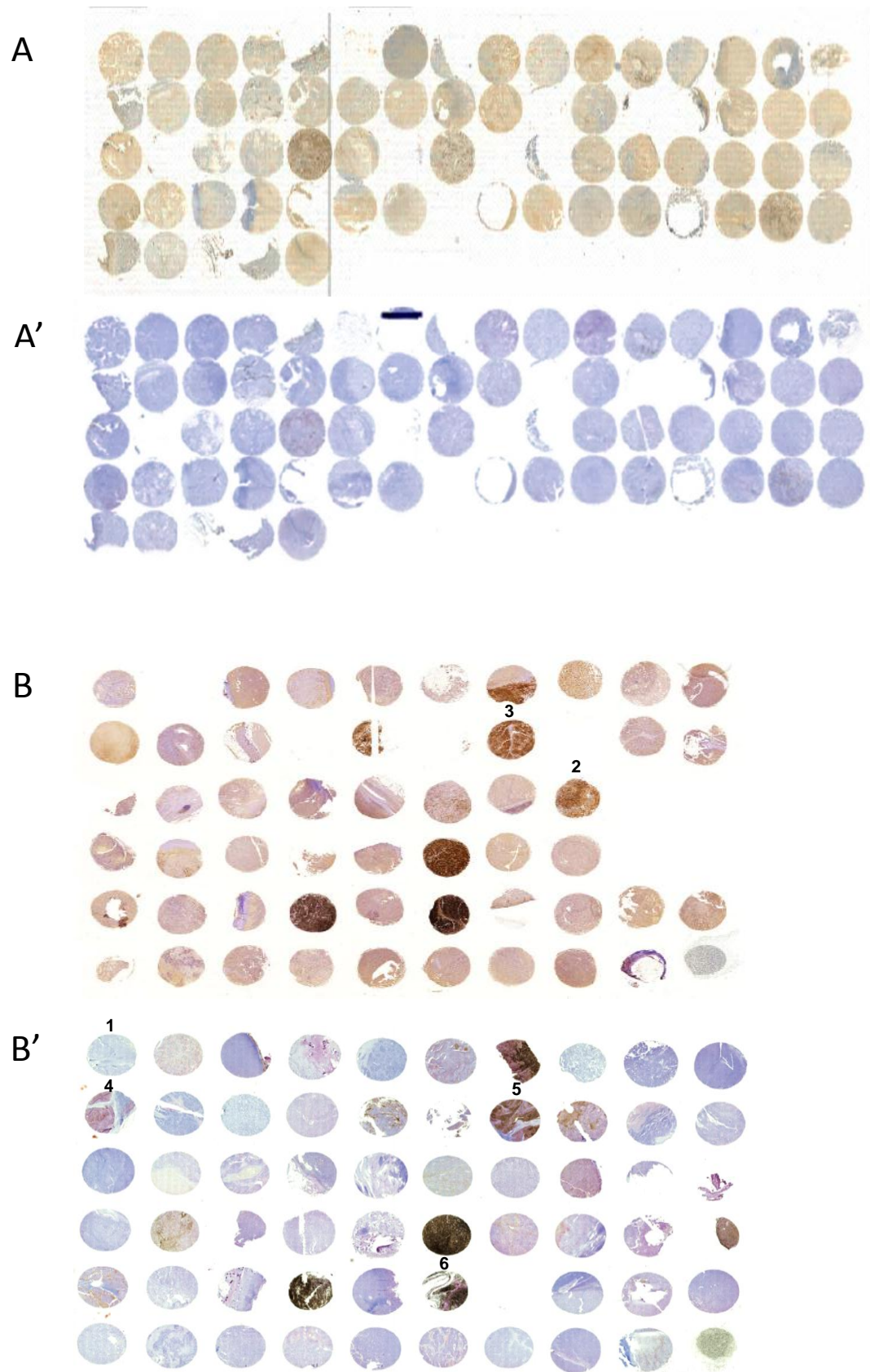


Figura 5: Vista panorâmica das lâminas de TMA. Em **A**, lâminas do Hospital A.C. Camargo e em **B**, TMAs comerciais da IMGENEX. Reações feitas com anticorpo policlonal de coelho anti-DCD na concentração 1:100, e reveladas com uso dos cromógenos DAB em **A** e **B**, e Bajoran em **A'** e **B'** (* os casos numerados são apresentados na Figura 6).

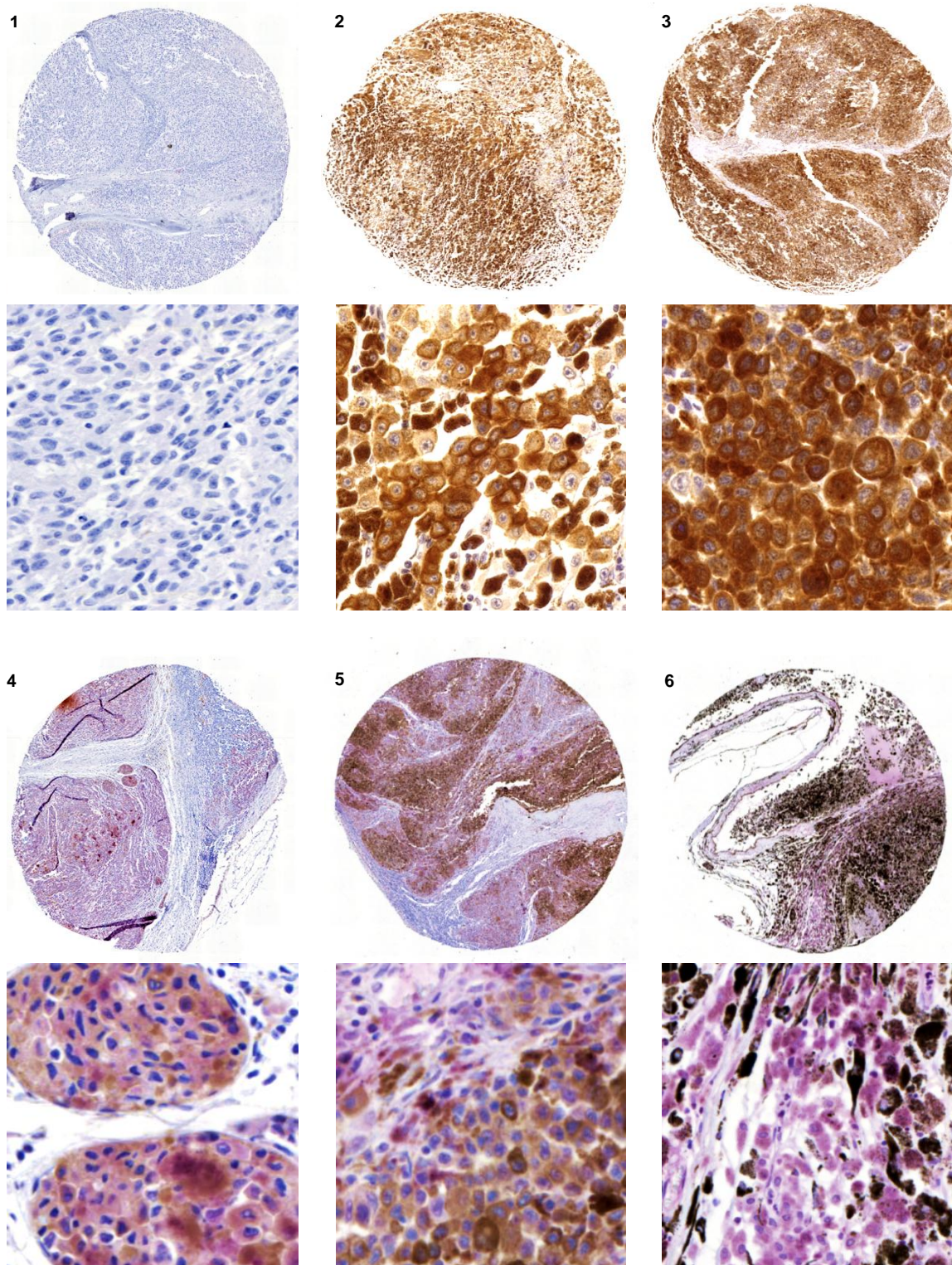


Figura 6: Fotomicrografias mostrando detalhes da análise histopatológica individual de 6 casos. Numeração referente aos spots do TMA IMGEX mostrado na Figura 5, informações sobre cada caso no Anexo 2. Reações feitas com anticorpo policlonal de coelho anti-DCD na concentração 1:100. **1**, região plantar (caso nº 1). **2**, linfonodo (caso nº 28). **3**, linfonodo (caso nº 17). **4**, membro inferior (caso nº 11). **5**, linfonodo (caso nº17). **6**, globo ocular (caso nº46). Aumentos de 40 e 100x.

4.1.3 Padrões de positividade da expressão de DCD

A busca de um padrão para a localização da proteína DCD dentro da célula, inicialmente com o uso de DAB como cromógeno da reação, se mostrou pouco conclusiva, exibindo diversos padrões de positividade da Dermicidina. A maior parte dos tecidos analisados demonstrou padrão de positividade citoplasmática e nuclear ao mesmo tempo, mas também ocorreram casos de positividade apenas no núcleo ou no citoplasma, além de um caso com forte expressão membranar (Figura 7).

Pela dificuldade já citada na distinção entre melanina e DCD, neste momento repetimos as reações com o cromógeno Bajoran (Figura 8), cuja coloração lilás permitiu a observação mais nítida da reação. Apenas estas reações foram utilizadas para as análises apresentadas neste trabalho.

Com o mesmo anticorpo, mas desta vez com a identificação da DCD pelo cromógeno Bajoran, ficou evidenciado um padrão de positividade predominantemente citoplasmático, porém casos de positividade membranar, como o citado anteriormente, também foram observados (Figura 9).

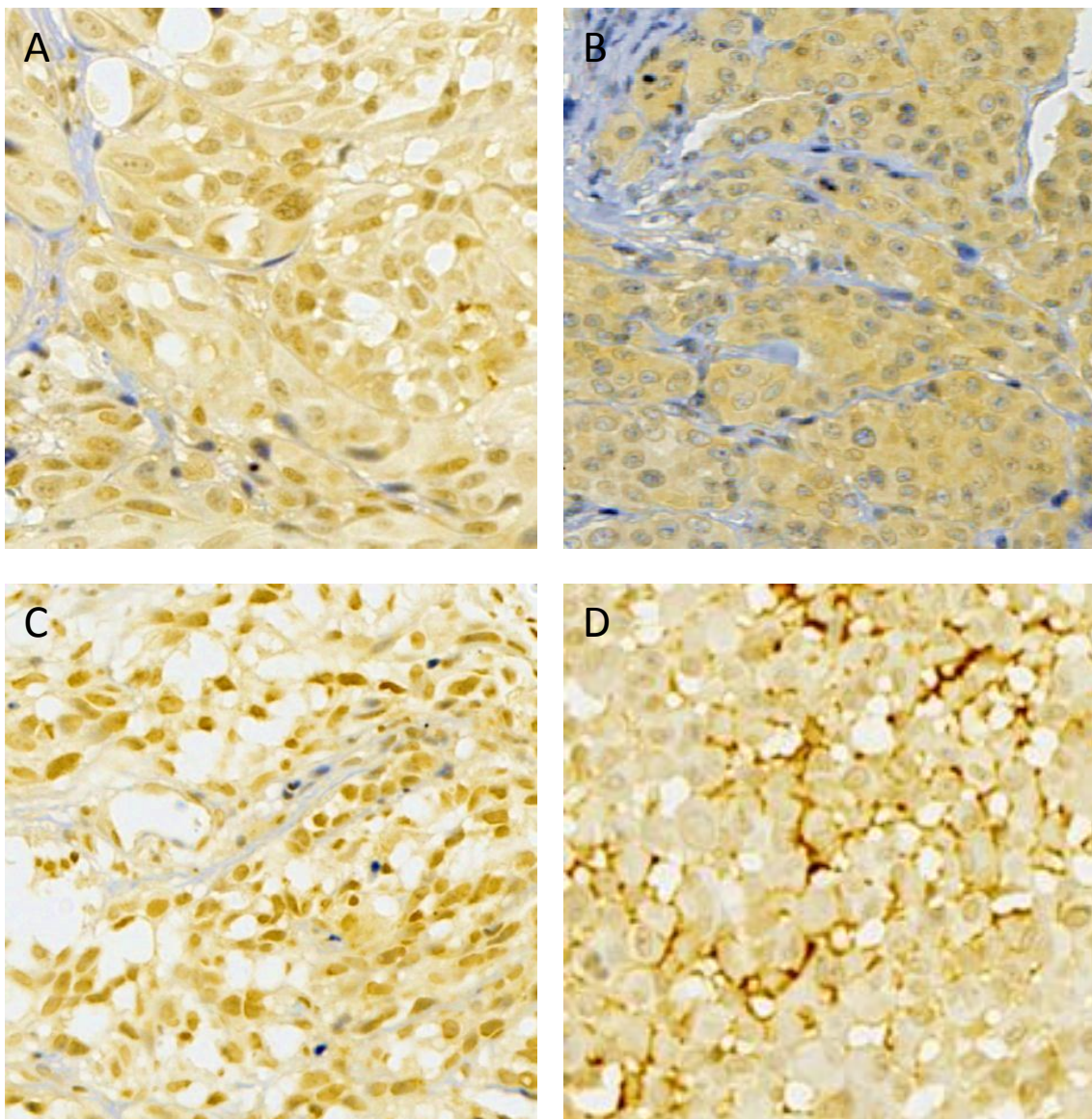


Figura 7: Padrões de positividade da expressão de DCD revelados com DAB como cromógeno da reação de imuno-histoquímica. Positividade observada tanto no citoplasma quanto no núcleo em **A**, expressão vista claramente no citoplasma em **B**, forte marcação nuclear em **C** e também positividade na região membranárea em **D**. Reações de imuno-histoquímica feitas com anticorpo policlonal de coelho anti-DCD na diluição de 1:100. Aumento de 200x.

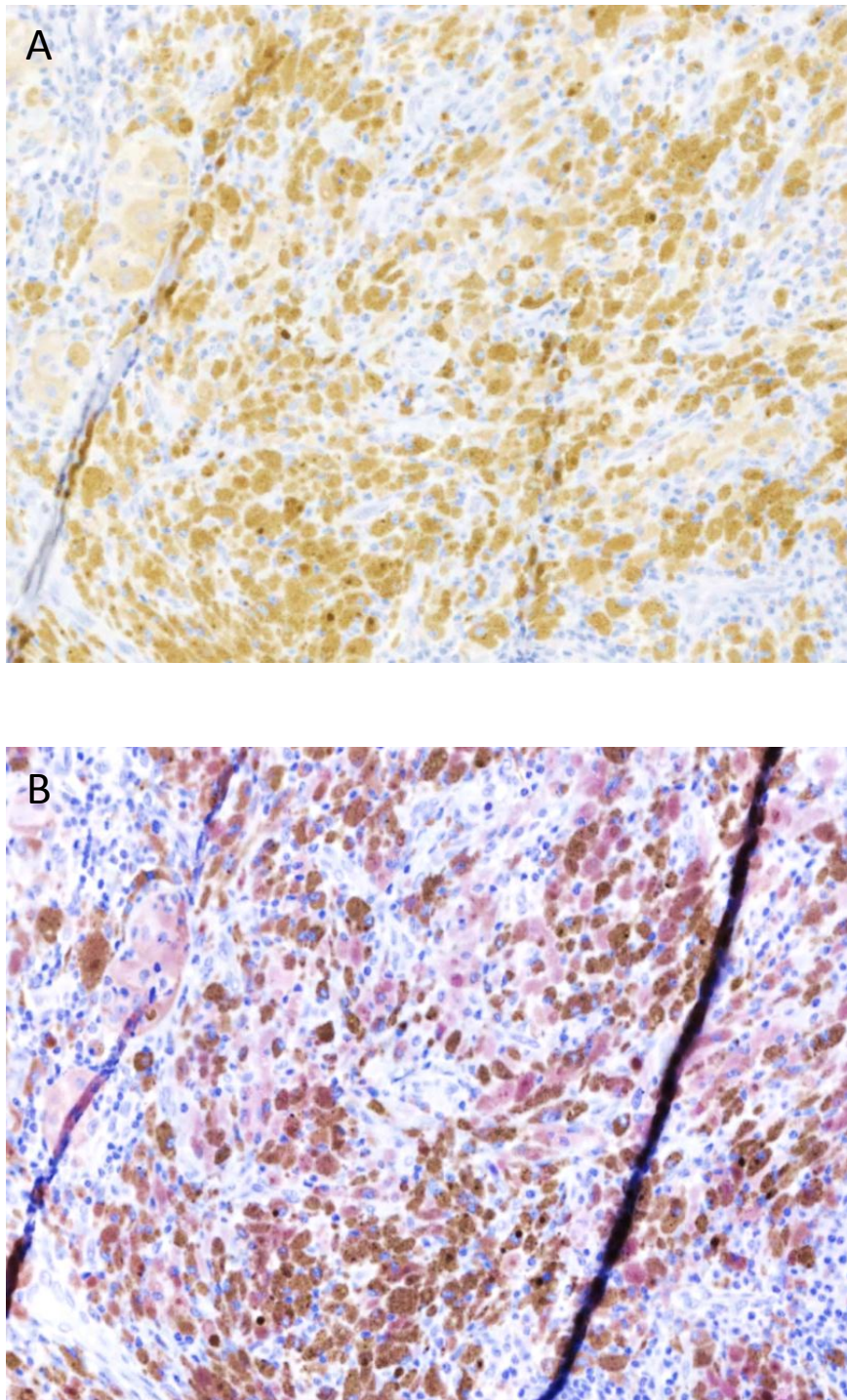


Figura 8: Comparação entre as revelações da expressão de DCD com cromógenos DAB e Bajoran. Reações de imuno-histoquímica em cortes histológicos do mesmo tumor foram reveladas com DAB em **A** (coloração marrom claro) e com Bajoran em **B** (coloração lilás). Notar que em **A**, a expressão de DCD e a pigmentação da melanina se confundem, enquanto em **B** a distinção das duas é muito mais fácil. Reações de imuno-histoquímica feitas com anticorpo policlonal de coelho anti-DCD na diluição de 1:100. Aumento de 100x.

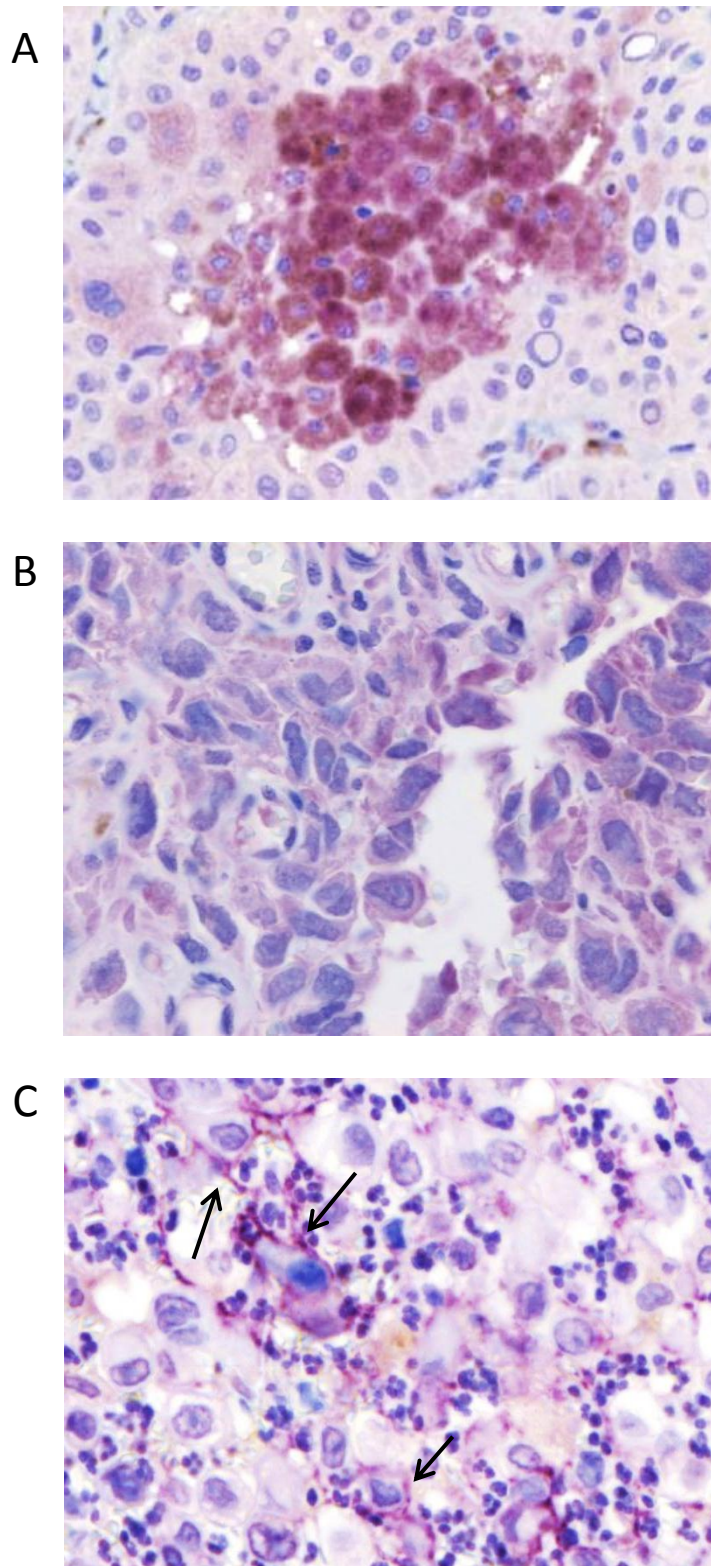


Figura 9: Padrões de positividade da expressão de DCD revelados com Bajoran como cromógeno da reação de imuno-histoquímica. Em **A** e **B**, as células apresentam positividade citoplasmática, enquanto em **C**, células apresentam positividade de DCD membranar (setas). Reações de imuno-histoquímica feitas com anticorpo policlonal de coelho anti-DCD na diluição de 1:100 e uso de Bajoran como cromógeno da reação. Aumento de 200x.

4.1.4 Expressão de DCD em tumores melanocíticos e amelanocíticos

A expressão de Dermicidina foi observada tanto em tumores sem a presença de melanina, como em tumores contendo o pigmento. De fato, a maior parte dos tumores DCD-positivos observados eram melanocíticos, sendo que, nesses casos, DCD e melanina apareceram em regiões muito próximas ou até mesmo sobrepostas (Figura 10).

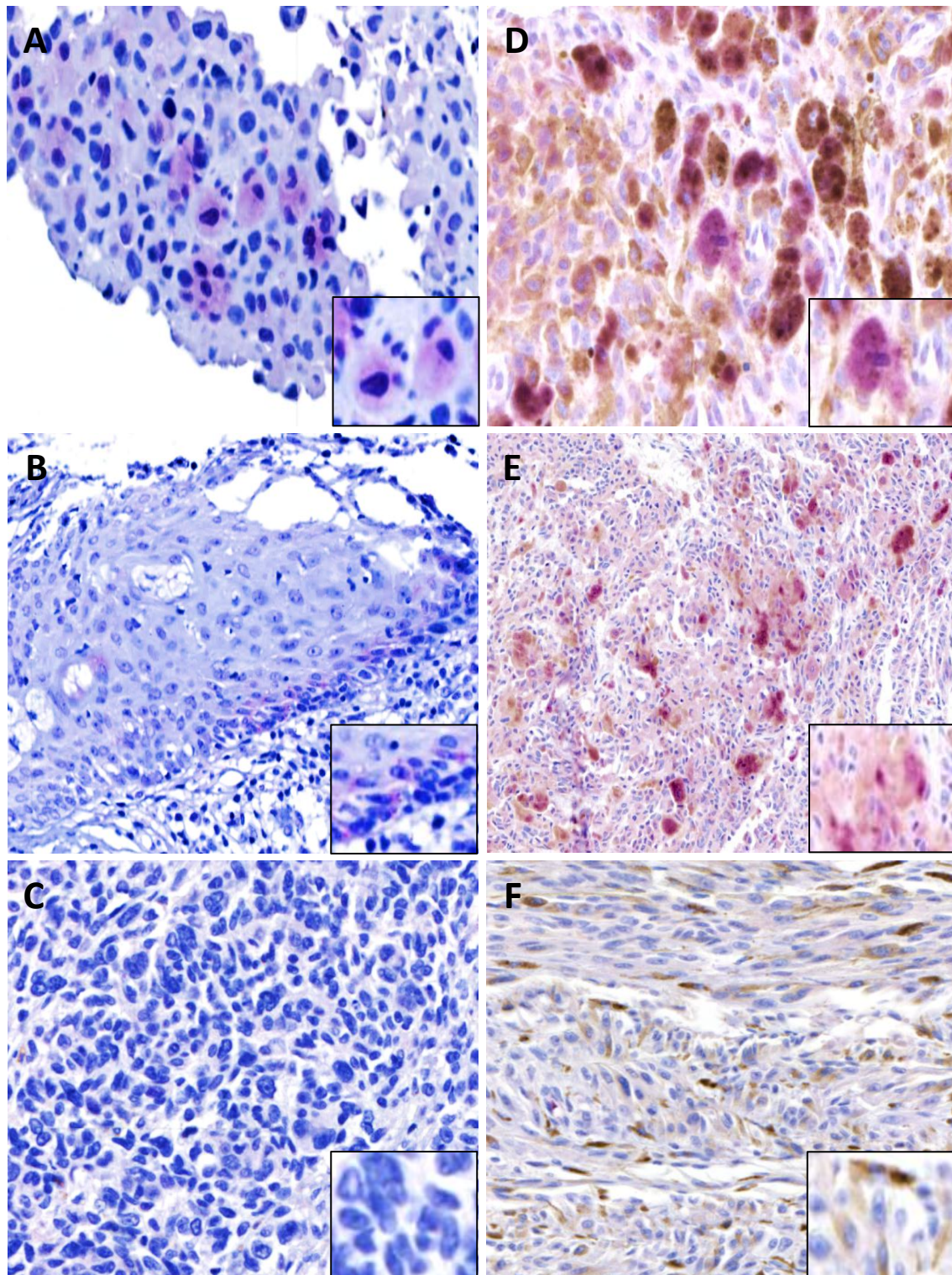


Figura 10: Expressão de DCD em tumores melanocíticos e amelanocíticos. Em **A** e **B**, tumores amelanocíticos expressando DCD em algumas regiões, enquanto em **C** temos um tumor amelanocítico negativo para a expressão da proteína. Em **D** e **E**, tumores expressando DCD e melanina. Em algumas regiões, pode-se ver uma coloração vinho, resultante da sobreposição de melanina e DCD. Em **F**, exemplo de tumor melanocítico sem expressão de DCD. Reações de imuno-histoquímica feitas com anticorpo policlonal de coelho anti-DCD na diluição de 1:100 e uso de Bajoran como cromógeno nas reações. Aumentos de 100x em **E** e 200x nos demais cortes.

4.1.5 Expressão de DCD em melanomas primários e metástases

Apesar da maioria dos tumores expressando DCD ser composta por melanomas primários, células positivas para DCD também foram observadas em tecidos metastáticos. Dentre as regiões de metástases analisadas, linfonodos com células em trânsito foram as estruturas mais frequentemente associadas à expressão de Dermicidina (Figura 11).

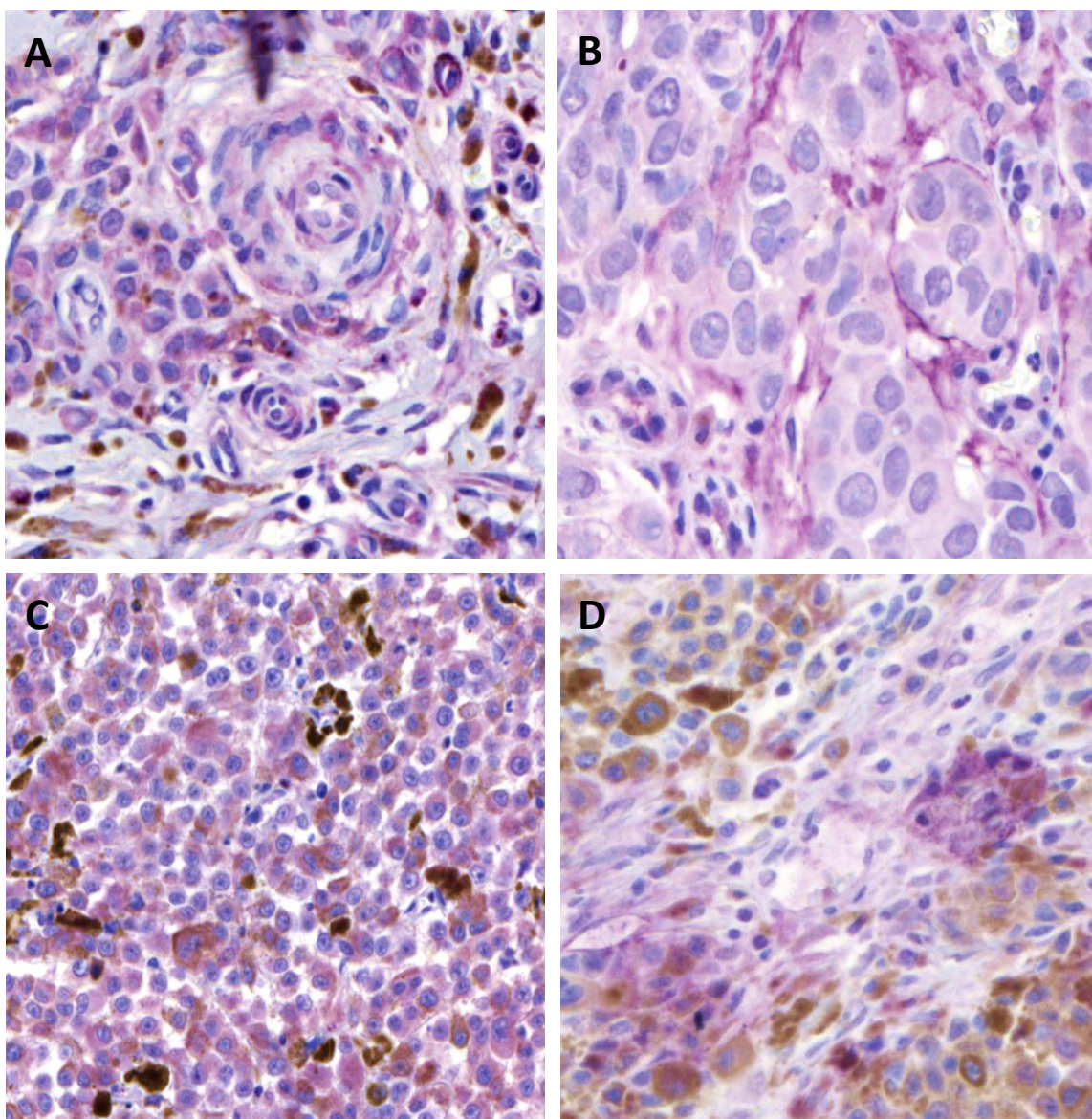


Figura 11: Expressão de DCD em tumores primários e metástases. Tumores primários com expressão de DCD em **A** (região plantar) e **B** (membro inferior), e cortes referentes a tecidos metastáticos em **C** e **D** (células em transito de linfonodos). Reações de imuno-histoquímica feitas com anticorpo policlonal de coelho anti-DCD na diluição de 1:100 e uso de Bajoran como cromógeno da reação. Aumento de 200x.

4.2 Dados clínico-demográficos dos pacientes

Na coorte composta pelos 53 pacientes tratados no Hospital A.C. Camargo, a idade média no momento do diagnóstico foi de 54,26 anos, sendo que as idades variaram entre 24 e 85 anos. O tempo médio de seguimento dos pacientes foi de 68 meses. Dados de gênero, metástases, óbitos totais durante o seguimento, e localização dos tumores podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Dados clínico-demográficos de 53 pacientes com melanoma tratados no Hospital A.C. Camargo			
		n	%
Gênero	Feminino	24	45,28
	Masculino	29	54,72
Localização do tumor	Cabeça	3	5,66
	Tronco	19	35,85
	Membro superior	8	15,09
	Palma da mão	1	1,89
	Membro inferior	16	30,19
	Planta do pé	6	11,32
Metástases		29	54,72
Óbitos		9	16,98

Entre os 48 pacientes que compuseram a coorte do TMA comercial da IMGEX, a idade média registrada foi de 53,77 anos, com as idades mínima e máxima de 20 e 77 anos, respectivamente. O acompanhamento de cada paciente teve 36,45 meses em média. Da mesma forma como no grupo

anterior, dados de gênero, metástases, óbitos totais e localização dos tumores estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Dados clínico-demográficos de 48 pacientes com melanoma do TMA da IMGENEX			
		n	%
Gênero	Feminino	19	39,58
	Masculino	29	60,42
Localização do tumor	Cabeça	2	4,17
	Tronco	3	6,25
	Membro superior	6	12,50
	Palma da mão	1	2,08
	Membro inferior	4	8,33
	Planta do pé	4	8,33
	Globo ocular	3	6,25
	Cavidade nasal	2	4,17
	Tecidos moles	4	8,33
	Osso	3	6,25
	Pulmão	1	2,08
	Intestino	5	10,42
	Linfonodo	10	20,83
	Metástases		40
Óbitos		36	75,00

Os dados clínico-demográficos de cada paciente incluído na análise estão apresentados nos Anexos 1 e 2.

4.2.1 Dados clínico-demográficos dos pacientes em função da expressão de DCD

A reação de imuno-histoquímica feita com o TMA montado no Hospital A.C. Camargo identificou 29 amostras de tumores negativos e 24 amostras com expressão positiva de DCD. Os principais dados dos dois grupos estão contidos nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Dados clínico-demográficos de 29 pacientes com melanoma DCD-negativo tratados no Hospital A.C. Camargo

		n	%
Gênero	Feminino	12	41,38
	Masculino	17	58,62
Localização do tumor	Cabeça	3	10,34
	Tronco	6	20,69
	Membro superior	2	6,90
	Palma da mão	1	3,45
	Membro inferior	12	41,38
	Planta do pé	5	17,24
Metástases		17	58,62
Óbitos		3	10,34

O grupo de pacientes referentes à Tabela 3, com tumores negativos para DCD, possui em média 55,03 anos, com idades variando entre 27 e 85 anos, e teve seguimento médio de 75,72 meses.

Tabela 4. Dados clínico-demográficos de 24 pacientes com melanoma DCD-positivo tratados no Hospital A.C. Camargo

		n	%
Gênero	Feminino	12	50,00
	Masculino	12	50,00
Localização do tumor	Cabeça	0	0,00
	Tronco	13	54,17
	Membro superior	6	25,00
	Palma da mão	0	0,00
	Membro inferior	4	16,67
	Planta do pé	1	4,16
	Metástases	13	54,17
Óbitos	6	25,00	

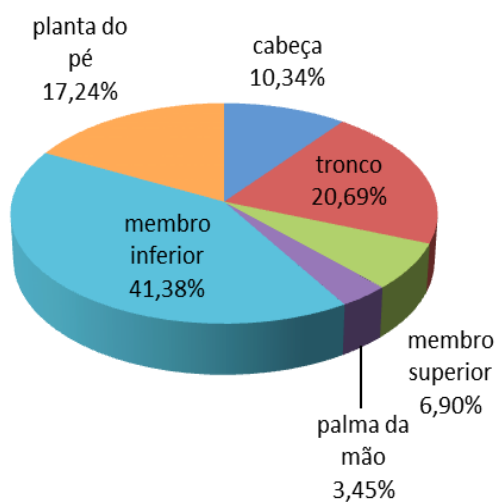
O grupo formado por pacientes com tumores positivos para a proteína, referentes à Tabela 4, por sua vez, tem idade média de 53,33 anos, sendo a idade mínima 24 anos e a máxima, 70. O seguimento para este grupo durou em média 58,66 meses.

Os gráficos a seguir (Figura 12) explicitam a diferença na localização dos tumores em função de presença ou ausência da expressão de DCD, para os pacientes desta coorte.

Pode-se notar que mesmo tendo uma taxa de metástases inferior, a taxa de óbitos no grupo de pacientes com tumores DCD-positivos foi bem superior à taxa de óbitos encontrada no grupo DCD-negativo (25% no grupo DCD-positivo contra 10,34% no grupo DCD-negativo). A localização do tumor primário também tem um grande contraste entre os dois grupos. Enquanto no grupo com expressão de DCD os tumores mais frequentes são aqueles na região do tronco ou membros superiores, regiões que costumam ser mais expostas ao

Sol, no grupo sem expressão de Dermicidina os tumores mais frequentes estão localizados nos membros inferiores e planta dos pés, áreas que geralmente possuem baixa exposição solar.

A - Tumores DCD-negativos



B - Tumores DCD-positivos

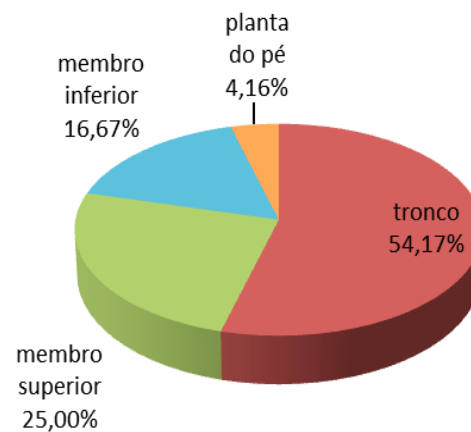


Figura 12: Distribuição das frequências relativas à localização dos tumores primários de 53 pacientes do Hospital A.C. Camargo. **A.** Representação de 29 pacientes com tumores negativos, onde se observa que a maioria dos tumores surge em áreas de baixa exposição solar. **B.** Representação de 24 pacientes com tumores DCD-positivos, onde nota-se que a grande maioria dos tumores ocorre em regiões de exposição solar frequente.

Já a análise do TMA comercial IMGEX apontou 22 amostras tumorais negativas para a expressão de DCD, e 26 positivas. Dados clínico-demográficos dos dois grupos são apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Dados clínico-demográficos de 22 pacientes com melanoma DCD-negativo provenientes do TMA IMGEX

		n	%
Gênero	Feminino	9	40,90
	Masculino	13	59,10
Localização do tumor	Cabeça	1	4,55
	Tronco	1	4,55
	Membro superior	3	13,64
	Palma da mão	0	0,00
	Membro inferior	2	9,09
	Planta do pé	2	9,09
	Globo ocular	1	4,55
	Cavidade nasal	1	4,55
	Tecidos moles	3	13,64
	Osso	1	4,55
	Pulmão	1	4,55
	Intestino	5	22,73
	Linfonodo	1	4,55
Metástases		16	72,73
Óbitos		14	63,64

A média de idade dos pacientes do grupo sem expressão de DCD nos tumores, referentes à Tabela 5, foi de 52,81 anos, com idades variando entre 34 e 77 anos. O tempo médio de seguimento destes pacientes foi de 44,13 meses.

Tabela 6. Dados clínico-demográficos de 26 pacientes com melanoma DCD-positivo provenientes do TMA IMGEX

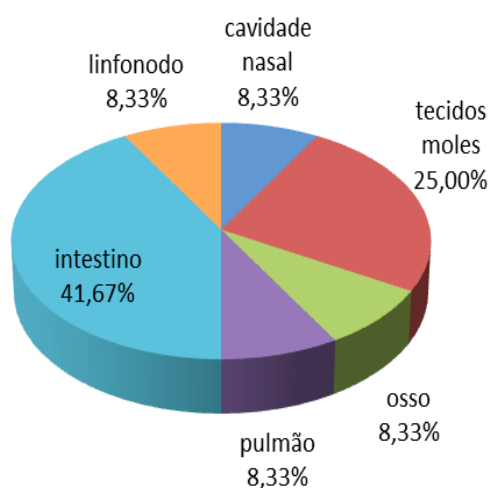
	n	%	
Gênero	Feminino	10	38,46
	Masculino	16	61,54
Localização do tumor	Cabeça	1	3,85
	Tronco	2	7,69
	Membro superior	3	11,54
	Palma da mão	1	3,85
	Membro inferior	2	7,69
	Planta do pé	2	7,69
	Globo ocular	2	7,69
	Cavidade nasal	1	3,85
	Tecidos moles	1	3,85
	Osso	2	7,69
	Pulmão	0	0,00
	Intestino	0	0,00
	Linfonodo	9	34,62
	Metástases	24	92,30
Óbitos	22	84,61	

No grupo de pacientes com tumores expressando a proteína, referentes à Tabela 6, a média de idade foi de 54,57 anos, e as idades variaram entre 20 e 76 anos. Os pacientes deste grupo tiveram seguimento de 29,96 meses, em média.

Nos gráficos abaixo (Figura 13) são exaltadas as diferenças na localização dos tumores metastáticos entre os dois grupos (devido ao pequeno número de amostras de tumores primários nesta coorte, não foi possível estabelecer comparações quanto ao sítio tumoral, por esta razão, esses casos não foram representados graficamente).

A comparação entre o grupo de pacientes com tumores DCD-positivos e o grupo com tumores DCD-negativos, mostra novamente uma taxa de óbito mais alta para indivíduos cujo tumor expressava Dermicidina (84,61% no grupo DCD-positivo e 63,64% no grupo DCD-negativo). Outro ponto observado foi a presença de DCD em metástases, com a maioria dos casos positivos relacionados à região de linfonodos.

A - Tumores DCD-negativos



B - Tumores DCD-positivos

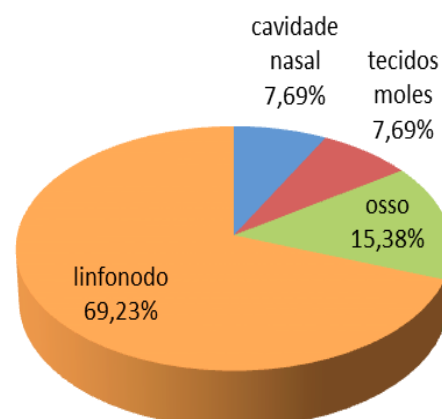


Figura 13: Distribuição das frequências relativas à localização das metástases de 25 pacientes do TMA IMGEX. **A.** Representação de 12 pacientes com metástases DCD-negativas, onde a maioria dos *spots* analisados tinha como origem o intestino. **B.** Representação de 13 pacientes com metástases DCD-positivas, em que quase 70% dos casos representam a região de linfonodos.

4.2.2 Teste de associação entre as variáveis

Para realização das análises estatísticas foram consideradas as seguintes variáveis clínico-demográficas:

- Gênero - Os indivíduos foram separados por sexo feminino ou masculino;
- Idade - Foram criadas duas categorias, pacientes com menos de 50 anos, e com mais de 50;
- Metástase - Pacientes que desenvolveram metástase (linfonodal ou à distância) ao longo do seguimento ou não;
- Seguimento - Os pacientes foram separados em dois grupos, um com menos de 60 meses entre o diagnóstico e a última consulta ou óbito pela doença, e outro com mais de 60 meses.
- Status do paciente - Indivíduos vivos ou falecidos devido à doença, durante o tempo do estudo;
- Óbitos - Dentre os pacientes que faleceram pela doença, foram formados dois grupos, um com tempo de seguimento inferior a 60 meses, e outro com tempo de sobrevivência maior que 60 meses;
- Localização do tumor - No TMA cedido pelo Hospital A.C. Camargo que possuía apenas amostras de melanomas cutâneos primários, os tumores foram divididos nas seguintes regiões: cabeça, tronco, membros superiores, palma das mãos, membros inferiores e planta dos pés. Já no TMA comercial, que possuía tecidos de metástases e de tumores primários, foram adicionadas as regiões: globo ocular, cavidade nasal, tecidos moles, osso, pulmão, intestino e linfonodo.

A análise de cada coorte individualmente pelo teste exato de Fischer não apresentou resultados estatisticamente significativos entre as variáveis e a expressão de DCD, provavelmente devido ao pequeno número amostral (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7. Correlação entre as variáveis clínico-demográficas e expressão de DCD dos pacientes tratados no Hospital A.C. Camargo

Variável	Categoria	Expressão de DCD		<i>p</i>
		Negativa	Positiva	
Gênero	Feminino	12	12	0,5874
	Masculino	17	12	
Idade	< 50 anos	14	8	0,4014
	> 50 anos	15	16	
Metástase	Presente	17	13	0,7865
	Ausente	12	11	
Seguimento	< 60 meses	9	12	0,259
	> 60 meses	20	12	
Status do paciente	Vivo	26	18	0,2705
	Falecido	3	6	
Óbitos	< 60 meses	2	4	1
	> 60 meses	1	2	

* *p* = significância estatística dada pelo teste exato de Fischer.

A análise das variáveis na coorte do Hospital A.C. Camargo (Tabela 7) não mostrou correlações com valores significativos. “Status do paciente” e “seguimento”, que representam a taxa de óbito e tempo de sobrevida, respectivamente, foram as variáveis mais próximas a uma correlação válida com a expressão de DCD.

Tabela 8. Correlação entre as variáveis clínico-demográficas e expressão de DCD dos pacientes referentes ao TMA da IMGEX

Variável	Categoria	Expressão de DCD		<i>p</i>
		Negativa	Positiva	
Gênero	Feminino	9	10	1
	Masculino	13	16	
Idade	< 50 anos	11	8	0,2393
	> 50 anos	11	18	
Metástase	Presente	16	24	0,1194
	Ausente	6	2	
Seguimento	< 60 meses	14	22	0,1107
	> 60 meses	8	4	
Status do paciente	Vivo	8	4	0,1107
	Falecido	14	22	
Óbitos	< 60 meses	14	21	1
	> 60 meses	0	1	

* *p* = significância estatística dada pelo teste exato de Fischer.

A coorte de pacientes do TMA IMGEX (Tabela 8) também não apresentou correlações significantes entre as variáveis e a expressão de DCD. Novamente, as variáveis “status do paciente” e “seguimento” foram as que ficaram mais próximas de um valor *p* significativo. Os itens “metástase” e “idade” também apresentaram uma tendência à associação com a expressão da proteína.

Com o objetivo de realizar uma análise global de todos os nossos pacientes, as duas coortes foram somadas. As correlações obtidas estão apresentadas na Tabela 9, a seguir.

Tabela 9. Correlação entre as variáveis clínico-demográficas e expressão de DCD de todos os pacientes do estudo

Variável	Categoria	Expressão de DCD		<i>p</i>
		Negativa	Positiva	
Gênero	Feminino	21	22	0,8417
	Masculino	30	28	
Idade	< 50 anos	25	16	0,1057
	> 50 anos	26	34	
Metástase	Presente	33	37	0,3894
	Ausente	18	13	
Seguimento	< 60 meses	23	34	0,0273
	> 60 meses	28	16	
Status do paciente	Vivo	34	22	0,0281
	Falecido	17	28	
Óbitos	< 60 meses	16	25	1
	> 60 meses	1	3	

* *p* = significância estatística dada pelo teste exato de Fischer.

Com a soma dos casos das duas coortes, as variáveis “seguimento” e “status do paciente” adquiriram valor significativo, e a variável “idade” ficou próxima deste valor. Uma interpretação possível destes dados é a de que a DCD está associada a um menor tempo de sobrevida, a uma probabilidade de óbito mais alta, e a idades mais avançadas.

A variável “localização do tumor”, em função da expressão de DCD, foi analisada separadamente pelo teste χ^2 . Gráficos representando os tumores primários da coorte de pacientes do Hospital A.C. Camargo (a), os melanomas cutâneos primários das duas coortes de pacientes (b), e as metástases dos pacientes do TMA comercial (c), são mostrados na Figura 14.

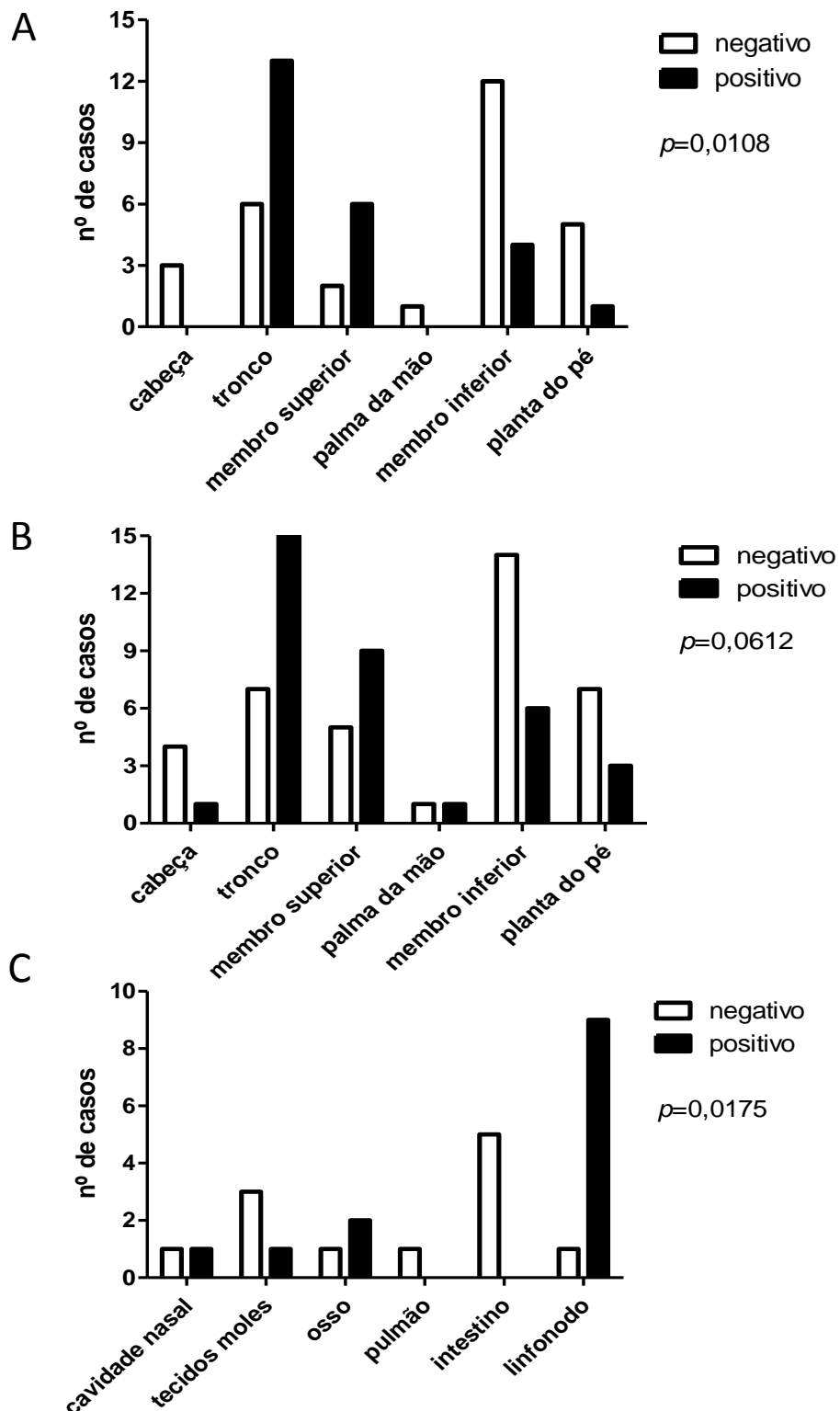


Figura 14: Correlação entre expressão de DCD e localização dos tumores. **A.** Tumores primários dos pacientes tratados no Hospital A.C. Camargo. **B.** Tumores cutâneos primários das duas coortes analisadas. **C.** Metástases dos pacientes da coorte representada pelo TMA IMGEX. * p = significância estatística dada pelo teste χ^2 .

A partir dos dados de localização dos tumores primários é possível observar uma correlação entre estes e a expressão de DCD nas regiões do tronco e dos membros superiores. Já os dados de localização das metástases confirmam a associação da expressão da proteína com a região de linfonodos.

4.2.3 Sobrevida câncer-específica

Dentre os pacientes do Hospital A.C. Camargo, a sobrevida câncer-específica em 5 anos para pacientes com melanomas DCD-positivos foi de 76,97% enquanto pacientes com tumores DCD-negativos tiveram sobrevida de 91,42%. Em 130 meses (tempo máximo analisado), esses valores foram de 64,14% e 86,61%, respectivamente. Quanto aos pacientes do TMA IMGENEX, a sobrevida câncer-específica em 5 anos foi de 36,36% para pacientes com tumores DCD-negativos, e de 18,66% para indivíduos com melanomas expressando DCD. Em 130 meses, a sobrevida do grupo DCD-negativo se manteve em 36,36%, enquanto este valor para o grupo DCD-positivo caiu para apenas 9,33%. Segundo o teste de log-rank, mesmo com uma forte tendência, não há diferença estatística significativa entre os grupos quando analisando as duas coortes separadamente.

Unindo as duas coortes, e assim aumentando o número amostral, o teste de log-rank resulta em um valor p de 0,0229, indicando uma diferença significativa entre a sobrevida de pacientes “DCD-positivos” e “DCD-negativos”. Casos com tumor DCD-negativo tiveram sobrevida de 65,54% em 60 meses e de 62,86% em 130 meses. Já indivíduos com tumor DCD-positivo tiveram sobrevida de 43,33% em 5 anos, e 28,12% em 130 meses. A Figura 15 a seguir, traz as curvas de Kaplan-Meier para análise de sobrevida câncer-específica das duas coortes separadamente e somadas, os valores p encontram-se dentro de seus respectivos gráficos.

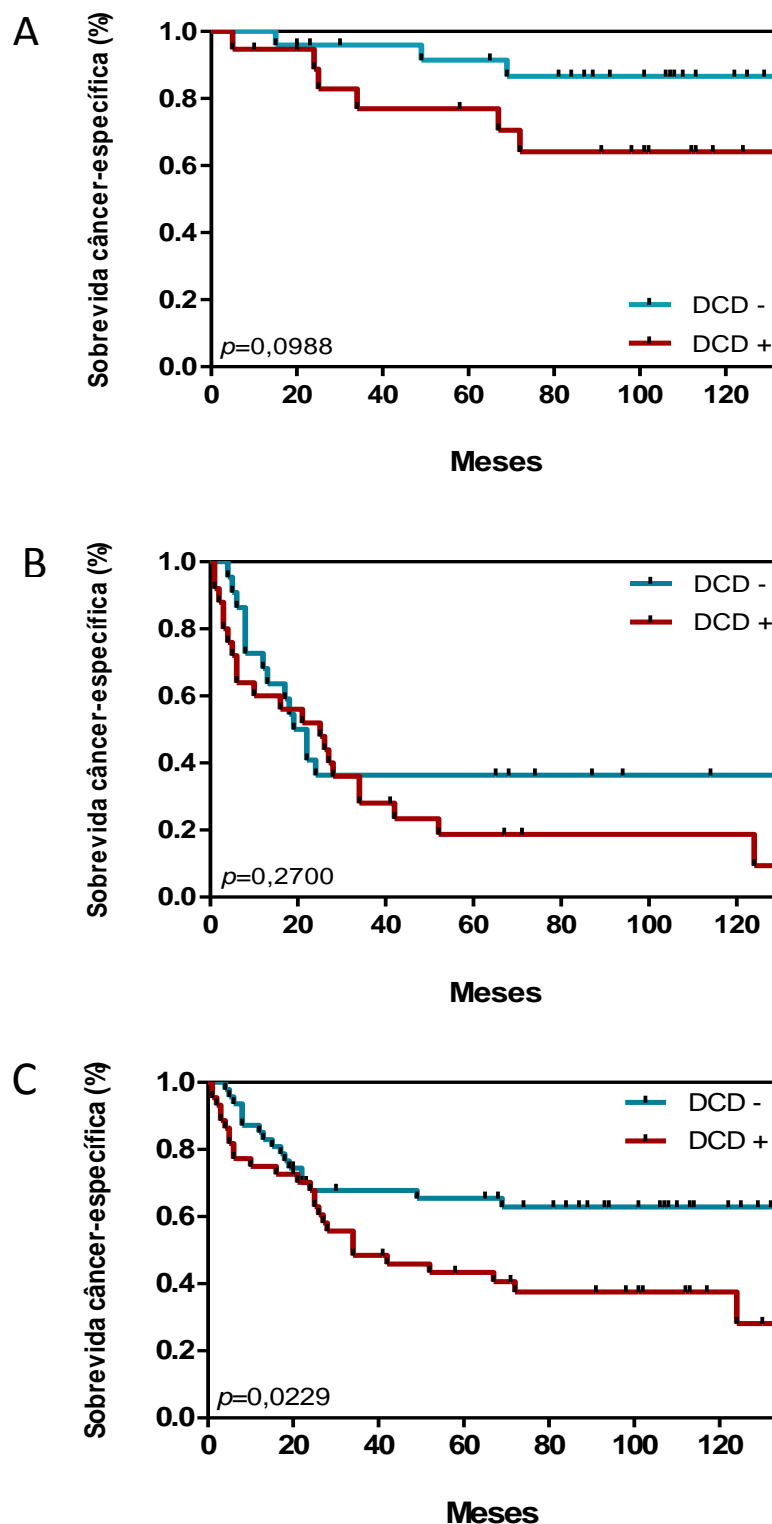


Figura 15: Curvas de sobrevivida câncer-específica de pacientes com tumores DCD-positivos e DCD-negativos. **A.** Curva de 53 pacientes tratados no Hospital A.C. Camargo (29 com tumores DCD-negativos e 24 com tumores DCD-positivos). **B.** Curva de 48 pacientes do TMA IMGENEX (22 com tumores DCD-negativos e 26 com tumores DCD-positivos). **C.** Curva de todos os 101 pacientes incluídos no estudo (grupo DCD-negativo com 51 pacientes e grupo DCD-positivo com 50). * p = significância estatística dada pelo teste log-rank.

4.3 Análise das alterações estruturais do gene DCD em melanomas

Com o intuito de identificar alterações estruturais como ampliações, deleções e mutações no gene DCD, realizamos uma análise em bases de dados genômicos de acesso aberto na internet. Também procuramos relacionar as mutações encontradas em DCD com outras alterações em genes frequentemente associados ao melanoma como BRAF, NRAS, MITF, CDK2NA e ERBB4.

Através da base dos dados disponível no site “cBioPortal”, até setembro de 2015, foram encontrados 4 estudos com melanomas descritos na literatura (Berger et al., 2012; Hodis et al., 2012; Krauthammer et al., 2012; The Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2013). Estes 4 trabalhos totalizam 515 casos de melanoma nos quais foi feito o sequenciamento de DNA em sequenciadores de última geração (NGS). O estudo realizado pela equipe do Dana-Farber Cancer Institute (Berger et al., 2012) trouxe o sequenciamento de 25 amostras de melanoma metastático. Já os estudos realizados na Universidade de Yale (Krauthammer et al., 2012), no Broad Institute em Harvard (Hodis et al., 2012), e pelo National Institute of Health (NIH) (The Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2013), disponibilizaram dados de 91, 121 e 278 amostras, respectivamente. Nestes estudos foram sequenciados casos de tumores primários e também de tecidos metastáticos.

Dos 515 casos, o gene da Dermicidina aparece com alteração na sequência de nucleotídeos em 10 amostras e amplificado em apenas um caso. Foi surpreendente observar que dentre os 10 casos de mutação confirmados, 7 deles apresentaram a mutação E43K (substituição do ácido glutâmico na posição 43 de sua sequência por lisina). É importante mencionar que esta região do gene codifica os peptídeos PIF e Y-P30, e que essa substituição é uma mutação e não um polimorfismo do gene (single nucleotide polymorphism ou SNP).

Nos 10 casos com mutação em DCD, BRAF aparece mutado 8 vezes, sendo que todos os casos com a mutação V600E em BRAF também possuem

a mutação E43K em DCD. O gene ERBB4 também aparece frequentemente mutado nestas amostras, em 90% dos casos, porém sem nenhuma mutação predominante. Os detalhes de cada caso com alteração estrutural em DCD, e a relação destes casos com os genes citados são mostrados na Tabela 10.

Tabela 10. Correlação entre alterações estruturais no gene DCD e outros genes associados ao melanoma						
Berger et al. Nature 2012. [n=25]						
	DCD	BRAF	NRAS	MITF	CDKN2A	ERBB4
Total de amostras alteradas	1 (4%)	12 (48%)	9 (36%)	0 (0%)	3 (21%)	5 (20%)
	E43K	V600E	-	-	-	P854S
Krauthammer et al. Nature Genetics 2012. [n=91]						
	DCD	BRAF	NRAS	MITF	CDKN2A	ERBB4
Total de amostras alteradas	2 (2,2%)	35 (38,5%)	21 (23,1%)	0 (0%)	1 (1,1%)	10 (11%)
	E43K	-	-	-	-	P616S
	G29R	P75L	-	-	-	G1143E, P854S, R484K
Hodis et al. Cell 2012. [n=121]						
	DCD	BRAF	NRAS	MITF	CDKN2A	ERBB4
Total de amostras alteradas	2 (1,7%)	76 (62,8%)	31 (25,6%)	1 (0,8%)	27 (22,3%)	18 (14,9%)
	E43K	V600E	-	-	-	P854S
	E43K	S102F	Q61R	-	-	-
TCGA, Provisional. [n=278]						
	DCD	BRAF	NRAS	MITF	CDKN2A	ERBB4
Total de amostras alteradas	6 (2,2%)	143 (51,4%)	86 (30,9%)	23 (8,3%)	122 (43,9%)	45 (16,2%)
	amplificação	-	Q61L	amplificação	-	-
	E43K	V600E	-	-	R58A R58Afs*57	F662N
	E43K	G466E	-	-	Q50*	D776N, E542K
	R120C e G79R	H725Y e G469E	-	-	-	E560K, G880R
	E43K	V600E	-	-	-	P759F
	E36K	-	-	-	-	R196C, P943S

* Em verde estão ressaltados os casos da mutação DCD E43K, e em azul, BRAF V600E.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A Dermicidina foi descrita em 2001, e essa anotação genômica relativamente recente implica em um número pequeno de trabalhos realizados com a proteína. Até setembro de 2015, apenas 123 trabalhos sobre DCD constavam na base de artigos do PubMed. Destes trabalhos, somente 28 apresentam os termos “dermcidin and cancer”, sendo que a vasta maioria dos artigos sobre DCD está relacionada à função mais reconhecida da proteína, como precursora de um importante peptídeo antimicrobiano secretado no suor, e às doenças de pele causadas por alterações na ação deste peptídeo.

A história deste gene, como contado por Ross, 2011, é bastante interessante. Todorov e colaboradores, em 1996, identificaram um peptídeo relacionado à perda de massa muscular e, posteriormente, a presença deste fator na urina de pacientes com carcinoma de pâncreas que sofriam de caquexia (Wigmore et al., 2000). Este peptídeo ficou conhecido como PIF (Fator Indutor de Proteólise). Em 1998, Cunningham e colaboradores identificaram outro peptídeo, em células neuronais, com função de proteção contra morte celular por estresse oxidativo (Cunningham et al., 1998; 2002). Este peptídeo, que foi chamado de Y-P30, continha a mesma sequência do PIF e mais 10 aminoácidos adicionais. Em seguida, Schitteck e colegas, 2001, identificaram e nomearam o gene DCD, que dá origem a um terceiro peptídeo com função antimicrobiana (também chamado de DCD), além dos outros dois peptídeos citados acima. Quase ao mesmo tempo, e em um contexto totalmente diferente, Porter e colaboradores, 2003, identificaram DCD como um possível oncogene para câncer de mama. Devido a grande complexidade do gene, até hoje, o mecanismo pelo qual DCD exerce suas funções biológicas não foi totalmente esclarecido.

Alguns trabalhos, como Liu et al., 2012 e Brunner et al., 2013, já demonstraram um importante papel da expressão de DCD quando analisaram genes relevantes na predição de uma assinatura gênica para melanomas, porém, até o momento, não foi realizado nenhum estudo explorando

especificamente a relação entre melanomas e expressão de Dermicidina. É importante destacar também que estes estudos com DCD foram baseados nas técnicas de DNA microarray ou de espectrometria de massa, que são metodologias quantitativas bastante poderosas, mas que não permitem a identificação de antígenos *in situ*.

A importância da detecção *in situ* da Dermicidina está na alta probabilidade de contaminação das amostras de melanoma com a própria proteína. A Dermicidina é produzida constitutivamente por glândulas écrinas da pele sadia e a coleta de tecido adjacente ao tumor pode carregar alguma dessas glândulas, levando a resultados equivocados quando não é feita uma distinção visual entre as células neoplásicas e o tecido normal. Neste trabalho, nosso grupo se propôs a analisar a expressão *in situ* da Dermicidina em casos clínicos, através de imuno-histoquímica, utilizando para a detecção da proteína um anticorpo policlonal que se liga à região C-terminal, e que até então também não havia sido explorado por outros grupos.

Através da avaliação de DCD por imuno-histoquímica em tecido controle, a pele saudável, confirmamos o que já havia sido reportado por Rieg e colaboradores em 2004 através de RT-PCR: a expressão de DCD é detectada em glândulas écrinas, mas não em queratinócitos ou melanócitos normais.

A análise inicial das amostras, feita com o uso de DAB como cromógeno da reação de imuno-histoquímica, se mostrou pouco conclusiva quanto à detecção da Dermicidina no ambiente tumoral. Já a análise posterior, com o uso do cromógeno Bajoran, apresentou resultados mais confiáveis. O uso deste cromógeno pode ter implicações bastante interessantes para a rotina clínica. Atualmente, um dos marcadores mais utilizados para o diagnóstico do melanoma maligno é a proteína S-100, mas a revelação da reação ainda é feita com DAB, e sua marcação marrom pode ser confundida com a melanina presente em macrófagos ou em melanócitos pigmentados (Salvio & Marques, 2006). Com o uso do cromógeno Bajoran, que possui coloração lilás, esse problema foi minimizado e pudemos realizar nossas análises.

Apesar de não termos encontrado grandes diferenças na intensidade da coloração, vimos que a expressão de DCD se mostrou heterogênea nas células dos melanomas, ou seja, diferentemente daqueles casos em que todas as células tumorais apresentam positividade para uma dada proteína, nos casos de melanomas com expressão de DCD, encontramos células positivas mescladas às células negativas, e também tumores em que apenas uma população celular expressava a proteína.

A análise *in situ* da expressão de DCD com o uso do cromógeno Bajoran permitiu que fosse esclarecida uma questão importante. Inicialmente, tentamos traçar um padrão de positividade para a Dermicidina com o uso de DAB como cromógeno da reação, porém a expressão da proteína foi encontrada no núcleo, no citoplasma e em membranas. Ao repetirmos os experimentos, desta vez com Bajoran, observamos que em células de melanomas com expressão de DCD, a proteína é encontrada principalmente no citoplasma, mas também pode aparecer em sua membrana plasmática. Esses dados se assemelham ao encontrado no trabalho anterior de nosso laboratório (Bancovik et al., 2015) com amostras de carcinoma mamário humano, em que a presença de DCD fora detectada no citoplasma e na membrana plasmática.

Nossos achados histológicos também mostraram que a expressão de DCD pode ocorrer em tumores com ou sem melanina. De fato, a maior parte dos casos DCD-positivos era também melanocítica, sendo que frequentemente foram encontradas células que expressavam DCD e melanina concomitantemente.

Neste estudo, foram utilizadas amostras de duas coortes de pacientes. As amostras da coorte tratada no Hospital A.C. Camargo, eram compostas apenas por tumores primários (independente do paciente ter metástases ou não). Já as amostras da coorte representada no TMA comercial, possuíam tanto amostras de tumores primários quanto de metástases. Desta forma, foi possível observamos expressão de DCD nos dois tipos de amostras. A proteína foi detectada mais frequentemente em tumores primários, mas também foi encontrada em regiões distantes de sua origem. Foi interessante notar que, nos tumores primários, a maior parte dos casos com expressão

negativa de DCD estava relacionada a neoplasias localizadas em regiões que geralmente são pouco expostas ao Sol, como pernas e pés. Já os casos de expressão positiva, foram encontrados com mais frequência em partes do corpo com maior exposição à radiação solar, como tronco ou braços. Essa associação se mostrou estatisticamente significativa quando foram considerados apenas os casos dos pacientes do Hospital A.C. Camargo ($p=0,0108$), e muito próxima de um resultado significativo, quando as amostras primárias da outra coorte foram somadas à análise ($p=0,0612$). Ao considerarmos apenas as amostras de tecidos metastáticos, pertencentes ao TMA da IMGEX, também encontramos outro dado interessante. Nas poucas amostras positivas para a proteína, a expressão de DCD não pareceu ocorrer de forma aleatória entre os tecidos ($p=0,0175$), sendo que 69,23% das amostras provinham de linfonodos, o que pode indicar o trânsito de células malignas positivas. A maior frequência de casos DCD-positivos em tumores primários e em linfonodos parece se assemelhar ao encontrado por Brauer et al., 2014, que em tumores da mama, encontrou níveis mais elevados de DCD na carcinogênese inicial, principalmente nas formas mais agressivas da doença, e em metástases linfonodais.

Em nossas análises baseadas em imuno-histoquímica encontramos um número de casos com expressão de DCD bastante elevado, e isso foi surpreendente, já que tínhamos como base os dados encontrados em portais de pesquisa na internet, como o “cBioPortal for Cancer Genomics”, em que mutações no gene aparecem em quantidades reduzidas. Uma possível explicação para esse número elevado poderia ser uma classificação errônea de nossos achados histológicos. Outra possibilidade mais forte seria a de que o DCD em melanomas não se encontra predominantemente amplificado ou mutado (que são os dados disponibilizados pelo portal) e sim constitutivamente expresso ou superexpresso, em células que não deveriam apresentar expressão em condições normais. Apoiando essa hipótese, o estudo de Hardesty e colaboradores, 2011, de expressão de biomarcadores de melanoma por espectrometria de massa (MALDI-IMS), revelou que a DCD tem expressão significativamente aumentada (3 vezes) em melanomas com invasão de

linfonodos regionais. Como nossa análise não teve caráter quantitativo, estudos futuros seriam necessários para confirmar ou refutar estes valores.

Ao tabularmos os dados dos pacientes incluídos em nosso estudo, observamos uma grande diferença entre as duas coortes, no que se refere ao número de óbitos. Na busca de uma explicação para tal diferença, descobrimos que todos os casos do TMA comercial provinham de pacientes asiáticos enquanto os casos do TMA obtido no Hospital A.C. Camargo tinham origem em pacientes predominantemente caucasianos. O melanoma cutâneo é 16,78 vezes mais frequente em caucasianos do que em asiáticos, porém o subtipo acral, que acomete regiões pouco expostas ao sol, como palma das mãos, sola dos pés e extremidade dos dedos, é o que mais acomete essa população, sendo responsável por 50% de seus casos de melanoma. Este é também, um dos tipos mais agressivos da doença. Na população caucasiana, melanomas acrais representam menos de 3% dos casos de melanoma (Juzeniene et al., 2013), sendo o melanoma superficial o tipo mais frequente. Podemos assim pensar que enquanto a maioria dos casos no TMA nacional era formada por melanomas superficiais (que são melanomas que surgem em áreas de intensa exposição solar), o TMA comercial poderia ter um número mais elevado de melanomas acrais (infelizmente, desconhecemos a localização dos tumores primários dos casos metastáticos, o que impede a confirmação desta hipótese). Também é válido supor que, como o TMA do Hospital A.C. Camargo era composto por casos primários, o número de casos da doença avançada foi menor quando comparado ao TMA comercial, que continha grande quantidade de casos já metastáticos.

Talvez os resultados mais relevantes deste trabalho residam na comparação de dados clínico-patológicos entre pacientes com tumores DCD-positivos e DCD-negativos. Apesar de DCD aparecer em alguns estudos como um gene relacionado ao melanoma, não há consenso na literatura a respeito de um papel protetivo do gene, como apontado por Brunner et al., 2013 ou de risco como defendido por Hipfel et al., 2000. Comparando os casos de nossos dois TMAs, mesmo com todas as possíveis diferenças decorrentes de características genéticas ligadas à etnia, ou ambientais, relacionadas à

exposição solar; as curvas de sobrevida câncer-específica das duas coortes apresentaram uma tendência similar, mas não atingiram um valor p significativo, provavelmente devido ao baixo número de indivíduos em cada grupo. Desta forma, com o objetivo de aumentar o grupo amostral para uma análise estatística mais robusta, somamos as duas coortes e obtivemos uma curva de sobrevida com a mesma tendência observada nas anteriores, mas desta vez com valor p capaz de atestar a diferença na sobrevida entre os grupos DCD-positivo e DCD-negativo. Isso significa que, segundo nossos dados, os grupos de pacientes com tumores sem expressão de DCD, em longo prazo, apresentam chances de sobrevida mais altas do que os pacientes com tumores expressando a proteína.

Pela análise das variáveis clínico-demográficas de cada coorte individualmente, não foram obtidos valores com significância estatística. Novamente, foram somados os dois grupos de pacientes, e então novos dados significativos foram obtidos. Não é possível afirmar que o nível de expressão de DCD está relacionado ao gênero de um indivíduo, ou à probabilidade dele desenvolver metástases, nem que, dentre os óbitos pela doença, tumores DCD-positivos causem um desfecho mais rápido que tumores DCD-negativos. Porém, com as variáveis “seguimento” e “status do paciente” é possível interpretar que pacientes com melanomas DCD-positivos têm menor tempo de sobrevida e maior possibilidade de óbito que pacientes com tumor negativo. A variável “idade” ficou próxima de um valor significativo ($p=0,1057$), indicando uma tendência da expressão de DCD estar mais relacionada a pacientes com idade superior a 50 anos.

Considerando os dados de nosso estudo, a Dermicidina se mostrou um fator de pior prognóstico para o paciente com melanoma. Isso contrasta com o encontrado por Brunner e colaboradores, em 2013. Neste estudo, através de RT-PCR, foi montada uma assinatura de 9 genes para melanoma, e estes genes, por meio de análise univariada de Cox, foram classificados como “protetivos” ou “de risco”, em função do tempo de sobrevida dos pacientes. Nos resultados deste trabalho, DCD aparece fazendo parte de um grupo de genes protetivos, relacionados a pacientes com maior tempo de sobrevida. Os autores

também detectaram expressão da proteína em 89% dos casos, o que é um número muito superior ao encontrado em nossas análises. Uma possível explicação para a diferença nos resultados dos dois trabalhos pode ser encontrada nas metodologias utilizadas. No trabalho de Brunner et al., 2013, o tecido estromal adjacente ao tumor não foi removido para os ensaios de RT-PCR, já que os autores tinham intenção de avaliar a ação destes genes também no microambiente tumoral. Considerando que a proteína é expressa constitutivamente nas glândulas écrinas da pele, esta decisão de incluir estroma nas amostras pode ter induzido classificações equivocadas, fazendo com que tumores DCD-negativos fossem classificados como positivos.

Nossos experimentos preliminares com camundongos Nude (Figuras 3), mostraram que o silenciamento do gene resultava em tumores menores e de crescimento mais lento (clones G-361 IBC-I), quando comparados aos tumores controle (clones G-361 pLKO). Isso se assemelha ao encontrado por Moreira, 2008, que ao injetar células tumorais de mama MDA-MB-361 em camundongos Nude, observou que os tumores com expressão de DCD silenciada (clones MDA-MB-361 IBC-I) eram em média 2,5 vezes menores que os tumores do grupo controle (clones MDA-MB-361 pLKO).

Já o trabalho de Trzoss et al., 2014, mostrou que o tratamento de linhagens celulares de melanoma com Seriniquinona, um produto natural isolado da bactéria marinha *Serinicoccus sp*, que alveja DCD, foi capaz de diminuir o número de células tumorais viáveis.

Alguns trabalhos, realizados com outros tipos tumorais, também obtiveram resultados que apontavam o papel oncogênico de DCD. O primeiro deles, de Porter et al., 2003, usando o método da análise seriada de expressão gênica (SAGE) encontrou superexpressão de DCD em aproximadamente 10% dos casos de câncer de mama invasivo e metástases linfonodais. Os autores correlacionaram a expressão da proteína com estádios mais avançados da doença e piores prognósticos. Eles também mostraram que a superexpressão de DCD em células de câncer de mama 21NT faziam com que elas crescessem mais que as células controle, especialmente quando o meio de cultura era deficiente em soro. A imposição de estresse oxidativo por

menadiona mostrou que as células expressando DCD tiveram maior viabilidade que as células controle. O trabalho de Lowrie e colaboradores, desta vez com células de carcinoma hepático HuH7, também mostrou o efeito protetivo de DCD contra o estresse oxidativo, provocado pela glicose oxidase, bem como um aumento na proliferação de células HuH7 superexpressando DCD, em relação ao controle (Lowrie et al., 2006; 2011). Bancovik e colaboradores, 2015, mostraram que nos tumores da mama, embora a expressão de DCD não estivesse relacionada com aumento ou diminuição da sobrevida global dos pacientes, estava associada ao alto grau histológico, em que as células tumorais são pouco diferenciadas e o tumor é mais agressivo.

É interessante pensar que tumores produzem grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio e que a célula tumoral tem que suportar esse ambiente estressor para garantir o crescimento do tumor (Szatrowski & Nathan, 1991). Assim, a expressão de DCD, protegendo a célula contra o estresse oxidativo, seria um fator de grande vantagem para uma célula maligna.

Em nossos ensaios de imuno-histoquímica, temos usado apenas o anticorpo contra a porção C-terminal da Dermicidina. Alguns autores, porém, já demonstraram que a região N-terminal da proteína apresenta forte ligação com o desenvolvimento tumoral. Stewart e colegas, 2007, desenharam um estudo com clones da linhagem celular PC-3M (câncer de próstata), que expressavam a proteína Dermicidina completa, além dos clones que eram impedidos de expressar o peptídeo PIF, o clone que não expressava os peptídeos PIF e DCD e também o clone controle. Com ensaios de sobrevivência e proliferação, os autores mostraram maior vantagem proliferativa das células com superexpressão de DCD em relação aos clones controles e também apontaram que a viabilidade dos clones que não expressavam o peptídeo DCD era semelhante à dos clones controles. Já os clones que não expressavam o peptídeo DCD, mas possuíam expressão de PIF, tinham maior resistência ao estresse oxidativo, e os valores eram semelhantes aos obtidos com clones que superexpressavam o gene completo. Em 2011, Stocki e colaboradores provaram que um peptídeo derivado da porção N-terminal da DCD, de 33 aminoácidos, tem a capacidade de se ligar a proteína HSP70, reconhecida por

estar envolvida no processo de apresentação de antígenos, mas também expressa por células tumorais em quantidades elevadas, e que esta ligação com o peptídeo teria propriedade anti-apoptótica para a célula tumoral. Também em 2011, Shen e colaboradores identificaram outro peptídeo da região N-terminal da DCD, o Y20, com capacidade de se ligar à proteína adaptadora Nck1 em carcinoma hepatocelular, o que promoveu migração celular, sugerindo assim a importância dessa combinação no desenvolvimento de metástases.

A análise de nossos casos com anticorpo contra a região C-terminal da proteína não deve interferir na identificação de casos positivos, já que a sequência do DCD não apresenta sítios alternativos para o início da transcrição, ou seja, a proteína inteira é transcrita, e os diferentes peptídeos do gene são resultado da regulação pós-traducional feita por diferentes proteases (Stewart et al., 2007).

Este trabalho não teve como objetivo principal esclarecer as vias moleculares pelas quais o gene DCD exerce seu papel na tumorigênese do melanoma. O trabalho de Pérez-Sosa, 2014, porém, forneceu uma grande contribuição neste sentido. Nele, foi analisada a expressão gênica da linhagem celular de melanoma humano G-361, comparando os clones IBC-I (expressando RNAsi para o RNAm do DCD) e pLKO (controle com expressão de DCD) através do ensaio de microarray. O resultado deste estudo mostrou que o silenciamento do gene DCD, em melanomas, altera vias de sinalização ligadas ao fator de transcrição NF- κ B e também às histonas, envolvidas no processo de remodelação da cromatina.

Procurando por associações entre o gene DCD e outros biomarcadores de melanomas, realizamos buscas em plataformas de dados genômicos disponíveis na internet. Escolhemos a plataforma cBioPortal, do Memorial Sloan Kettering Cancer Center, por concentrar dados de diversos grupos de pesquisa, incluindo aqueles disponíveis em outras plataformas, como o “Cosmic – Catalogue of Somatic Mutations in Cancer” e o “TCGA - The Cancer Genome Atlas”.

Para as comparações com os casos de melanomas com mutação em DCD, escolhemos os genes BRAF, NRAS, MITF, CDKN2A e ERBB4. BRAF é o gene mais alterado em melanomas, estando mutado em cerca de 60% dos melanomas cutâneos. Dentre as mutações em BRAF, V600E é a mais frequente (90% dos casos) (Ascierto et al., 2012). Já NRAS aparece mutado em aproximadamente 30% dos melanomas, sendo o segundo gene mais alterado neste tipo de tumor. Mutações em BRAF estão associadas à alta exposição solar no começo da vida, enquanto mutações em NRAS estão mais ligadas à exposição solar ao longo de toda a vida do indivíduo (Bertolotto, 2013). Embora alterações nesses dois genes sejam muito frequentes, mutações em BRAF ou NRAS costumam ser mutuamente exclusivas, e, sozinhas, não são suficientes para iniciar o desenvolvimento do melanoma, sendo necessárias várias alterações adicionais para o estabelecimento da doença. ERBB4 codifica um receptor tirosina quinase, cujos ligantes são fatores de crescimento epidérmicos, e está mutado em 19% dos casos de melanoma. O gene MITF por sua vez, é uma peça chave na proteção e na pigmentação da pele (Gaggioli et al., 2003). Ele regula expressão de genes envolvidos na melanogênese e no reparo de DNA (Strub et al., 2011) e tem expressão aumentada quando ocorre exposição à radiação solar intensa. Por fim, cerca de 10% dos casos de melanomas ocorrem no contexto hereditário, e as mutações no gene CDKN2A, que codifica as proteínas supressoras de tumor p16 e p14, são as mais associadas a esse melanoma familiar.

O resultado do levantamento de dados genômicos em plataformas eletrônicas mostrou alguns pontos interessantes. O primeiro deles é que em 515 casos analisados, apenas um possuía amplificação do gene. Isso significa que diferentemente do que ocorre em tumores da mama, onde a superexpressão de DCD ocorre por amplificação (Porter et al., 2003; Bancovik et al., 2015), melanomas não costumam apresentar mais de uma cópia do gene. Outro ponto observado foi a alta frequência da mutação E43K, que corresponde a 70% dos casos de mutação em DCD, e que não parece ser algo aleatório. Esta substituição ocorre na região N-terminal da proteína que, como já foi dito anteriormente, está relacionada a outras funções da proteína. Por fim,

nos casos com mutações em DCD, poucas alterações nos genes já comentados foram detectadas, com exceção dos genes BRAF e ERBB4. Nos 10 casos de tumores com mutação em DCD, 8 também apresentavam alguma mutação em BRAF e 4 desses casos correspondiam a V600E. Todos os casos com a mutação BRAF V600E também apresentavam a mutação DCD E43K, indicando uma possível relação entre essas duas alterações. Quanto ao gene do receptor tirosina quinase, dos casos com mutação em DCD, 90% também apresentavam alguma mutação em ERBB4, embora elas tenham se mostrado inespecíficas. Apesar de não termos meios para desvendar a relação entre expressão de DCD e ERBB4 neste estudo, é interessante considerarmos que na tumorigênese da mama, o gene DCD se mostrou capaz de modular a expressão de membros da família ERBB (Moreira, 2011; Bancovik et al., 2015).

Em conjunto, nossos dados mostraram que tumores expressando DCD têm frequência entre 45 e 54% (45,28% dos 53 pacientes brasileiros, 54,16% dos 48 pacientes asiáticos, e 49,5% dos 101 casos totais). Assim, a Dermicidina tem potencial para ser usada como um biomarcador de melanomas, e, segundo nossos dados, sua expressão está relacionada a tumores de pior prognóstico. Também levantamos a hipótese do gene não estar ligado aos casos de melanoma familiar, e sim à intensa exposição à radiação solar. É possível ainda especular um papel de BRAF, cujas mutações também são adquiridas ao longo da vida, influenciando a expressão de DCD em células malignas, e de DCD modulando vias da família ERBB, como ocorre em tumores mamários (Figura 16). Desta forma, novos estudos avaliando a expressão de DCD e sua correlação com estes genes se mostram muito promissores.

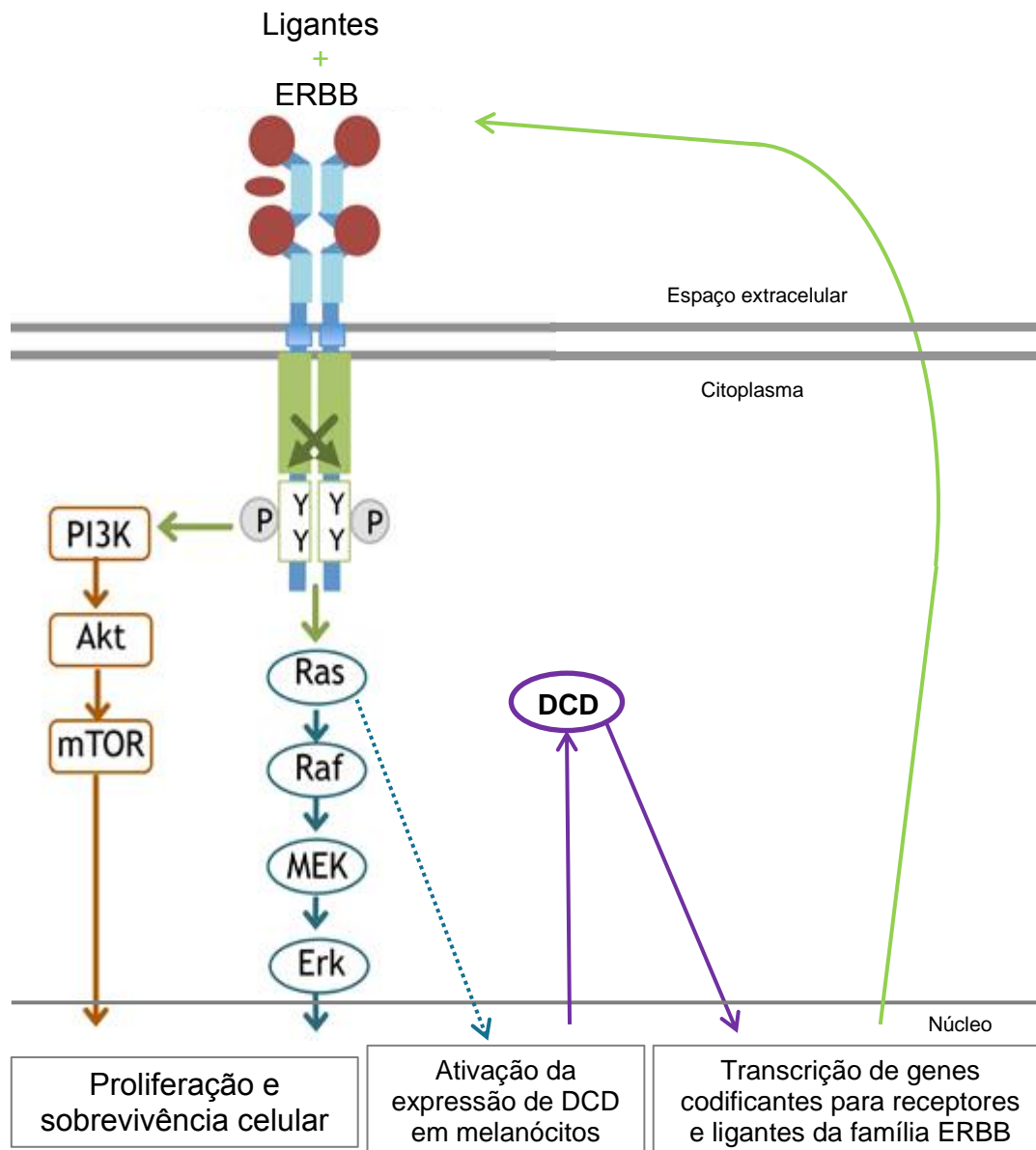


Figura 16: Esquema de um possível modelo para a ação da Dermicidina no melanoma. Mutações em BRAF, adquiridas ao longo da vida do indivíduo, poderiam ativar a expressão do gene DCD em melanócitos. A expressão de DCD então, de forma semelhante ao encontrado em células tumorais da mama (Moreira, 2011), passa a modular a expressão de genes da família ERBB, aumentando a expressão destes receptores e seus ligantes. Isso resultaria em uma maior ativação desta via, acarretando em um aumento de proliferação e sobrevivência celular. Adaptado de Moreira, 2011.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os resultados mostrados nos permitem concluir que:

1. A DCD apresenta uma expressão heterogênea nas células de melanoma e está localizada principalmente no citoplasma, embora expressão membranar também tenha sido detectada;
2. Sua expressão pode ocorrer em tumores amelanocíticos bem como em tumores melanocíticos, sendo que a maioria dos casos com expressão positiva está ligada a tumores com melanina;
3. A expressão de DCD é mais frequente em tumores primários, mas também foi observada em metástases, e está mais relacionada às lesões da pele em regiões de elevada exposição solar;
4. A expressão de DCD nos tumores correlacionou-se com maior taxa de óbito e menor sobrevida nas duas coortes estudadas;
5. Segundo as bases de dados genômicos, casos de amplificação do gene em melanomas são raros, e a substituição E43K é a mutação mais frequente. Esta substituição pode estar relacionada a mutações em BRAF, estando presente em todos os casos com a mutação BRAF-V600E analisados. Mutações em ERBB4 também parecem ser frequentes em casos com DCD mutado;
6. A expressão de DCD se mostra um potencial biomarcador para melanomas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arai S, Yoshino T, Fujimura T, Maruyama S, Nakano T, Mukuno A, Sato N, Katsuoka K. Mycostatic effect of recombinant dermcidin against *Trichophyton rubrum* and reduced dermcidin expression in the sweat of tinea pedis patients. *J Dermatol*. 2014; 42(1):70-6.

Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, Palmieri G, Testori A, Marincola FM, Mozzillo N. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Transl Med*. 2012; 10:85.

Bancovik J, Moreira D, Porter D, Carrasco D, Yao J, Moura R, Fontes-Oliveira C, Garay-Malpartida M, Carambula S, Strauss B, Camargo A, Vannier E, Wakamatsu A, Alves, VAF, Logullo A, Soares F, Polyak K, Belizário JE. Dermcidin exerts its oncogenic effects in breast cancer via modulation ERBB signaling. *BMC Cancer*. 2015; 19: 15:70.

Belizário JE, Katz M, Chencker E, Raw I. Bioactivity of skeletal muscle proteolysis-inducing factor in the plasma proteins from patients with weight loss. *Br J Cancer*. 1991; 64: 705-710.

Berger MF, Hodis E, Heffernan TP, Deribe YL, Lawrence MS, Protopopov A, Ivanova E, Watson IR, Nickerson E, Ghosh P, Zhang H, Zeid R, Ren X, Cibulskis K, Sivachenko AY, Wagle N, Sucker A, Sougnez C, Onofrio R, Ambrogio L, Auclair D, Fennell T, Carter SL, Drier Y, Stojanov P, Singer MA, Voet D, Jing R, Saksena G, Barretina J, Ramos AH, Pugh TJ, Stransky N, Parkin M, Winckler W, Mahan S, Ardlie K, Baldwin J, Wargo J, Schadendorf D, Meyerson M, Gabriel SB, Golub TR, Wagner SN, Lander ES, Getz G, Chin L, Garraway LA. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature*. 2012; 9;485(7399):502-6.

Bertolotto C. Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options. *Scientifica (Cairo)*. 2013; 2013:635203.

Box NF, Torchia EC, Roop DR. Are stem cell niches shared for skin cancers? *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010; 23:517–520.

Brauer HA, D'Arcy M, Libby TE, Thompson HJ, Yasui YY, Hamajima N, Li CI, Troester MA, Lampe PD. Dermcidin expression is associated with disease progression and survival among breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2014; 144(2):299-306.

- Brunner G, Reitz M, Heinecke A, Lippold A, Berking C, Suter L, Atzpodien J. A nine-gene signature predicting clinical outcome in cutaneous melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013; 139: 249-258.
- Burian M, Schitteck B. The secrets of dermcidin action. *Int J Med Microbiol*. 2015; 305(2):283-6.
- Cunningham TJ, Hodge L, Speicher D, Reim D, Tyler-Polsz C, Levitt P, Eagleson K, Kennedy S, Wang Y. Identification of a survival-promoting peptide in medium conditioned by oxidatively stressed cell lines of nervous system origin. *J Neurosci*. 1998; 18: 7047-7060.
- Cunningham TJ, Jing H, Akerblom I, Morgan R, Fisher TS, Neveu M. Identification of the human cDNA for new survival evasion peptide (DSEP): studies in vitro and in vivo of overexpression by neural cells. *Exp Neurol*. 2002; 177: 32-39.
- Deans DA, Wigmore SJ, Gilmour H, Tisdale MJ, Fearon KC, Ross JA. Expression of the proteolysis-inducing factor core peptide mRNA is upregulated in both tumour and adjacent normal tissue in gastroesophageal malignancy. *Br J Cancer*. 2006; 94: 731–736.
- Evans MS, Madhunapantula SV, Robertson GP, Drabick JJ. Current and future trials of targeted therapies in cutaneous melanoma. *Adv Exp Med Biol*. 2013; 779: 223–255.
- Gaggioli C, Buscà R, Abbe P, Ortonne JP, Ballotti R. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) is required but is not sufficient to induce the expression of melanogenic genes. *Pigment Cell Research*. 2003; 16(4): 374–382.
- Grosso AR, Martins S, Carmo-Fonseca M. The emerging role of splicing factors in cancer. *EMBO Reports*. 2008; 9(11): 1087-1093.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1):57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144: 646-674.
- Hardestya WM, Kelleyb MC, Mic D, Lowe RL, Capriolia RM. Protein signatures for survival and recurrence in metastatic melanoma. *J Proteomics*. 2011; 74: 1002-1014.
- Hill VK, Gartner JJ, Samuels Y, Goldstein AM. The Genetics of Melanoma: Recent Advances. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet*. 2013; 14:257–79.

Hipfel R, Schittel B, Bodingbauer Y, Garbe C. Specifically regulated genes in malignant melanoma tissues identified by subtractive hybridization. *Br J Cancer*. 2000; 82(6):1149-1157.

Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, Dicara D, Ramos AH, Lawrence MS, Cibulskis K, Sivachenko A, Voet D, Saksena G, Stransky N, Onofrio RC, Winckler W, Ardlie K, Wagle N, Wargo J, Chong K, Morton DL, Stemke-Hale K, Chen G, Noble M, Meyerson M, Ladbury JE, Davies MA, Gershenwald JE, Wagner SN, Hoon DS, Schadendorf D, Lander ES, Gabriel SB, Getz G, Garraway LA, Chin L. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*. 2012; 150(2):251-63.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Pele melanoma. Disponível em <http://www2.inca.gov.br/> Acesso em 01 de setembro de 2015.

Juzeniene A, Baturaite Z, Moan J. Sun exposure and melanomas on sun-shielded and sun-exposed body areas. *Adv Exp Med Biol*. 2014; 810:375-89.

Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchiocchi A, McCusker JP, Cheng E, Davis MJ, Goh G, Choi M, Ariyan S, Narayan D, Dutton-Regester K, Capatana A, Holman EC, Bosenberg M, Sznol M, Kluger HM, Brash DE, Stern DF, Materin MA, Lo RS, Mane S, Ma S, Kidd KK, Hayward NK, Lifton RP, Schlessinger J, Boggon TJ, Halaban R. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet*. 2012; 44(9):1006-14.

Kunz M. Oncogenes in melanoma: an update. *Eur J Cell Biol*. 2014; 93(1-2):1-10.

Kwong L, Chin L, Wagner SN. Growth factor and oncogenes as target in melanoma: lost in translation? *Adv Derm*. 2007; 23: 99-129.

Liu W, Peng Y, Tobin DJ. A new 12-gene diagnostic biomarker signature of melanoma revealed by integrated microarray analysis. *Peer J*. 2013; 1:e39.

Lowrie AG, Wigmore SJ, Wright DJ, Waddell ID, Ross JA. Dermcidin expression in hepatic cells improves survival without N-glycosylation, but requires asparagine residues. *Br J Cancer*. 2006; 94:1663-1671

Lowrie AG, Dickinson P, Wheelhouse N, Stewart GD, Ross AJ, Foster T, Ross JA. Proteolysis-inducing factor core peptide mediates dermcidin-induced proliferation of hepatic cells through multiple signaling networks. *Int J Oncol*. 2011; 39(3):709-18.

Markovic, Jasna. *Expressão gênica do fator indutor de proteólise (PIF) e de sua forma variante (PIF-SV) em células normais e malignas* (dissertação). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2003.

Meyle KD, Guldberg P. Genetic risk factors for melanoma. *Hum Genet.* 2009; 126(4):499-510.

Minami Y, Uede K, Sagawa K, Kimura A, Tsuji T, Furukawa F. Immunohistochemical staining of cutaneous tumours with G-81, a monoclonal antibody to dermcidin. *Br J Dermatol.* 2004; 151:165-169.

Moreira DF. *Redução de crescimento e resistência célula de carcinoma mamário após silenciamento do gene PIF/DCD (proteolysis-inducing-factor/dermcidin) via expressão de shRNA* (dissertação). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2008.

Moreira DF. *Avaliação da expressão dos genes envolvidos na via de sinalização induzida pela proteína dermicidina no câncer de mama* (tese). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

Moreira DF, Strauss B, Vannier E, Belizário JE. Genes up and down regulated by dermcidin in breast cancer: a microarray analysis. *Genet Mol Res.* 2008; 7(4): 925-932.

Nakano T, Yoshino T, Fujimura T, Arai S, Mukuno A, Sato N, Katsuoka K. Reduced Expression of Dermcidin, a Peptide Active Against Propionibacterium acnes, in Sweat of Patients with Acne Vulgaris. *Acta Derm Venereol.* 2015; 95(7):783-6.

Namjoshi S, Caccetta R, Benson HA. Skin peptides: biological activity and therapeutic opportunities. *J Pharm Sci.* 2008; 97(7):2524-42.

NCBI – The National Center for Biotechnology Information. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>> Acesso em 1 de setembro de 2015.

Nelson AA, Tsao H. Melanoma and genetics. *Clin Dermatol.* 2009; 27(1):46-52.

OMS - Organização Mundial da Saúde. Skin cancers. Disponível em <www.who.int> Acesso em 1 de setembro de 2015.

Pérez-Sosa NM. *Análise da expressão de genes regulados pela proteína Dermicidina nas células do melanoma maligno G-361 pelo método do DNA-Microarray* (dissertação). São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Platz A, Egyhazi S, Ringborg U, Hansson J. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol*. 2008; 1(4):395-405.

Ploper D, De Robertis EM. The MITF family of transcription factors: Role in endolysosomal biogenesis, Wnt signaling, and oncogenesis. *Pharmacol Res*. 2015; 99:36-43.

Porter D, Weremowicz S, Chin K, Seth P, Keshaviah A, Lahti-Domenici J, Bae VK, Monito CL, Merlo-Suarez A, Chan J, Hulete CM, Richardson A, Morton CC, Marks J, Duyao M, Hruban R, Gabrielson E, Gelman R, Polyak K. A neural survival factor is a candidate oncogene in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100 (19): 10931-10936.

Porter D, Lahti-Domenici J, Keshaviah A, Bae YK, Argani P, Marks J, Richardson A, Cooper A, Strausberg R, Riggins GJ, Schnitt S, Gabrielson E, Gelman R, Polyak K. Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. *Mol Cancer Res*. 2003; 1(5):362-75.

Prickett TD, Agrawal NS, Wei X, Yates KE, Lin JC, Wunderlich JR, Cronin JC, Cruz P, Rosenberg SA, Samuels Y. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nat. Genet*. 2009; 41:1127-1132.

Read J, Wadt KA, Hayward NK. Melanoma genetics. *J Med Genet*. 2015. Published Online First: [17/10/2015] doi:10.1136/jmedgenet-2015-103150.

Rieg S, Garbe C, Sauer B, Kalbacher H, Schitteck B. Dermicidin is constitutively produced by eccrine sweat glands and is not induced in epidermal cells under inflammatory skin conditions. *British Journal of Dermatology*. 2004; 151: 534-539.

Ross JA. Immune-mediated muscle wasting and cell survival – the tale of a curious gene. *J Transl Med*. 2011; 9 (s2):18.

Sagawa K, Kimura A, Saito Y, Inoue H, Yasuda S, Nosaka M, Tsuji T. Production and characterization of a monoclonal antibody for sweat-specific protein and its application for sweat identification. *Int J Legal Med*. 2003; 117: 90-95.

Salvio AG, Marques MEA. Immunohistochemistry for identification of neoplastic cells within brisk infiltrate of thin melanomas. *J Bras Patol Med Lab*. 2006; 42(2):143-148.

Sangiuliano BA. *Avaliação do tratamento do melanoma maligno humano com anticorpos monoclonais anti-EGFR, anti-HER2 e anti-Dermicidina*. Relatório de iniciação científica FAPESP. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Sangiuliano B, Pérez NM, Moreira DF, Belizário JE. Cell death-associated molecular-pattern molecules: inflammatory signaling and control. *Mediators Inflamm*. 2014; 2014:821043.

Schittek B, Hipfel R, Sauer B, Bauer J, Kalbacher H, Stevanovic S, Schirle M, Schroeder K, Blin N, Meier F, Rassner G, Garbe C. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nat Immunol*. 2001; 2: 1133-1137.

Schittek B. The multiple facets of dermcidin in cell survival and host defense. *J Innate Immun*. 2012; 4(4):349-60.

Schmidt-Pokrzywniak A, Jöckel KH, Bornfeld N, Sauerwein W, Stang A. Positive interaction between light iris color and ultraviolet radiation in relation to the risk of uveal melanoma: a case-control study. *Ophthalmology*. 2009; 116(2):340-8.

Senyurek I, Paulmann M, Sinnberg T, Kalbacher H, Deeg M, Gutschmann T, Hermes M, Kohler T, Gotz F, Wolz C, Peschel A, Schittek B. Dermcidin-derived peptides show a different mode of action than the cathelicidin LL-37 against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53: 2499–2509.

Shen SL, Qiu FH, Dayarathna TK, Wu J, Kuang M, Li SS, Peng BG, Nie J. Identification of Dermcidin as a novel binding protein of Nck1 and characterization of its role in promoting cell migration. *Biochim Biophys Acta*. 2011; 1812(6):703-10.

Shields, J.A., and Shields, S.C. *Intraocular Tumors: An Atlas and Textbook*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.

Shiga, Aline SH. *Estudo da expressão de proteínas da via de sinalização MAPK em melanomas primários em pacientes submetidos a linfonodos sentinela* (dissertação). São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2012.

Smallegange RC, Verhulst NO, Takken W. Sweaty skin: an invitation to bite? *Trends Parasitol*. 2011; 27(4):143-8.

Smoller BR. Histologic criteria for diagnosing primary cutaneous malignant melanoma. *Mod Pathol*. 2006; 19 Suppl 2:S34-40.

Song C, Weichbrodt C, Salnikov ES, Dynowski M, Forsberg BO, Bechinger B, Steinem C, de Groot BL, Zachariae U, Zeth K. Crystal structure and functional

mechanism of a human antimicrobial membrane channel. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110(12):4586-91.

Steffen H, Rieg S, Wiedemann I, Kalbacher H, Deeg M, Sahl HG, Peschel A, Gotz F, Garbe C, Schittek B. Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 2608-2620.

Stewart GD, Lowrie AG, Riddick AC, Fearon KC, Habib FK, Ross JA. Dermcidin expression confers a survival advantage in prostate cancer cells subjected to oxidative stress or hypoxia. *Prostate*. 2007; 67(12):1308-17.

Stocki P, Wang XN, Morris NJ, Dickinson AM. HSP70 natively and specifically associates with an N-terminal dermcidin-derived peptide that contains an HLA-A*03 antigenic epitope. *J Biol Chem*. 2011; 8;286(14):12803-11.

Strub T, Giuliano S, Ye T. Essential role of microphthalmia transcription factor for DNA replication, mitosis and genomic stability in melanoma. *Oncogene*. 2011; 30(20): 2319-2332.

Sullivan RJ, Flaherty KT. Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *Eur J Cancer*. 2013; 49(6): 1297-304.

Szatrowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res*. 1991; 51: 794-798.

The Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KR, Ozenberger BA, Ellrott K, Shmulevich I, Sander C, Stuart JM. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nature Genet*. 2013; 45: 1113-1120.

Timar J, Gyorffy B, Raso E. Gene signature of the metastatic potential of cutaneous melanoma: too much for too little? *Clin Exp Metastasis*. 2010; 27: 371-387.

Todorov P, Cariuk P, McDevitt T, Coles B, Fearon K, Tisdale M. Characterization of a cancer cachectic factor. *Nature*. 1996; 22;379(6567):739-42.

Trzoss L, Fukuda T, Costa-Lotufo LV, Jimenez P, La Clair JJ, Fenical W. Seriniquinone, a selective anticancer agent, induces cell death by autophagocytosis, targeting the cancer-protective protein dermcidin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014; 111(41):14687-92.

Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004; 10(8):789-99.

Walker GJ, Soyer HP, Terzian T, Box NF. Modelling melanoma in mice. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011; 24(6):1158-76.

Wang Z, Corey E, Hass GM, Higano SS, True LD, Wallace Jr D, Tisdale MJ, Vessela RL. Expression of the human cachexia-associated protein in prostate cancer and in a prostate cancer animal model of cachexia. *Int J Cancer.* 2003; 105: 123-129.

Weinberg RA. *A Biologia do Câncer.* Porto Alegre: Artmed; 2008.

Wigmore SJ, Todorov PT, Barber MD, Ross JA, Tisdale MJ, Fearon KC. Characteristics of patients with pancreatic cancer expressing a novel cancer cachectic factor. *Br J Surg.* 2000; 87(1):53-8.

Wilke K, Martin A, Terstegen L, Biel SS. A short history of sweat gland biology. *Int J Cosmet Sci.* 2007; 29(3):169-79.

Wilson TR, Fridlyand J, Yan Y, Penuel E, Burton L, Chan E, Peng J, Lin E, Wang Y, Sosman J, Ribas A, Li J, Moffat J, Sutherlin DP, Koeppen H, Merchant M, Neve R, Settleman J. Widespread potential for growth-factor - driven resistance to anticancer kinase inhibitors. *Nature* 2012; 487: 505-601.

Zalaudek I., Marghoob AA, Scope A, Leinweber B, Ferrara G, Hofmann-Wellenhof R, Pellacani G, Soyer HP, Argenziano G. Three roots of melanoma. *Arch. Dermatol.* 2008; 144:1375–1379.

ANEXOS

Anexo 1 - Dados clínico-demográficos de 53 pacientes com melanoma tratados no Hospital A.C. Camargo

Caso	Gênero	Idade	Metástase	Seguimento	Status	Localização	Expressão de DCD
1	F	61	sim	113	vivo	membro inferior	negativa
2	F	59	sim	20	vivo	membro inferior	negativa
3	M	59	não	0	vivo	tronco	positiva
8	F	47	sim	72	óbito	membro inferior	positiva
10	F	39	não	0	vivo	membro inferior	positiva
11	M	59	sim	5	óbito	tronco	positiva
12	M	85	não	132	vivo	planta do pé	negativa
13	M	58	sim	20	vivo	membro superior	positiva
14	M	47	sim	89	vivo	membro inferior	negativa
16	F	27	não	84	vivo	membro inferior	negativa
17	M	61	sim	10	vivo	planta do pé	positiva
18	F	70	sim	117	vivo	tronco	positiva
20	M	41	sim	129	vivo	tronco	negativa
21	F	39	não	132	vivo	membro inferior	negativa
22	M	49	sim	49	óbito	tronco	negativa
23	F	51	não	133	vivo	membro superior	positiva
24	M	24	não	0	vivo	tronco	positiva
26	M	69	sim	125	vivo	tronco	negativa
28	F	43	não	124	vivo	membro inferior	positiva
29	M	67	sim	65	vivo	planta do pé	negativa
30	M	38	sim	122	vivo	membro inferior	negativa
31	M	55	sim	30	vivo	membro inferior	negativa
32	F	64	sim	0	vivo	membro inferior	negativa
35	M	31	sim	93	vivo	cabeça	negativa
36	M	54	sim	25	óbito	tronco	positiva
37	M	81	não	93	vivo	planta do pé	negativa
39	M	53	sim	24	óbito	tronco	positiva
41	F	54	sim	67	óbito	tronco	positiva
42	F	37	não	108	vivo	membro superior	negativa
43	M	51	sim	113	vivo	tronco	positiva
44	F	65	não	110	vivo	membro inferior	negativa

45	F	48	não	0	vivo	membro inferior	negativa
46	M	48	sim	23	vivo	cabeça	negativa
47	M	43	sim	69	óbito	tronco	negativa
48	F	53	não	0	vivo	membro superior	positiva
49	M	39	sim	106	vivo	cabeça	negativa
50	M	66	não	113	vivo	planta do pé	negativa
51	M	83	não	112	vivo	membro superior	positiva
52	F	80	não	102	vivo	tronco	positiva
53	M	56	não	0	vivo	tronco	positiva
54	F	67	sim	34	óbito	tronco	positiva
56	M	59	não	0	vivo	tronco	negativa
57	F	43	não	58	vivo	membro superior	positiva
59	M	71	não	107	vivo	palma da mão	negativa
60	M	46	não	81	vivo	membro inferior	negativa
61	F	42	não	101	vivo	tronco	positiva
62	F	45	não	0	vivo	membro inferior	negativa
63	F	78	sim	15	óbito	planta do pé	negativa
64	F	34	sim	91	vivo	membro superior	positiva
65	M	67	sim	98	vivo	membro inferior	positiva
66	F	67	sim	87	vivo	tronco	negativa
67	F	71	sim	101	vivo	membro superior	negativa
68	M	32	sim	102	vivo	tronco	positiva

Anexo 2 - Dados clínico-demográficos de 48 pacientes com melanoma do TMA da IMGEX

Caso	Gênero	Idade	Metástase	Seguimento	Status	Localização	Expressão de DCD
1	F	37	não	144	vivo	planta do pé	negativa
3	M	43	não	139	vivo	globo ocular	negativa
4	F	65	sim	124	óbito	planta do pé	positiva
5	M	47	sim	34	óbito	palma da mão	positiva
7	M	20	não	130	vivo	membro superior	positiva
8	F	20	sim	28	óbito	tronco	positiva
9	F	73	sim	8	óbito	tronco	negativa
10	M	66	sim	4	óbito	tecidos moles	positiva
11	M	43	sim	2	óbito	membro inferior	positiva
12	M	56	sim	18	óbito	tecidos moles	negativa
15	M	55	sim	114	vivo	pulmão	negativa
17	F	63	sim	42	óbito	linfonodo	positiva
19	M	77	sim	24	óbito	intestino	negativa
20	F	36	sim	13	óbito	tecidos moles	negativa
21	M	47	sim	22	óbito	tecidos moles	negativa
22	F	35	sim	16	óbito	linfonodo	positiva
23	F	59	sim	26	óbito	cavidade nasal	positiva
24	F	36	sim	5	óbito	linfonodo	positiva
25	M	65	sim	27	óbito	linfonodo	positiva
26	F	62	não	94	vivo	membro superior	negativa
27	M	47	sim	22	óbito	intestino	negativa
28	F	57	sim	3	óbito	linfonodo	positiva
31	M	37	sim	4	óbito	membro superior	negativa
32	M	76	sim	3	óbito	membro superior	positiva
33	M	49	não	87	vivo	intestino	negativa
34	F	54	sim	0	óbito	cabeça	positiva
35	M	59	sim	34	óbito	tronco	positiva
36	F	34	não	74	vivo	membro superior	negativa
37	M	60	sim	1	óbito	osso	positiva
38	F	62	sim	71	vivo	linfonodo	positiva
41	M	63	sim	6	óbito	membro inferior	positiva

42	F	74	não	68	vivo	cabeça	negativa
43	M	56	não	67	vivo	planta do pé	positiva
44	M	65	sim	25	óbito	globo ocular	positiva
45	F	66	sim	65	vivo	linfonodo	negativa
46	M	53	sim	52	óbito	globo ocular	positiva
48	M	47	sim	21	óbito	linfonodo	positiva
49	F	38	sim	8	óbito	intestino	negativa
50	M	61	sim	19	óbito	cavidade nasal	negativa
51	F	64	sim	6	óbito	linfonodo	positiva
52	M	43	sim	1	óbito	membro superior	positiva
53	M	41	sim	17	óbito	membro inferior	negativa
54	M	71	sim	41	vivo	linfonodo	positiva
55	M	61	sim	12	óbito	osso	negativa
56	M	70	sim	10	óbito	osso	positiva
57	F	39	sim	8	óbito	intestino	negativa
58	M	74	sim	5	óbito	membro inferior	negativa
59	M	55	sim	6	óbito	planta do pé	negativa
