LOSANGES DE FÁTIMA LOZANO

**OBTENÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES
PARA PROGNÓSTICO E DIAGNÓSTICO DE
MELANOMA CUTÂNEO MALIGNO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Itamar Romano Garcia Ruiz

São Paulo

2008

RESUMO

Lozano LF. Obtenção de marcadores moleculares para prognóstico e diagnóstico de melanoma cutâneo maligno. 2008 [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

A incidência de melanoma cutâneo maligno (MM) está aumentando em torno de 2,5 a 4% por ano no mundo. Os principais fatores de risco são história familiar de MM, múltiplos nevos benignos ou atípicos, e fatores adicionais como a imunossupressão, sensibilidade solar e exposição à radiação ultravioleta (UV). A instabilidade genômica é responsável pelo acúmulo de mutações que frequentemente estão envolvidas na transformação maligna. Podemos estudar a instabilidade genômica através de duas formas: microssatélites e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Na instabilidade genética o DNA repetitivo sofre alterações. Através da Instabilidade de microssatélites (MSI) e da perda da heterozigosidade (LOH) podemos diferenciar tecidos normais de tumorais. A técnica de RAPD (baseada na PCR) produz *fingerprints* utilizados para detectar instabilidade genômica, polimorfismos, mutações e translocações quando comparados à *fingerprints* de amostras normais. No estudo de nove microssatélites encontramos um aumento de MSI ($p=0.0132$). D9S50 apresentou o maior número de alterações (28,5%) em nevos e MMs. D6S252, D9S52 e D9S180 são candidatos à marcador de prognóstico de MM porque apresentaram alterações (MSI + LOH) apenas em MMs. Na análise de 15 *primers* de RAPD em 12 amostras de MMs obtivemos 100% de alteração com relação ao número ou posição das bandas. Os *primers* OPA-2 e OPA-14 são capazes de detectar alterações genéticas nos MMs. Dos padrões obtidos foram encontradas bandas que estavam ausentes nos tumores e estas foram clonadas e seqüenciadas. Estes procedimentos evidenciaram alterações em 9q33 e 12q15. O RAPD propicia o estudo do genoma humano sem a definição prévia de um locus. Assim, podemos detectar alterações até então desconhecidas aumentando o conhecimento sobre a genômica tumoral.

Palavras-chave: Melanoma; Nevo; Instabilidade de Microssatélites e RAPD.

ABSTRACT

Lozano LF. Obtaining molecular markers from prognostic and diagnosis of cutaneous malignant melanoma. 2008. [Master thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

The incidence of malignant skin melanoma (MM) increases around 2,5 to 4% each year in the world. The main risk factors are a family history of MM, multiple benign or atypical nevus, and additional factors such as immunosuppression, sun sensibility and UV exposure. Genomic instability is responsible for a collection of mutations that are frequently involved in malignant transformation, and it can cause alterations in repetitive DNA sequences. There are two ways of studying genomic instability: microsatellites and RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA). Through microsatellite instability (MSI) and loss of heterozygosis (LOH) we can separate normal from tumoral tissues. The RAPD technique (which is based on PCR) generates fingerprints used for the detection of genomic instability, polymorphisms, mutations and translocations that can be compared to fingerprints generated from normal tissue. Studying nine microsatellites, we found an increase in MSI ($p=0.0132$). D9S50 showed the greatest number of alterations (28,5%) in nevus and MM. D6S252, D9S52 e D9S180 are candidates for MM prognostic markers since they showed alterations (MSI+LOH) in melanomas only. The analysis of 15 RAPD primers in 12 MM samples showed 100% of alteration in relation to the number or the location of the bands. OPA-2 and OPA-14 primers are capable of detecting genetic alterations in MM. In the patterns obtained, two bands which were absent in tumors were found, and they were cloned and submitted to sequencing. These procedures highlighted alterations in loci 9q33 and 12q15. RAPD makes it possible to study the human genome without a previous definition of a locus. So we are able to detect alterations so far unknown, increasing our knowledge on tumor genetics.

Key-words: Melanoma; Nevus; Microsatellite instability and RAPD.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Melanócitos

Os melanócitos cutâneos originam-se de progenitores da crista-neural que migram para a pele durante a embriogênese. Os melanócitos residem na camada basal da epiderme (Figuras 1 e 2) e nos folículos pilosos, e sua homeostase é regulada pelos queratinócitos epidermais (Slominski et al., 2004).

Figura 1. Micrografia da pele normal (x460).
FONTE: Clark et al., 1958.

Figura 2. Melanócito na camada basal da epiderme. Notar a presença de melanossomos nas células circunvizinhas dos melanócitos.

FONTE: Estructura y funciones de la piel – Melanoma, 2005.

Os melanócitos possuem algumas feições ultra-estruturais dignas de nota como a não formação de desmosomos ou outros tipos de junções entre si ou com outras células, ao contrário dos queratinócitos; não possuem tonofilamentos citoplasmáticos e os filamentos citoplasmáticos são esparsos ou ausentes, matriz citoplasmática clara e proeminência de complexos de Golgi especialmente no período de síntese de melanossomos (Bhuta, 1997).

O complexo de Golgi forma vesículas contendo tirosinase que atua nos quatro estágios da formação da melanina. Cada melanócito epidermal secreta melanossomos em aproximadamente 36 queratinócitos, formando uma unidade epidermal de melanina (Kincannon e Boutzale, 1999). A melanina, produto final das transformações da L-tirosina, é um biopolímero polimorfo e multifuncional representado pela eumelanina, feomelanina, neuromelanina e mistura de pigmentos de melanina. A biossíntese da melanina pode ser iniciada a partir da hidroxilação da L-fenilalanina à L-tirosina (passo não obrigatório) ou diretamente da L-tirosina, a qual é então hidroxilada a L-diidroxifenilalanina (L-DOPA). A L-DOPA é oxidada a dopaquinona, etapa comum das vias eu- e feomelanogênicas. A eumelanogênese envolve a transformação da dopaquinona a leucodopacromo, seguida por uma série de reações de oxido-redução com produção de diidroxindol (DHI) e DHI ácido carboxílico (DHICA), que sofre polimerização a eumelanina. A feomelanogênese também começa com a dopaquinona conjugada a cisteína ou glutatona formando a cisteinildopa e glutatotionildopa, que se transforma em feomelanina (Slominski et al., 2004) (Figura 3).

A mistura de melanina contém a eu- e feomelanina. A geração da L-DOPA, a partir de catecolaminas, exige a descarboxilação enzimática, hidroxilação e metilação produzindo dopamina, norepinefrina e epinefrina, respectivamente. In vitro, todas essas catecolaminas podem ser convertidas em neuromelanina através de reações de oxido-redução (Stepien et al., 1989); in vivo, apenas a dopamina e a cisteinildopamina podem servir como precursores primários para o pigmento (Slominski et al., 2004).

Figura 3. Síntese de melanina (GSH: glutationa; Cys: cisteína; (1): hidroxilação da fenilalanina (através do pH); (2):

Em resposta à UV, os queratinócitos secretam fatores que regulam a sobrevivência, diferenciação, proliferação e motilidade dos melanócitos, e ainda estimulam os melanócitos a produzirem melanina resultando no bronzeamento. Os melanócitos possuem papel chave na proteção da pele aos danos causados pela radiação UV e na prevenção aos cânceres de pele melanoma e não-melanoma (Gray-Schopfer et al., 2007).

1.2 Nevos

Nevos melanocíticos são tumores pigmentares benignos formados pela proliferação de melanócitos da junção dermo epidérmica. São muito comuns, freqüentemente de tonalidade marrom podendo variar na forma e tamanho e ainda, ser encontrados em qualquer lugar da pele. Quando congênito, o nevo tende a ser maior e pode apresentar 10 a 20% de transformação maligna (Festa Neto e Cucé, 2001).

Nevos pigmentares podem ser formados por melanócitos pré-existentes ou de células chamadas de nevomelanócitos que se originam de nevomelanoblastos. Embriologicamente, nevomelanoblastos são melanócitos da crista neural, que migram para a epiderme ou derme onde se diferenciam (Holbrook et al., 1989).

Mutações em genes regulatórios de crescimento, produção de fatores de crescimento autócrinos e a perda dos receptores de adesão contribuem para o rompimento da sinalização intracelular dos melanócitos e, conseqüentemente, deixam de ser controlados pelos queratinócitos (Haass et al., 2004). Assim, o melanócito pode proliferar formando nevos ou verruga (Figura 4 A, B).

Para a utilização do método diagnóstico, deve-se inicialmente identificar se a lesão pigmentada da pele é melanocítica ou não melanocítica. A presença de rede pigmentar, glóbulos ou pontos caracterizam as lesões melanocíticas; e, em relação ao nevo azul, a presença de área homogênea azul acinzentada determina seu diagnóstico (Rezze et al., 2006).

Figura 4. Progressão da transformação melanocítica: A) Pele normal mostrando a distribuição dos melanócitos na camada basal da epiderme. B) Nevos melanocíticos benignos ocorrem com o aumento do número de melanócitos. C) MM em RGP (fase de crescimento radial). D) MM em VGP (fase de crescimento vertical).

FONTE: Adaptada de Gray-Schopfer et al., 2007.

De acordo com sua localização, os nevus podem receber a nomenclatura:

- **Juncional:** proliferação melanocítica que está restrita à epiderme, apresenta tonalidade acastanhada e uniforme ou mais proeminente no centro e esmaecimento gradual para as bordas.
- **Composto:** caracterizado pela pigmentação central homogênea ou glóbulos e pontos castanhos, pretos ou azul-acinzentados. Algumas lesões podem apresentar pontos de hipopigmentação de aspecto regular e central.

- Intradérmico: não possui rede pigmentar, presença de glóbulos e pontos, pode ter aspecto nodular formado por glóbulos com pouca pigmentação ou tonalidade semelhante à pele normal (Rezze et al., 2006).

Alguns nevos são displásicos com melanócitos morfológicamente atípicos. Trata-se de um grupo de nevos melanocíticos pigmentares especiais, pode ser ou não hereditário e pacientes portadores desses nevos possuem maior risco de desenvolver MM em idades precoces, sob estímulos como a luz solar, hormônios e alterações imunológicas. Este risco é maior do que o risco associado a nevos clinicamente normais (Rivitti, 2001; Bogdan et al., 2003).

O número de nevos que um indivíduo apresenta pode ter um significado importante para o desenvolvimento de MM, principalmente a presença de nevos atípicos. Indivíduos com 50-60 nevos clinicamente normais possuem 19 vezes mais chances de desenvolverem MM do que os que apresentam apenas 10 nevos (Garbe et al., 1989).

Nevos são geralmente benignos, mas sob estímulos proliferativos podem progredir para MM em fase de crescimento radial (RGP – radial growth phase), uma lesão intra-epitelial com microinvasões na derme, sendo considerado um estágio primário do MM. Células em RGP podem progredir para a fase do crescimento vertical (VGP – vertical growth phase), um estágio mais avançado com nódulos ou ninhos de células invadindo a derme. Esta invasão pode atingir o sistema vascular e linfático adquirindo potencial metastático. O termo difusão “Pagetoid” descreve uma das características histológicas do melanoma: a migração para cima ou vertical de grupos de melanócitos dentro da epiderme (Figuras 4 C, D; e 5). Nem todos os MMs passam através dessas duas fases, podendo evoluir diretamente para MM metastático (Miller e Mihm, 2006).

Figura 5. Eventos biológicos da progressão do melanoma.
FONTE: Adaptada de Miller e Mihm, 2006.

1.3 Melanomas (MMs)

O câncer de pele é o terceiro tipo de câncer humano mais comum e sua incidência global está chegando a uma taxa alarmante. Embora menos freqüente que os outros tumores de pele (CBC e CEC) o MM possui taxa de letalidade muito mais elevada.

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) prevê para 2008 no Brasil 2.950 casos novos em homens e 2.970 em mulheres, sendo que as maiores taxas se encontram na região Sul. Satyamoorthy e Herlyn (2002) mostraram que a incidência do MM tende a aumentar de 2,5 a 4% por ano.

É importante considerar o MM como uma doença de desequilíbrio homeostático que é influenciado por um grupo de células: queratinócitos epidermais, fibroblastos dermais e endoteliais, e células inflamatórias. Melanócitos maduros não sobrevivem isoladamente na derme porque estão fora de seu ambiente. Em nevos dermais, por exemplo, os melanócitos estão agrupados, conseguindo assim ultrapassar a barreira da membrana basal, mas são impedidos de iniciar uma divisão celular agressiva (Herlyn e Satyamoorthy, 2001; Satyamoorthy e Herlyn, 2002).

1.3.1 Tipos Histopatológicos

Há quatro tipos histológicos de melanoma: superficial, nodular, acral e lentigo maligno. Geralmente, lesões superficiais e lentigos malignos possuem melhores prognósticos.

MM superficial (MM S) apresenta margens irregulares, a lesão é lisa e geralmente elevada de 2 a 4 mm, sendo facilmente palpável. Pode apresentar uma ou mais protuberâncias e estes nódulos podem estar associados à história de sangramento. A coloração é um aspecto importante: casualmente pode ter a combinação de cor de canela, marrom, cinza, preta, rosa - violácea, e até azul e branca; trata-se de uma combinação desorganizada dessas cores (Figura 6 A).

MM nodular (MM N) é uniforme, escuro, podendo ter coloração negro-azulada, mas possui três aparências variantes. A primeira é lisa com nódulo uniforme (Figura 6 B); a segunda é uma placa negro-azulada muito elevada com desenho irregular; e, a terceira freqüentemente é uma lesão ulcerada (Figura 6 C).

MM acral (MM A) ocorre geralmente em indivíduos com descendência negra, nas palmas das mãos, plantas dos pés e unhas. É um MM de prognóstico muito ruim porque a localização normalmente não apresenta melanócitos.

Lentigo maligno MM (LMM) freqüentemente abrange uma longa área de extensão e pode ser confundido com o MM S. Apresenta a mesma combinação aleatória de cores do MM S, especialmente cor de canela, marrom, reticulada ou com manchas pretas em um fundo marrom (Figura 6 D). Porém, existem três pontos que a diferenciam do MM S: o LMM tem seu desenho irregular; a superfície é principalmente plana, lisa e, o LMM apresenta vários tons de marrom, enquanto que o MM S pode apresentar tons róseo-violáceos (Clark et al., 1969).

Figura 6. A) MM superficial (MM S); B) MM nodular (MM N); C) MM N ulcerado; D) Lentigo maligno Melanoma (LMM). FONTE: (Clark et al., 1969).

1.3.2 Sistema ABCD

Conforme o Grupo Brasileiro de Melanoma (2005) uma das formas de se identificar visualmente um MM é através do Sistema ABCD (Figura 7). Lesões benignas são simétricas, apresentam bordas regulares, coloração única e diâmetro pequeno enquanto que lesões malignas são assimétricas, possuem bordas irregulares, variações de coloração e maior diâmetro.

Figura 7. Esquema representativo do Sistema ABCD de comparação entre lesões benignas e malignas.

1.3.3 Nível de Clark e Índice de Breslow

A espessura do tumor é um fator prognóstico muito importante. Este conceito foi primeiramente idealizado por Mehnert e Heard (1965), porém Clark et al. (1969) demonstraram que a taxa de sobrevivência dos pacientes diminui com o aumento no nível de invasão das células de MM (Figura 8).

Figura 8. Gráfico representando a diminuição da proporção de indivíduos vivos com o aumento do nível de Clark.

FONTE: Adaptada de Balch et al., 1991.

Grande parte dos MMs (70%) possui parte da lesão primária na derme ou abaixo da camada basal e a avaliação desta característica determina a classificação de Clark para o MM:

Nível I: todas as células tumorais estão acima da membrana basal (MM-In situ).

Nível II: as células neoplásicas romperam a camada basal, invadindo a derme papilar, mas não atingiram a derme reticular.

Nível III: neste nível as células neoplásicas estão em uma interface mal definida entre a derme papilar e reticular, começando a ocorrer a organização do colágeno em torno do tumor.

Nível IV: presença de células neoplásicas entre “pacotes” de colágeno característico da derme reticular.

Nível V: invasão subcutânea.

Breslow (1970) apresentou uma medida quantitativa do crescimento vertical do tumor utilizando um micrômetro ocular, definindo os grupos: [$<0,76$ mm]; [$>0,76$ e $<1,5$ mm]; [$>1,5$ e $<4,0$ mm]; e [$>4,0$ mm]. Posteriormente, sugeriu que a espessura tumoral menor que 0,76 mm indica um melhor prognóstico e que espessura maior que 3 mm indica pior prognóstico (Breslow, 1979).

1.3.4 Classificação TNM

Balch et al. (2001) propuseram mudanças no protocolo de estudo do estadiamento do MM, afirmando que o critério de microestadiamento, espessura e ulceração do tumor são mais importantes que outros fatores prognósticos, como o nível de invasão (Clark), padrão de crescimento e índice mitótico. Desta forma, o *American Joint Committee on Cancer – Melanoma Staging Committee* recomenda o uso da Classificação TNM (Tabela 1), onde T relaciona a espessura e a ulceração; N a presença de metástases em linfonodos; e, M a presença de metástases distantes.

Tabela 1. Classificação TNM.

Critério T	Espessura	Status de Ulceração
T1	< ou = 1,0 mm	a: sem ulceração b: com ulceração ou nível IV ou V de Clark
T2	1,01 – 2,0 mm	a: sem ulceração b: com ulceração
T3	2,01 – 4,0 mm	a: sem ulceração b: com ulceração
T4	> 4,0 mm	a: sem ulceração b: com ulceração
Critério N	Nº de Nódulos Metastáticos	Acúmulo de Nódulos Metastáticos
N1	Um linfonodo	a: micrometástases b: macrometástases
N2	2 -3 linfonodos	a: micrometástases b: macrometástases c: metástases/ satélites em trânsito sem linfonodos metastáticos.
N3	4 ou mais linfonodos, linfonodos cobertos, ou combinações de metástases ou satélites em trânsito ou melanomas ulcerados e linfonodos metastáticos.	
Critério M	Local	Lactato Dehidrogenase
M1	Distantes na pele ou linfonodos metastáticos.	Normal
M2	Metástases no pulmão	Normal
	Todos os outros órgãos viscerais	Normal
M3	ou qualquer metástase distante	Elevada

FONTE: Adaptada de Balch et al., 2001.

O primeiro critério para a classificação T é a espessura do tumor, medida em milímetros e a presença ou ausência de ulceração, determinada histopatologicamente.

A ulceração do MM é definida, sob avaliação microscópica, pela ausência de epiderme intacta na porção principal do MM primário. A ulceração pode facilmente ser

distinguida de um rompimento traumático da epiderme através da presença de hemorragia, exsudação de fibrina eosinofílica e presença de defeito arquitetural.

O MM ulcerado indica alto risco de metástase. A presença de metástase piora o prognóstico se comparado ao prognóstico de pacientes que possuem MM com a espessura equivalente sem ulceração. Assim, a taxa de sobrevida dos pacientes que apresentam MM ulcerado é proporcionalmente menor do que a taxa daqueles pacientes com MM sem ulceração. Mas é consideravelmente similar à taxa dos pacientes com melanoma sem ulceração na maior classificação T (Balch et al., 2001).

MM in situ são categorizados como Tis. MMs indeterminados ou que não podem ser microestagiados podem ser categorizados como Tx (Balch et al., 2001).

O diagnóstico do MM geralmente é feito através da patologia, porém, recentemente, inúmeros trabalhos demonstram diferenciações dos tipos de MM através de vias genéticas distintas.

1.4 Radiação Ultravioleta (UV)

Cerca de 8 a 14% dos pacientes que recebem o diagnóstico de MM apresentam história familiar positiva para a neoplasia (Grange et al., 1995) e são portadores de mais de um MM primário (Lindor e Greene, 1998). Porém, o principal fator para o desenvolvimento do MM é a radiação UV, que atua como iniciador e promotor no curso dos vários estágios da tumorigênese (Abarca e Casissia, 2002).

A luz solar causa eritema, envelhecimento prematuro e o câncer de pele humano (Breit e Kligman, 1969) e algumas pesquisas evidenciam que a UV com comprimento de onda < 320 nm (UVB possui de 290 a 320 nm) é de primária importância na indução ao dano (Figura 9).

Figura 9. Representação esquemática das radiações. A UVA possui 320 a 400 nm e UVB 290 a 320 nm de comprimento de onda.
FONTE: Adaptada de ICSE, 2007.

A exposição de células ao UV conduz à formação de dímeros de pirimidina, através da ligação covalente entre duas timinas, e foto produtos de pirimidina (4-6) pirimidona em seu DNA (Figura 10). A falta de reparo desses produtos gera mutações e aumenta a instabilidade genética (Freeman et al., 1989; Mitchell et al., 1989), podendo induzir a transcrição de alguns oncogenes (Boesen et al., 1992), gerar estresse fotoxidativo e inibir mecanismos de defesa anti-oxidativos (Fuchs e Packer, 1990).

Figura 10. À esquerda: formação de dímero de timinas e fotoprodutos entre o carbono 6 e o carbono 4 de duas timinas no DNA atingido pela radiação UV. À direita: alteração estrutural encontrada na fita dupla após a formação dos dímeros de timina.

FONTE: Adaptada de Nelson e Cox, 2004.

A ação da radiação UV na pele é influenciada pelo fototipo de cada indivíduo. FitzPatrick é uma classificação baseada na reação da queimadura solar em seis tipos de pele (Rivitti, 2001):

- *Fototipo I. Pele muito branca, cor do cabelo avermelhada; são as pessoas ruivas. A pele queima muito facilmente e dificilmente se bronzeia;
- *Fototipo II. Pele branca, geralmente são pessoas loiras de olhos claros. A pele queima facilmente e bronzeia moderada e uniformemente;
- *Fototipo III. Pele branca, cabelos castanhos escuros ou pretos. A pele queima e bronzeia moderada e uniformemente;
- *Fototipo IV. Pele clara ou bege, incluindo indivíduos orientais. A pele queima pouco, mas bronzeia fácil e moderadamente;
- *Fototipo V. Pele parda escura ou marrom médio. São os indivíduos mulatos, queimam raramente e bronzeiam muito;
- *Fototipo VI. São os indivíduos negros. Nunca queimam e bronzeiam muito.

Algumas décadas de pesquisa têm confirmado que a relação entre a exposição solar e o MM é complexa e fortemente modelada por fatores como a pigmentação e propensão ao desenvolvimento de nevos (Armstrong e Krickler, 2007).

Whiteman et al. (1998 e 2003) propuseram um modelo para classificar histologicamente o MM, tentando esclarecer o seu desenvolvimento através da atuação da luz solar, susceptibilidade a queimaduras solares e o sítio anatômico. Neste modelo foram encontradas diferenças na prevalência de nevos e de queratose solar entre pacientes com MMs de cabeça e pescoço, dos MMs de tronco (Whiteman et al., 2003). Rivers (2004) sugere que os MMs que ocorrem em sítios anatômicos diferentes podem evoluir por vias diferentes. A cabeça e o pescoço estão mais expostos à luz solar do que o tronco assim, Whiteman et al. (2006) obtiveram a confirmação de que MMs que se desenvolvem em cabeça e pescoço estão associados com exposição solar crônica enquanto que MMs de tronco estão associados à exposição solar intermitente, sustentando a hipótese de que MMs surgem de vias causais diferentes.

1.5 Genes e cromossomos ligados à progressão de MM

1.5.1 CDKN2A

O gene supressor de tumor CDKN2A está localizado no cromossomo 9p21. Os exons 1 α , 2 e 3 codificam a proteína p16INK4a e os exons 1 β , 2 e 3 codificam a p14^{ARF}. Mutações neste gene estão associadas ao MM hereditário e esporádico. O gene CDKN2B é constituído pelos exons 1 e 2 (Figura 11) e codifica a proteína p15INK4b.

A proteína p16INK4A inibe a progressão do ciclo celular por ligar-se ao complexo cdk4/6-ciclina D, que fica impedido de fosforilar pRb (fase G1) (Sherr e Roberts, 1999). pRb hipofosforilada está ligada à proteína regulatória transcricional E2F. Esta interação reprime a expressão dos genes que são alvos da E2F. Quando a pRb é fosforilada, ela libera a proteína E2F que forma um dímero com a proteína DP, ativando os genes de transcrição e de síntese de DNA (Figura 12).

Figura 11. Estrutura dos genes CDKN2A (p16 e p14) e CDKN2B (p15).
 FONTE: Adaptada de Kufe et al., 2003.

Mutações em CDKN2A podem inativar a função da p16INK4A, liberando a ação da cdk4/6-ciclina que fosforila continuamente a pRb, liberando o complexo protéico E2F/DP resultando na constante ativação gênica (Hussussian et al., 1994; Gruis et al., 1995; Randerson-Moor et al., 2001; Rizos et al., 2001).

Figura 12. Fosforilações regulam a função da pRb durante o ciclo celular. O complexo ciclina D1/cdk4 é regulado pela ação inibidora da p16INK4a. A hipofosforilação da pRb faz com que ela se ligue à E2F, impedindo a divisão celular.
 FONTE: Adaptada de Kufe et al., 2003.

Em um estudo com famílias norueguesas que têm tendência ao desenvolvimento de MMs, foi relatada uma nova deleção em linhagem germinativa que removeu 707 pb do gene CDKN2A, incluindo o exon 1 α e aproximadamente metade do exon 2. É a primeira grande deleção encontrada em linhagem germinativa do CDKN2A com um ponto de quebra localizado dentro de um exon (Knappskog et al., 2006).

1.5.2 PTCH1

O gene PTCH1 humano (9q22.3) é homólogo ao da *Drosophila* (patched). Contém 23 exons que codificam uma glicoproteína transmembrânica (*Ptc*) que regula outra proteína transmembrânica, a Smothered (*Smo*) na via de sinalização Sonic Hedgehog (Adolphe et al., 2006). *Ptc* e *Smo* se ligam uma à outra, conduzindo à inativação da via de transdução de sinal. Quando o estímulo externo SHH (Sonic Hedgehog) se liga ao receptor *Ptc*, *Smo* libera a atividade da GLI1, que se desprende de um complexo protéico composto pela proteína SUFU e “FU-like protein”. GLI1 migra para o núcleo, ativando genes de transcrição alvos: fatores GLI (GLI1, GLI2 e GLI3) e outros inibidores *feedback*, HIP1. A via então é inibida pela ativação do PKA (Schulz, 2005) (Figura 13).

Problemas na via de sinalização devido a alterações do PTCH1 estão freqüentemente associadas ao carcinoma basocelular (CBC) e à síndrome nevóide do carcinoma basocelular (SNCBS ou Síndrome de Gorlin) (Pasca di Magliano et al., 2003). Entretanto, esta região encontra-se também alterada em outros tumores, como o melanoma. No estudo de regiões polimórficas e mutações localizadas no gene PTCH1 foram encontrados *hot spots* e uma seqüência sensível a *slippage* (escorregamento da DNA polimerase) na região N-terminal deste gene (Lindstrom et al., 2006).

Figura 13. Esquema da principal via de atuação do gene PTCH: Via Sonic Hedgehog. A cascata dos fatores GLI1 pode ser diferente entre os tipos celulares. O esquema apresentado representa a via mais comum dos queratinócitos.

FONTE: Schulz, 2005.

1.5.3 TLE1 e Rasef

As mutações em CDKN2A são responsáveis por 20 a 25% dos MMs hereditários, sugerindo a existência de outros genes de susceptibilidade ao melanoma. Um estudo realizado através de um screening genético, com três famílias dinamarquesas com fenótipo de múltiplos melanomas cutâneos e oculares, excluiu a hipótese de mutação nos genes CDKN2A, CDK4, BRCA1 e BRCA2. Porém, a utilização de marcadores de microssatélites mostrou que a região 9q21 ainda apresentava alterações e assim, foram encontrados os genes TLE1 e o RASEF (Jönsson et al., 2005).

TLE1, homólogo da proteína Groucho da *Drosophila*, codifica um correpessor transcricional que liga e inibe alguns fatores de transcrição como o FOXA2 e o NF- κ B, e também interage com TCF/LEF1, inibindo a ativação transcricional da via Wnt-CTNNB1, uma via de sinalização que está envolvida com a progressão do MM (Levanon et al., 1998; Weeraratna et al., 2002).

RASEF codifica uma proteína com um domínio EF (domínio ligante de cálcio) e um motivo Ras GTPase (família Rab). Uma comparação proteína-proteína revelou

homologia entre o RASEF e um oncogene de melanoma, o c-Mel (Padua et al., 1984). Trabalhos relacionam o aumento da expressão do c-Mel por agentes estimulantes de pigmentos como o hormônio estimulante de melanócito e a radiação ultravioleta. Isto sugere que distúrbios no oncogene c-Mel alteram a pigmentação melanocítica e conseqüentemente o desenvolvimento dos melanócitos, sugerindo, portanto que o RASEF possui função similar (Jönsson et al., 2005).

1.5.4 Cromossomo 6

Mais de 80% dos tumores melanocíticos metastáticos apresentam translocações e/ou deleções envolvendo 6q (Welch e Goldberg, 1997). A perda do fenótipo tumorigênico foi observada in vitro pela introdução de uma cópia normal do cromossomo 6 em células em cultura de melanoma humano. A presença do cromossomo 6 normal promoveu a expressão de um gene designado como gene supressor de metástases de MM (KiSS1), que é mapeado em 1q32 (Trent et al., 1990).

Alguns trabalhos mostram que a deleção 6q16.3-q23 e a perda de heterozigosidade estão correlacionadas com o aumento de metástase e diminuição da expressão de KiSS1, sugerindo que KiSS1 pode ser regulado por genes que são codificados nesta região (Miele et al., 2000; Shirasaki et al., 2001). Outros fatores a serem observados são as translocações envolvendo o cromossomo 1 e 6 em MMs malignos. Duas diferentes regiões do cromossomo 1 (1p22 e 1q12-q21) foram translocadas para 6q11-13 em um estudo realizado com cinco MMs (Trent et al., 1989). Esta região cromossômica tende a ser promissora para o avanço dos estudos de MM.

1.6 Microssatélites e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Microssatélites têm sido muito utilizados como marcadores genéticos para distinguir tecidos normais e tumorais, e avaliar rearranjos no genoma associados à tumorigênese. São repetições em tandem de 1-6 pares de bases, localizadas em posições definidas em todo o genoma.

O padrão de microssatélites é individual e altamente polimórfico, em geral na condição heterozigota. Alterações nessas regiões podem influenciar a atividade de promotores, sítios de recombinação, ligação de topoisomerases de DNA, etc. (Hamada et al., 1984; Spitzner et al., 1990). A variação do número de repetições internas, devida a erros durante a replicação causa instabilidade dos microssatélites (MSI) (Hussein e Wood, 2002; Hussein et al., 2005). No caso de perda do microssatélite em um cromossomo homólogo devido a deleções, translocações, etc., ocorre perda da heterozigosidade (LOH - *Loss of Heterozygosity* - Figura 14).

Figura 14. Uso de marcadores moleculares (microssatélites A e B) para a análise do mecanismo de perda do alelo selvagem em retinoblastoma. (A) Perda por uma disjunção não mitótica. (B) Perda seguida pela reduplicação, com três cópias do cromossomo 13. (C) Recombinação mitótica proximal do locus Rb (C1), seguida pela segregação de ambos os cromossomos dentro da célula filha (C2). (D) Deleção do alelo selvagem. (E) Mutação pontual patogênica no alelo selvagem.

FONTE: Adaptado de Cavenee et al., 1983.

Outras seqüências repetitivas também estão sendo utilizadas como marcadores genéticos, gerando padrões individuais. A técnica do RAPD consiste na amplificação por PCR do DNA de regiões flanqueadas por seqüências repetitivas através de *primers* curtos (10 bases), que se anelam em regiões anônimas, produzindo um *fingerprint* do genoma.

Os padrões gerados consistem de múltiplas bandas que resolvidos por eletroforese em gel de agarose são usados para detectar diferenças entre células normais e tumorais. Podem evidenciar perda ou aparecimento de bandas, e/ou aumento ou diminuição da intensidade de coloração de bandas pré-existentes. O ganho/perda ocorre, presumivelmente, por mutações pontuais nos sítios de anelamento dos *primers* ou rearranjos envolvendo grandes fragmentos de DNA. A variação da intensidade das bandas pode ser resultante de amplificação de diferentes trechos de DNA com produtos de mesmo tamanho, aneuploidias ou poliploidias (Singh e Roy, 2004).

Foram relatadas modificações nos padrões de RAPD, por exemplo, em carcinomas pancreáticos e colorretais além da diminuição significativa no número de bandas no *fingerprint* obtido por RAPD em amostras de MM. Utilizando os *primers* OPB-15 e OPA-2 (*Operon Technologies Inc., Alameda, CA*), foram detectadas alterações genômicas entre 100 e 2.800 pb em 100% dos cânceres de pele, incluindo nevus e queratose actínica. Além disso, foram observados MSI e/ou LOH em MMs nos microssatélites D9S50 (55%) e D9S52 (71,4%) (Ionov et al., 2003; Achille et al., 1996; Ribeiro et al., 2004).

A análise dos loci mutados pode determinar se estes têm participação na tumorigênese. Singh e Roy (2004) em uma pesquisa com camundongos analisaram o produto de 478 pb, obtido através do *primer* de RAPD OPC-01. A pesquisa de homologia revelou que parte desta sequência (do nucleotídeo 122 ao 252) tem similaridade significativa (85% de identidade) com o gene do Citocromo P-450 IAI do camundongo Syrian.

7 CONCLUSÕES

- 1- Os microssatélites D6S252, D9S52 e D9S180 são possíveis candidatos a marcador prognóstico de MM.
- 2- A presença preferencial de MSI nos MMs analisados indica a ausência de um sistema de reparo eficiente.
- 3- Os padrões de RAPD foram capazes de distinguir amostras tumorais dos seus controles, assim esta técnica pode se tornar um auxílio na escolha de margens seguras para a remoção do MM.
- 4- Os *fingerprints* obtidos com os *primers* de RAPD OPA-2 e OPA-14 são capazes de detectar alterações genéticas nos MMs e, portanto poderão ser utilizados como uma ferramenta na conduta médica auxiliando a detecção de alterações genéticas em amostras malignas através da diminuição do número de bandas.
- 5- As bandas clonadas e seqüenciadas indicam alterações genéticas (deleção, mutação ou translocação) nas lesões melanocíticas em principalmente em 9q33 e 12q15, regiões que poderão ser estudadas mais profundamente para verificar o tipo de alteração que está ocorrendo e se ela está envolvida com a malignidade de MMs.
- 6- Será necessária a complementação dos estudos de RAPD iniciando pela confirmação da ausência das seqüências de 500 e 269 pb no genoma dos pacientes através da técnica de *Southern Blot*. Após a confirmação da deleção estas seqüências poderão ser utilizadas como marcadores moleculares para o estudo de lesões melanocíticas benignas e malignas.
- 7- A técnica de RAPD tem como principal característica o estudo do genoma humano sem a pré-definição de um locus. Assim, há a possibilidade de encontrar um locus desconhecido que possa estar envolvido com a malignidade tumoral proporcionando assim um aumento do conhecimento sobre a genômica tumoral.

*REFERÊNCIAS**

9q33.2 DENND1A (Isoform 1). [Database of internet]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NM_020946.1 [2008 May 08].

9q33.2 DENND1A (Isoform 2). [Database of internet]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NM_024820.2 [2008 May 95].

Abarca JF, Casiccia CC. Skin cancer and ultraviolet-B radiation under the Antarctic ozone hole: southern Chile, 1987-2000. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2002; 18:294- 302.

Achille A, Scupoli MT, Magalini AR, Zamboni G, Romanelli MG, Orlandini S, et al. APC gene mutations and allelic losses in sporadic ampullary tumors: evidence of genetic difference from tumors associated with familial adenomatous polyposis. *Inter J Cancer*. 1996; 68:305- 12.

Adolphe C, Hetherington R, Ellis T, Wainwright B. Patched 1 Functions as a gatekeeper by promoting cell cycle progression. *Cancer Res*. 2006; 66(4), 2081-88.

Armstrong BK, Kricker A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B*. 2001; 63:8-18.

Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final Version of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Cutaneous Melanoma. *J Clin Oncol*. 2001; 19: 3635-48.

Balch CM, Soong SJ, Shaw HM. An analysis of prognostic factors in 8500 patients with cutaneous melanoma. In: Balch CM, Houghton AW, Milton GW, editors. *Cutaneous Melanoma*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott; 1991. p. 165-87.

Bhuta S. Electron microscopy in the diagnosis of melanocytic neoplasms. In: Cochran AJ, Bailly C, Paul E, Remotti F, editors. *Melanocytic tumors. A guide to diagnosis. Biopsy Interpretation Series*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997. p. 311- 20.

Nucleotide Blast. [Program of internet]. Available from: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&MEGABLAST=on&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome [2008 Nov 10].

BLAT. [Program of internet]. Available from: <http://genome.brc.mcw.edu/cgi-bin/hgBlat> [2007 Dec 18].

BLAT - DENND1A. [Database of internet]. Available from: http://genome.brc.mcw.edu/cgibin/hgTracks?position=chr9:125427018125427142&db=hg18&ss=/trash/hgSs/hgSs_genome_7035_105700.pslx+/trash/hgSs/hgSs_genome7035_105700.fa&hgside=1110971 [2008 Feb 28].

BLAT - Resultado 1. [Database of internet]. Available from: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?position=chr12:68617779-69040000&hgside=116783723> [2008 Feb 15].

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

BLAT – Resultado 2. [Database of internet]. Available from: http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?hgsid=116783723&hgt.in2=+3x+&position=chr9%3A123885245-126968914&hgtgroup_map_close=0&hgtgroup_phenDis_close=1&hgtgroup_genes_close=0&hgtgroup_rna_close=1&hgtgroup_expression_close=1&hgtgroup_regulation_close=1&hgtgroup_com pGeno_close=1&hgtgroup_varRep_close=1&hgtgroup_encodeGenes_close=1&hgtgroup_encodeT xLevels_close=1&hgtgroup_encodeChip_close=1&hgtgroup_encodeChrom_close=1&hgtgroup_encodeCompAndVar_close=1 [2008 Mar 15]

Boesen JJ, Dieteren N, Bal E, Lohman PH, Simons JW. A possible factor in genetic instability of cancer cells: stress-induced secreted proteins lead to decrease in replication fidelity. *Carcinogenesis*. 1992; 13: 2407- 13.

Bogdan I, Smolle J, Kerl H, Burg G, Böni R. Melanoma ex naevo: a study of the associated nevus. *Melanoma Res*. 2003; 13:213-17.

Breit, R, Kligman, AM: Measurement of erythematous and pigmentary responses to ultraviolet of different spectral qualities. In: Urbach F. The biologic effects of ultraviolet radiation (with emphasis on the skin). Oxford: Pergamon Press; 1969. p.267-75.

Breslow A. Prognostic factors in the treatment of cutaneous malignant melanoma, *J Cutan Pathol*. 1979; 6:208-12.

Breslow A. Thickness, cross-sectioned area and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *An Surg*. 1970; 172:902-908.

Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, et al. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*. 1983; 305:779-784.

Chaos + Dialign. [Program of internet]. Available from: <http://dialign.gobics.de/chaos-dialign-submission> [2008 Jan 15].

Claij N, Riele H. Microsatellite instability in human cancer: a prognostic marker for chemotherapy? *Exp Cell Res*. 1999; 246:1-10.

Clark WH E Hibbs RG. Electron microscope studies of the human epidermis the clear cell of masson (dendritic cell or melanocyte). *J Biophysic Biochem Cytol*. 1958; 4 (6):679-83.

Clark WH, From L, Bernadino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanoma of the skin. *Cancer Res*. 1969; 29:705-26.

Cooney KA, Wetzel JC, Consolino C, Wojno KJ. Identification and characterization of proximal 6q deletion in prostate cancer. *Cancer Res*. 1996; 56:4150-53.

Estructura y funciones de la piel – Melanoma. [Página de internet]. Available from: http://escuela.med.puc.cl/publicaciones/Guias/Dermatologia/estructura/DermatoEst_09a.html . [2005 jun 13].

Festa Neto C e Cucé LC. Manual de Dermatologia. São Paulo: Atheneu; 2001.

Freeman SE, Hacham H, Gange RW, Maytum DJ, Sutherland JC. Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86: 5605- 9.

Fuchs J, Packer L. Ultraviolet irradiation and the skin antioxidant system. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1990; 7: 90- 2.

Garbe C, Kruger S, Stadler R, Guggenmoos HI, Orfanos CE. Markers and relative risk in a German population for developing malignant melanoma. *Inter J Dermatol*. 1989; 28:517-23.

Grange F, Chompret A, Guilloud-Bataille M, Guillaume JC, Margulis A, Prade M, et al. Comparison between familial and non-familial melanoma in France. *Arch Dermatol*. 1995; 131:1154-9.

Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new-targeted therapy. *Nature*. 2007; 445:851-7.

Green CL, Khavari PA. Targets for molecular therapy of skin cancer. *Sem Cancer Biol*. 2004; 14: 63- 9.

Gruis NA, Van der Velden PA, Sandkuijl LA, Prins DE, Weaver-Feldhaus J, Kamb A, et al. Homozygotes for CDKN2 (p16) germ line mutation in Dutch familial melanoma kindreds. *Nature Genet*. 1995; 10: 351- 3.

Grupo Brasileiro de Melanoma (GBM) – Tipos clínicos de melanoma. [Página da internet] 2005. Disponível em: http://www.gbm.org.br/ac_livre/apoio/art003.asp [2005 may 18].

Guan XY, Zhang H, Yang JM, Wang J, Taetle R, Meltzer PS, et al. Detection of chromosome 6 abnormalities in melanoma cell lines by chromosome arm painting probes. *Cancer Genet Cytogenet*. 1998; 107(2):89-92.

Haass NK, Smalley KS, Herlyn M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. *J Mol Histol*. 2004; 35:309-18.

Hamada H, Seidman M, Howard BH, Gorman CM. Enhanced gene expression by the poly (dT-dG)n (dG-dT)n polymorphisms. *Mol Cell Biol*. 1984; 4: 2622.

Herlyn M, Satyamoorthy K. Molecular biology of cutaneous melanoma. In: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. De vita VT, Hellman D, Rosenberg SA. Lippincott Williams and Wilkins; 2001. p. 2003-12.

Holbrook KA, Underwood RA, Vogel AM, Gown AM, Kimball H. The appearance, density and distribution of melanocytes in human embryonic and fetal skin revealed by the anti-melanoma monoclonal antibody, HMB-45. *Anat Embryol*. 1989; 180:443-55.

Hussein MR, Wood GS. Microsatellite instability and its relevance to cutaneous tumorigenesis. *J Cutan Pathol*. 2002; 29: 257- 67.

Hussein MR, Haemel AK, Sudilovsky O, Wood GS. Genomic instability in radical growth phase melanoma cell lines after ultraviolet irradiation. *J Clin Pathol*. 2005; 58: 389- 96.

Hussussian CJ, Struwing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, et al. Germ line p16 mutations in familial melanoma. *Nature Genet*. 1994; 8: 15- 21.

ICSE. [Página da internet]. Available from: www.icse.umn.edu/specs/labs/glossary_items/em_spectrum.html [2007 Apr 10].

Instituto Nacional do Câncer: Incidência de melanoma 2008 [Página da internet]. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=mapa.asp&ID=10> [2008 May 11].

Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveals a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*. 1993; 363: 558.

Jönsson G, Bendahl PO, Sandberg T, Kurbasic A, Staaf J, Sunde J, et al. Mapping of a novel ocular and cutaneous malignant melanoma susceptibility locus to chromosome 9q21.32. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97 (18): 1377-82.

Kincannon J, Boutzale C. The physiology of pigmented nevi. *Pediatrics.* 1999; 104:1042-45.

Knappskog S, Geisler J, Arnesen T, Lillehaug JR, Lonning PE. A Novel type of deletion in CDKN2A gene identified in a melanoma prone family. *Gen Chrom Cancer.* 2006; 45(12):1155-63.

Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast RC Jr, Gansler TS, Holland JF, et al. *Cancer Medicine.* 6th ed. Canada: BC Decker Inc; 2003. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=p16&rid=cmed6.section.1579> [2007 ago 23].

Lachner M, O'Sullivan RJ, Jenuwein T. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci.* 2003; 116(11):2117-24.

Laribee RN, Shibata Y, Mersman DP, Collins SR, Kemmeren P, Roguev A, et al. CCR4/NOT complex associates with the proteasome and regulates histone methylation. *PNAS.* 2007; 104(14): 5836-41.

Levanon D, Goldstein RE, Bernstein Y, Tang H, Goldenberg D, Stifani S, et al. Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. *Proc Natl Acad Sci.* 1998; 95:11590-95.

Levivier E, Goud B, Souchet M, Calmels TP, Mornon JP, Callebaut I. uDENN, DENN and dDENN: Indissociable domains in Rab and MAP Kinases Signaling Pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 287:688-95.

Lindor N M, Greene M H. The concise handbook of family cancer syndromes. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90 (14):1039-71.

Lindstrom E, Shimokawa T, Toftgard R, Zaphiropoulos PG. PTCH mutations: distribution and analyses. *H Mut.* 2006; 27 (3): 215-19.

Mehnert JH, Heard JL. Staging of melanoma by depth of invasion: A proposed index to prognosis. *An J Surg.* 1965; 110:68.

Miele M E, Jewett MD, Goldberg SF, Hyatt DL, Morelli C, Gualandi F, et al. A human melanoma metastasis-suppressor locus maps to 6q16.3-q23. *Inter J Cancer.* 2000. 86: 524-28.

Miller AJ, Mihm MC. Mechanisms of disease – Melanoma. *New Engl J Med.* 2006; 355:51-65.

Millikin D, Meese E, Vogelstein B, Witkowski C, Trent J. Loss of heterozygosity for loci on long arm of chromosome 6 in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 1991; 51:5449-53.

Misra A, Chattopadhyay P, Chosdol K, Sarkar C, Mahapatra AK, Sinha S. Clonal mutations in primary human glial tumors: evidence in support of the mutator hypothesis. *BMC Cancer.* 2007; 7(190):1-13.

Mitchell DC, Stafford LJ, Li D, Bar-Eli M, Liu M. Transcriptional regulation of KiSS 1 gene expression in metastatic melanoma by specificity protein-1 and its co activator DRIP-130. *Oncogene.* 2007; 26: 1739-47.

Mitchell DL, Zdzienicka MZ, van Zeeland AA, Nairn RS. Intermediate (6-4) photoproduct repair in

Chinese hamster V79 mutant V-H1 correlates with intermediate levels of DNA incision and repair replication. *Mut Res.* 1989; 226: 43- 47.

NC_000009.10. [Database of internet]. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NC_000009.10&from=125181754&to=125732238&strand=2&dopt=fasta [2008 Feb 05].

Nelson DL, Cox MM. *Nucleic Acid Chemistry*. In: Menninger – Principles of biochemistry. 4th ed. New York: Palgrave; 2004 .p. 295.

NM_020946.1. [Database of internet]: Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NK_020946.1&dopt=fasta [2008 Feb 25].

NM_024820.2. [Database of internet]. Available from:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NK_024820.2&dopt=fasta [2008 Feb 26].

Ong T, Song B, Qian H, Wu ZL, Whong W. Detection of genomic instability in lung cancer tissues by random amplified polymorphic DNA analysis. *Carcinogen.* 1998; 19(1): 233-35.

Padua RA, Barrass N, Currie GA. A novel transforming gene in a human malignant melanoma cell line. *Nature.* 1984; 311: 671-73.

Papadopoulos S, Benter T, Anastassiou G, Pape M, Gerhard S, Bornfeld N, et al. Assessment of genomic instability in breast cancer and uveal melanoma by random amplified polymorphic DNA analysis. *Inter J Cancer.* 2002; 99: 193-200.

Pasca di Magliano M, Hebrok M. Hedgehog signaling in cancer formation and maintenance. *Natl Rev Cancer.* 2003; 3: 903-11.

Randerson-Moor JA, Harland M, Williams S, Cuthbert-Heavens D, Sheridan E, Aveyard J, et al. A germ line deletion of p14 (ARF) but not CDKN2A in a melanoma-neural system tumor syndrome family. *Hum Mol Genet.* 2001; 10(1):55-62.

Rezze GG, Soares de Sá BC, Neves RI. Dermatoscopia: o método de análise de padrões. *An Bras Dermatol.* 2006; 81(3):261-68.

Ribeiro GR, Francisco G, Teixeira LV, Romão-Correa RF, Sanches-Jr JA, Festa Neto C, et al. Repetitive DNA alterations in human skin cancers. *J Dermatol Sci.* 2004; 36: 79- 86.

Rivers JK. Is there more than one road to melanoma? *Lancet.* 2004; 363:728-30.

Rivitti S. Lesões e nevus melanocíticos, Melanoma Maligno In *Dermatologia*. São Paulo: Artes Médicas; 2001. p. 869- 86.

Rizos H, Puig S, Badenas C, Malveyh J, Darmanian AP, Jimenez L, et al. A melanoma-associated germ line mutation in exon 1 beta inactivates p14ARF. *Oncogene.* 2001; 20: 5543- 5547.

Satyamoorthy K, Herlyn M. Cellular and molecular biology of human melanoma. *Cell Biol Ther.* 2002; 1:14-7.

Schulz WA. *Cancer Pathways*. In: Molecular biology of human cancers. An advanced student's textbook. Dusseldorf, Germany: Springer-Verlag; 2005. p. 139.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G-phase progression. *Genes Develop.* 1999; 13: 1501- 12.

Shirasaki F, Takata M, Hatta N, Takehara K. Loss of expression of the metastasis suppressor gene KiSS1 during melanoma progression and its association with LOH of chromosome 6q16.3-q23. *Cancer Res.* 2001; 61:7422-25.

Sigh KP, Roy D. Somatic mutations in stilbene estrogen-induced Syrian hamster kidney tumors identified by DNA *fingerprinting*. *J Carcinogen.* 2004; 3(4).

Singh KP, Roy D. Identification of novel breast tumor-specific mutation(s) in the q11.2 region of chromosome 17 by RAPD/AP-PCR *fingerprinting*. *Gene.* 2001; 269(1-2):33-43.

Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev.* 2004; 84:1155-228.

Soufir N, Gerard B, Portela M, Brice A, Liboutet M, Saiag P, et al. PTCH mutations and deletions in patients with typical nevoid basal cell carcinoma syndrome and in patients with a suspected genetic predisposition to basal cell carcinoma: a French study. *British J Cancer.* 2006; 95:548-53.

Spitzner JR, Chung JK, Muller MT. Eukaryotic topoisomerase II preferentially cleaves alternating purine-pyrimidine repeats. *Nucl Ac Res.* 1990; 18:1-11.

Stepien KB, Dworzanski JP, Bilinska B, Porebska-Budny M, Hollek AM, Wilczok T. Catecholamine melanins. Structural changes induced by copper ion. *Biochim Biophys Acta.* 1989; 997: 49-54.

Tibiletti, MG, Bernasconi B, Furlan D, Riva C, Trubia M, Buraggi G, et al., Early involvement of 6q in surface epithelial ovarian tumors. *Cancer Res.* 1996; 56:4493-98.

Trent JM, Stanbridge EJ, McBride HL, Meese EU, Casey G, Araujo DE, et al. Tumorigenicity in human melanoma cell lines controlled by introduction of human chromosome 6. *Science.* 1990; 247:568-71.

Trent, JM, Tompkins FH, Meyskens Jr, FL. Identification of a recurring translocation site involving chromosome 6 in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 1989; 49: 420-23.

Wada M, Nakanishi H, Satoh A, Hirano H, Obaishi H, Matsuura Y, et al. Isolation and characterization of a GDP/GTP exchange protein specific for the Rab3 subfamily small G proteins. *J Biol Chem.* 1997; 272:3875-78.

Walker GJ, Palmer JM, Walters MK, Nancarrow DJ, Parsons PG, Hayward NK. Simple tandem repeat allelic deletions confirm the preferential loss of distal chromosome 6q in melanoma. *Int J Cancer.* 1994; 58:203-6.

Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, et al. Wnt5 a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell.* 2002; 1:279-88.

Welch DR, Goldberg SF. Molecular mechanisms controlling human melanoma progression and metastasis. *Pathobiology.* 1997; 65:311-30.

Whiteman DC, Green A, Parsons PG. p53 expression and risk factors for cutaneous melanoma: a case-control study. *Int J Cancer.* 1998; 77:843-48.

Whiteman DC, Stickley M, Watt P, Hughes MC, Davis MB, Green AC. Anatomic site, sun exposure and risk of cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2006; 24(19):3172-77.

Whiteman DC, Watt P, Purdie DM, Hughes MC, Hayward NK, Green AC. Melanocytic nevi, solar keratoses and divergent pathways to cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95:806-12.