

PAULA CRISTINA DE FARIA SANCHEZ

**Melanoma em crianças, adolescentes e adultos jovens:
epidemiologia, correlação clínico-patológica e estudo genético**

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

Programa: Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Cyro Festa Neto

**São Paulo
2023**

PAULA CRISTINA DE FARIA SANCHEZ

**Melanoma em crianças, adolescentes e adultos jovens:
epidemiologia, correlação clínico-patológica e estudo genético**

Versão Original

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

Programa: Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Cyro Festa Neto

**São Paulo
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Sanchez, Paula Cristina de Faria
Melanoma em crianças, adolescentes e adultos
jovens : epidemiologia, correlação clínico-patológica
e estudo genético / Paula Cristina de Faria
Sanchez. -- São Paulo, 2023.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Dermatologia.
Orientador: Cyro Festa Neto.

Descritores: 1.Melanoma 2.Crianças 3.Adultos
jovens 4.Epidemiologia 5.Histologia
6.Imunoistoquímica 7.Genes CDKN2A 8.Proteínas proto-
oncogenes BRAF 9.Gene NRAS 10.Sequenciamento de DNA

USP/FM/DBD-071/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: SANCHEZ, Paula Cristina de Faria

Título: Melanoma em crianças, adolescentes e adultos jovens: epidemiologia, correlação clínico-patológica e estudo genético

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

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dra. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese ao meu marido Valter, maior incentivador para que eu concluísse este trabalho, apesar das adversidades.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por me ajudar a superar os obstáculos encontrados ao longo do tempo de trabalho.

Aos meus pais Ana e José e minha irmã Gabriela pelo amor incondicional.

Ao meu marido Valter por seu incentivo constante para que eu concluísse a tese.

Ao meu querido filho Martin, que me ensina diariamente a ser uma pessoa melhor.

A todos os meus professores, em especial ao meu orientador Prof. Dr. Cyro Festa que sempre me apoiou e acreditou no meu potencial.

À Profa. Dra. Silvia Lourenço, fundamental em todas as etapas da minha tese e sem a qual, certamente, não chegaria aqui.

Ao Prof. Dr. Marcello Menta, que sempre me incentivou a estudar e me ensinou a maior parte da dermatologia que eu sei hoje.

Ao Doutor Ricardo Hsieh, que me ajudou em toda a parte laboratorial desse trabalho.

À minha querida amiga Aliene com quem eu comecei essa jornada pelos melanomas, ainda durante a residência médica.

À Dermatopatologia do HC-FMUSP pela colaboração com os espécimes utilizados.

À Divisão de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo pela infra-estrutura utilizada.

Aos doentes que doaram material para esse trabalho.

“Os enigmas do universo só lentamente se revelam à nossa investigação. Existem questões às quais o homem, atualmente, não pode nos dar respostas, mas, o trabalho científico constitui o único caminho que pode nos levar a um verdadeiro conhecimento da realidade externa a nós.”

Sigmund Freud

RESUMO

Sanchez PCF. Melanoma em crianças, adolescentes e adultos jovens: epidemiologia, correlação clínico-patológica e estudo genético [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

O melanoma cutâneo é uma doença multifatorial associada a fatores genéticos, imunológicos e ambientais. Usualmente afeta indivíduos acima de 50 anos, sendo incomum em crianças, adolescentes e adultos jovens. O melanoma em pré-púberes é muito raro e apresenta baixa mortalidade. Já em adolescentes e adultos jovens (15 e 39 anos), apresenta peculiaridades em seus padrões de distribuição e perfil genético.

A patogênese dos melanomas cutâneos tem sido relacionada a duas vias moleculares - a via MAP kinase, implicada em mecanismos de proliferação e sobrevivência celular e a via CDKN2A que tem influência sobre a regulação do ciclo celular; essa última é relatada como importante no desenvolvimento de melanomas em pacientes jovens. Considerando a relevância dessa neoplasia na área da dermatologia, sua raridade em pacientes jovens e as lacunas de conhecimento do tema, o presente estudo teve como objetivos: 1) mapear a incidência de melanoma nas faixas etárias de 0 a 14 anos e de 15 a 39 e correlacionar os aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos; 2) analisar os perfis de expressão das vias MAP kinase e CDKN2A por meio de estudo imunoistoquímico; 3) sequenciar os casos de melanomas em jovens por meio da técnica *Next Generation Sequencing* (NGS) para avaliação do perfil de mutações dessas lesões. Nosso estudo mostrou a maior prevalência de melanomas no tronco de indivíduos com 15 a 39 anos e sua relação com exposição solar aguda e intermitente. O tipo histológico mais prevalente foi o extensivo superficial de Breslow menor que 1 mm. Não foi observada correlação estatística entre perda da expressão do p16 na imunoistoquímica e a espessura de Breslow. Destaca-se, portanto, a importância de avaliar a perda da expressão de p16 nos melanomas em adolescentes e adultos jovens e/ou com histórico familiar, a fim de direcionar esses casos para estudo genético da mutação em CDKN2A. Em relação ao NGS, dos 14 testados, 8 apresentaram mutações em BRAF, 2 não apresentaram nenhuma variante. Outras mutações encontradas foram: IDH1, RET, ERBB2, PDGFRA, EGFR, HRAS e KRAS. Concluímos que a melhor compreensão dessas vias poderá fornecer informações para o manejo clínico desses indivíduos e esclarecer a interação entre fatores ambientais e genéticos na patogênese do melanoma em pacientes jovens.

Palavras-chave: Melanoma. Crianças. Adultos jovens. Epidemiologia. Histologia. Imunoistoquímica. Genes CDKN2A. Proteínas proto-oncogenes BRAF. Gene NRAS. Sequenciamento de DNA.

ABSTRACT

Sanchez PCF. Melanoma in children, adolescents, and young adults: epidemiology, clinicopathological correlation, and genetic study [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Cutaneous melanoma is a multifactorial disease in which genetic, immunological, and environmental factors are involved. It usually affects people over 50 years of age and is uncommon in children, adolescents, and young adults. Melanoma in prepubertal children is very rare and has low mortality. Adolescents and young adults (15 to 39 years old) present peculiarities in their patterns of distribution and genetic influence. In this complex scenario, two molecular cascades are important in the pathogenesis of cutaneous melanomas: the CDKN2A pathway, which governs the cell cycle, and the MAP kinase pathway, which is involved in cell growth and survival. Recent publications show that in young patients, the CDKN2A pathway may be more affected. This study aimed to evaluate the incidence of melanoma in the 0- to 14-year-old and 15- to 39-year-old groups, and to find any correlations in the clinical, epidemiological, and histopathological data. The components of the CDKN2A and MAP kinase (NRAS and BRAF) pathways were also analyzed by immunohistochemistry and genetic analysis using a next-generation sequencing method (NGS). Melanomas were most often in the trunk of individuals aged 15 to 39 years and were related to acute and intermittent sun exposure, as previously found. The most prevalent histological type was superficial extensive with Breslow less than 1 mm. There was no correlation between loss of p16 expression on immunohistochemistry and Breslow thickness, contrary to what usually occurs in the other age groups. Therefore, it is important to evaluate the loss of p16 expression in melanomas in adolescents and young adults and/or with a family history to direct these patients to CDKN2A genotyping. Regarding NGS, of the 14 tested, 8 had BRAF mutations, 2 did not have any variant. Other mutations found were: IDH1, RET, ERBB2, PDGFRA, EGFR, HRAS and KRAS. We conclude that better understanding of these pathways may guide the clinical management of these individuals and clarify the interaction between environmental and genetic factors in the pathogenesis of melanoma in young patients.

Keywords: Melanoma. Child. Young adults. Epidemiology. Histology. Immunohistochemistry. CDKN2A genes. Proto-oncogene proteins BRAF. NRAS gene. DNA sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Via do CDKN2A	25
Figura 2 -	A - via MAPK em situação normal. B - via MAPK quando há mutação em BRAF.....	27
Figura 3 -	Desenho do estudo	38
Figura 4 -	Exemplos clínicos de melanomas incluídos no estudo	51
Figura 5 -	Imagens histológicas de pacientes do estudo	55
Figura 6 -	Aspectos imunoistoquímicos do p16 em melanomas de pacientes jovens.	57
Figura 7 -	Imunoexpressão do BRAF mutado em melanomas de pacientes jovens.....	58
Figura 8 -	Imunoexpressão de NRAS em melanomas de pacientes jovens.	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Frequências Topografia - pacientes 0 a 14 anos.....	46
Gráfico 2 -	Frequências Sexo - pacientes 0 a 14 anos	46
Gráfico 3 -	Frequências Topografia - pacientes 15 a 39 anos.....	47
Gráfico 4 -	Frequências Sexo - pacientes 15 a 39 anos	48
Gráfico 5 -	Frequências Morfologia - pacientes 0 a 14 anos.....	52
Gráfico 6 -	Frequências Categorias Breslow - pacientes 0 a 14 anos.....	52
Gráfico 7 -	Frequências Morfologia - pacientes 15 a 39 anos.....	53
Gráfico 8 -	Frequências Categorias Breslow - pacientes 15 a 39 anos.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação clínica do melanoma	32
Tabela 2 -	Parâmetros para ampliação de margens cirúrgicas.....	36
Tabela 3 -	Protocolo de imunohistoquímica dos anticorpos primários para os marcadores avaliados.....	41
Tabela 4 -	Dados epidemiológicos	49
Tabela 5 -	Dados epidemiológicos	50
Tabela 6 -	Dados histológicos	54
Tabela 7 -	Dados de imunoistoquímica	56
Tabela 8 -	Mutações NGS únicas	60
Tabela 9 -	Mutações NGS concomitantes	60
Tabela 10 -	Tabela das correlações Epidemiologia e Histopatologia – 0 a 14 anos.....	61
Tabela 11 -	Tabela das correlações Epidemiologia e Histopatologia – 15 a 39 anos.....	62
Tabela 12 -	Tabela das correlações Epidemiologia, Histopatologia e Imunoistoquímica – 15 a 39 anos.....	63
Tabela 13 -	Tabela das correlações Epidemiologia, Histopatologia, Imunoistoquímica e NGS - Adulto.....	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Características do melanoma em adolescentes e adultos jovens comparadas à população em geral.....	34
-------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

et al

e outros

in situ

in loco, que continua no seu lugar de origem sem afetar os demais tecidos ou órgãos

LISTA DE SIGLAS

Ab189302	anticorpo anti CDKN2A/p16INK4a usado na imunoistoquímica
Ab198820	anticorpo anti NRAS-C- terminal usado na imunoistoquímica
AP Enzime ENHANCER	<i>Alkaline Phosphatase Enhancer</i>
ATL	tampão de lise de tecido
BRAF	gene humano que codifica a proteína B-Raf
BRAFV600E	gene humano que produz a proteína B-Raf V600E
CDK	quinase dependente de ciclina
CDK4	quinase 4 dependente de ciclina
CDK6	quinase 6 dependente de ciclina
CDKN2A	inibidor de quinase dependente de ciclina 2A
CIPE	Centro Internacional de Pesquisa e Ensino do AC Camargo
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleotídeo Trifosfatado
EF2	fator de transcrição EF2 envolvido na oncogênese
EGFR	gene do receptor do fator de crescimento epidérmico
EP152Y	anticorpo que se liga à proteína BRAF (usado na imunoistoquímica)
ERBB2	gene do receptor de tirosino quinase HER2
ERK1/2	quinase regulada por sinal extracelular 1/2
H/E	Hematoxilina-Eosina
HMB45	anticorpo monoclonal que reage contra antígeno presente em tumores melanocíticos (<i>Human Melanoma Black</i>)
HRAS	gene humano que codifica a proteína HRAS
IDH1	gene isocitrato-desidrogenase
IH	imuno histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KIT	gene que codifica a proteína receptora de tirosino quinase
KRAS	gene humano que codifica a proteína KRAS
MAPK/ MAPKinase/ MEK	proteína quinase ativada por mitógenos
MC	melanoma cutâneo

MELTUMP	tumores melanocíticos de potencial maligno incerto
NANODROP 1000	Espectrofotômetro Thermo Scientific
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NRAS (Q61R)	gene humano que codifica a proteína NRAS (Q61R)
p14/ p14ARF	proteína codificada na via do CDKN2A
p16/ p16INK4a	proteína codificada na via do CDKN2A
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PDGFRA	gene que codifica o receptor A do fator de crescimento derivado de plaquetas
pRb	proteína do retinoblastoma
RAS	proto-oncogene que codifica a proteína RAS
RET	(reorganizado durante a transfecção) proto-oncogene que codifica um receptor da família de tirosino quinases
RNA Carrier	Substância que separa o RNA do DNA
SEER	Sistema eletrônico de editoração de revistas
TKI	Tirosino quinase
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TRIS EDTA	(<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>) solução tampão quelante
UV	radiação ultravioleta
VE1	anticorpo que se liga à proteína BRAFV600 (usado na imunohistoquímica)

LISTA DE SÍMBOLOS

ml	mililitros
rpm	rotação por minuto
°C	graus Celsius
kJ/m^2	kilojoule por metro quadrado
ng	nanograma
pmol	picomol
mM	milimolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 História do melanoma	20
1.2 Embriogênese e Morfogênese	21
1.3 Epidemiologia	21
1.4 Fatores de risco	23
1.5 Patogênese	24
1.5.1 Estudo do CDKN2A	28
1.5.2 Estudo do BRAF	30
1.5.3 Estudo do NRAS	30
1.6 Apresentação clínica e histopatologia	31
1.7 Diagnóstico e prognóstico	34
1.8 Tratamento	35
2 OBJETIVOS E RELEVÂNCIA	37
3 METODOLOGIA	38
3.1 Distribuição dos casos	38
3.2 A avaliação de dados clínicos	39
3.3 A avaliação histopatológica	39
3.4 Confeção do Tissue Microarray (TMA)	40
3.5 Técnica de Imunoistoquímica	40
3.6 Extração do DNA	41
3.7 Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	43

3.8 <i>Next-Generation Sequencing</i> (NGS)	43
4 RESULTADOS	45
4.1 Dados epidemiológicos	45
4.2 Dados Histológicos	51
4.3 Dados de imunoistoquímica	56
4.4 Dados de <i>Next Generation Sequencing</i>	59
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
5.1 Grupo 0 a 14 anos	61
5.2 Grupo 15 a 39 anos	62
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71



1 INTRODUÇÃO

1.1 História do melanoma

A primeira publicação acerca de um caso de melanoma foi de John Hunter (cirurgião do St George's Hospital Medical School de Londres), em 1787. O espécime mantido no “*Hunterian Museum of the Royal College of Surgeons*”, sob o número original de 219, refere-se a doença de um homem de 35 anos com uma massa recidivante no ângulo da mandíbula. Hunter descreveu a massa como uma “excrecência fúngica cancerosa”. Apenas em 1968 o exame microscópico desse espécime revelou tratar-se de um melanoma.¹

Entretanto, a primeira descrição do melanoma é reputada a René Laennec. Sua descrição foi apresentada em forma de aula na *Faculte de Medicine de Paris* em 1804 e publicada em 1806.^{2,3} Logo após, em 1820, William Norris publicou o primeiro caso de melanoma na literatura de língua inglesa. Em 1857, Norris publicou uma coletânea de casos, sob o nome de “*melanose*”, e concluiu que a doença ocorreria em pessoas com lesões em outras partes do corpo. Ele ainda relatou, nesse artigo, o comportamento metastático do tumor, geralmente confirmado em necropsias e a possível tendência da predisposição hereditária da doença.⁴

Ainda no século XIX, outros médicos tiveram importantes contribuições no estudo dos melanomas. Jean Cruveilier é autor das descrições originais de melanoma nas mãos, pés, vulva e metástases na mama e intestino, no livro *Anatomic Pathologique Du Corps Human*, entre 1829 e 1842. Isaiah Parrish, em 1837, descreveu o primeiro caso de melanoma nos Estados Unidos e Sir James Paget, em 1853, escreveu uma de suas melhores peças no livro “*Lectures on Surgical Pathology*”, a respeito de melanoma amelanótico. Ao final do século XIX, Sir Jonathan Huchinson, em 1892 e 1894, descreveu casos de melanoma subungueal. No século XX, as pesquisas em melanomas floresceram, impulsionadas por avanços tecnológicos e hoje, oferecem subsídios para o desenvolvimento de terapêuticas que futuramente poderão ter impacto favorável na história natural da doença.



1.2 Embriogênese e Morfogênese

A descoberta da relação das células derivadas da crista neural e os melanócitos foi fundamental para a evolução dos conhecimentos na área da pigmentação da pele e suas doenças. Em aves e mamíferos, é sabido que as células da via dorso-lateral da crista neural se diferenciam, exclusivamente, em células pigmentares.

Em humanos, a migração das células da crista neural pela via lateral trazem os melanócitos para a derme e para outros órgãos como úvea, íris, retina, leptomeninge e ouvido interno. A partir da derme, os melanoblastos migram em direção à camada basal da epiderme.^{5,6} Esses melanócitos precoces podem ser identificados por meio de anticorpos monoclonais contra epítomos da proteína HMB-45 (por meio da imunistoquímica), antígeno comum a essas células e a melanócitos que compõem os melanomas.⁷

O melanoma cutâneo (MC) é uma neoplasia maligna originada desses melanócitos que passam a apresentar atipia morfológica e perda da inibição por contato (uma característica importante dos melanócitos normais) – distribuindo-se em ninhos, grupos e lençóis celulares. Essas células também apresentam marcante pleomorfismo com núcleos grandes, irregulares, hipercromáticos e por vezes múltiplos, nucléolos proeminentes e atividade mitótica intensa.⁸ Essas características das células neoplásicas permitem o seu diagnóstico morfológico.

O melanoma pode surgir “de novo” ou a partir de nevos pré-existentes, apresenta duas fases de crescimento, radial e vertical, e é capaz de metastatizar para linfonodos e órgãos internos.⁹

1.3 Epidemiologia

O melanoma é a sexta neoplasia mais diagnosticada nos EUA^{7,8} e sua incidência nos países desenvolvidos tem aumentado mais rapidamente do que qualquer outra neoplasia desde os anos 50.^{12,13,14} Um estudo de 2000 a 2013 publicado no Brasil mostrou aumento da incidência de melanoma de 2,52 para 4,85 em homens e 1,33 para 3,22 em mulheres por 100 mil habitantes.¹⁵ Este aumento de incidência pode ser atribuído a um melhor rastreamento de casos e ao maior conhecimento do público sobre a doença, entretanto também pode estar relacionado a uma



mudança no comportamento da população em relação à exposição solar. Segundo dados mais recentes do INCA (Instituto Nacional do Câncer) de 2020, a taxa de incidência em 100 mil habitantes é de 4,03 e 3,94 para homens e mulheres respectivamente.¹⁶

O melanoma acomete indivíduos em torno dos 50 anos, quase uma década antes da maioria dos tumores sólidos.¹⁴ No entanto, o melanoma maligno em crianças, adolescentes e adultos jovens é incomum, especialmente antes da puberdade.¹⁵

O conceito etário para a incidência de melanomas em pacientes jovens é bastante controverso. Na literatura, o corte de idade para os melanomas infantis varia entre 10 e 21 anos.¹⁶ Eles correspondem a 1 - 4 % de todos os melanomas e a 1 - 3 % das neoplasias na faixa etária pediátrica. A incidência anual é de 0,7 casos por milhão em idades entre 0 a 9 anos.¹⁷ Tal como ocorre em adultos tem sido relatado um aumento nos casos de melanomas infantis em uma proporção de 2 a 5% ao ano.^{14,18}

O grupo de adolescentes e adultos jovens é definido pelo *National Cancer Institute* por indivíduos entre as idades de 15 a 39 anos.¹⁹ O melanoma é o terceiro câncer mais diagnosticado nesta população, perdendo apenas para linfoma e câncer de mama.²⁰ Na população de 0 a 39 anos, o MC é o segundo tipo de câncer mais comum em ambos os sexos.²¹

Existem diferentes trabalhos que consideram outros grupos etários como “jovens”. Ao avaliar a faixa etária de 15 a 29 anos, Bleyer et al⁶ observaram que 11% de todas as neoplasias nos EUA de 1975 a 2000 corresponderam ao melanoma, sendo este o segundo tipo de câncer mais comum nesta faixa etária.

Nas idades entre 15 a 39 anos, a incidência de melanoma é maior em mulheres em todos os grupos étnicos. Em contrapartida, quando analisados os indivíduos com idade acima de 40 anos, a proporção se inverte.^{6,20,22} Entre os caucasianos, a incidência deste tumor é maior, porém nos demais grupos étnicos o melanoma metastático é mais frequente e de pior prognóstico.²²

O Instituto Nacional do Câncer, nos EUA, confirmou a tendência descrita acima em estudo realizado no período entre 1975 a 2009. Observou-se um aumento da incidência de melanoma com o avançar da idade e o predomínio no sexo feminino até a idade de 40 - 45 anos, quando a relação homens-mulheres começa a se inverter. Observa-se também a predominância deste tipo



de tumor nos caucasianos.²³

1.4 Fatores de risco

Os fatores de risco para o melanoma infantil são: nevo melanocítico congênito gigante, síndrome do nevo displásico, xeroderma pigmentoso, imunodeficiência ou história familiar de melanoma.¹⁷ O MC infantil, como nas outras idades, tem uma maior frequência em indivíduos de fototipo baixo.

Já em adolescentes e adultos jovens, além desses fatores já descritos, observa-se também um importante fator de risco modificável: a exposição à radiação ultravioleta (UV) tanto de origem solar quanto artificial, e mais especificamente a exposição intensa e intermitente.^{27,28} Jhappan et al demonstraram em cobaias transgênicas que a exposição à lâmpada solar de 2,3 a 6,0 kJ/m² três vezes na semana não foi capaz de induzir melanoma, enquanto a exposição única à dose eritematosa de 9,6 kJ/m² em murinos filhotes induziu o desenvolvimento da neoplasia.²⁸ Outro estudo de 2004 evidenciou aumento do risco de melanoma em pessoas de fototipo baixo que apresentaram quando jovens, 10 ou mais queimaduras solares em câmaras de bronzeamento artificial.²⁷

Sendo assim, a queimadura solar tem sido usada como indicador de exposição UV intermitente, sendo esta a forma de exposição mais fortemente relacionada ao risco de melanoma e a características histopatológicas, como a espessura do tumor.²³

Outros fatores de risco conhecidos são história pessoal de melanoma, pele clara, muitas efélides, fototipos I e II (indivíduos com tendência a se queimar e incapacidade de se bronzear), e indivíduos com muitos nevos melanocíticos adquiridos.^{23,29}

Apesar da conhecida relação do MC com exposição solar, trata-se de uma doença multifatorial, em que fatores genéticos, imunológicos e ambientais estão envolvidos e interagem entre si.³⁰

Grande parte do conhecimento da susceptibilidade dos indivíduos ao melanoma advém da pesquisa genética. Assim, diversos estudos têm sido realizados a fim de identificar as vias



genéticas que desempenham um papel no melanoma tanto familiar quanto esporádico.³¹ Bleyer et al observaram que a interação entre fatores ambientais, como exposição solar, e genéticos podem contribuir para a gênese do melanoma. Neste cenário, são descritas mutações somáticas como NRAS e BRAF e mutações de linha germinativa, como CDKN2A.

1.5 Patogênese

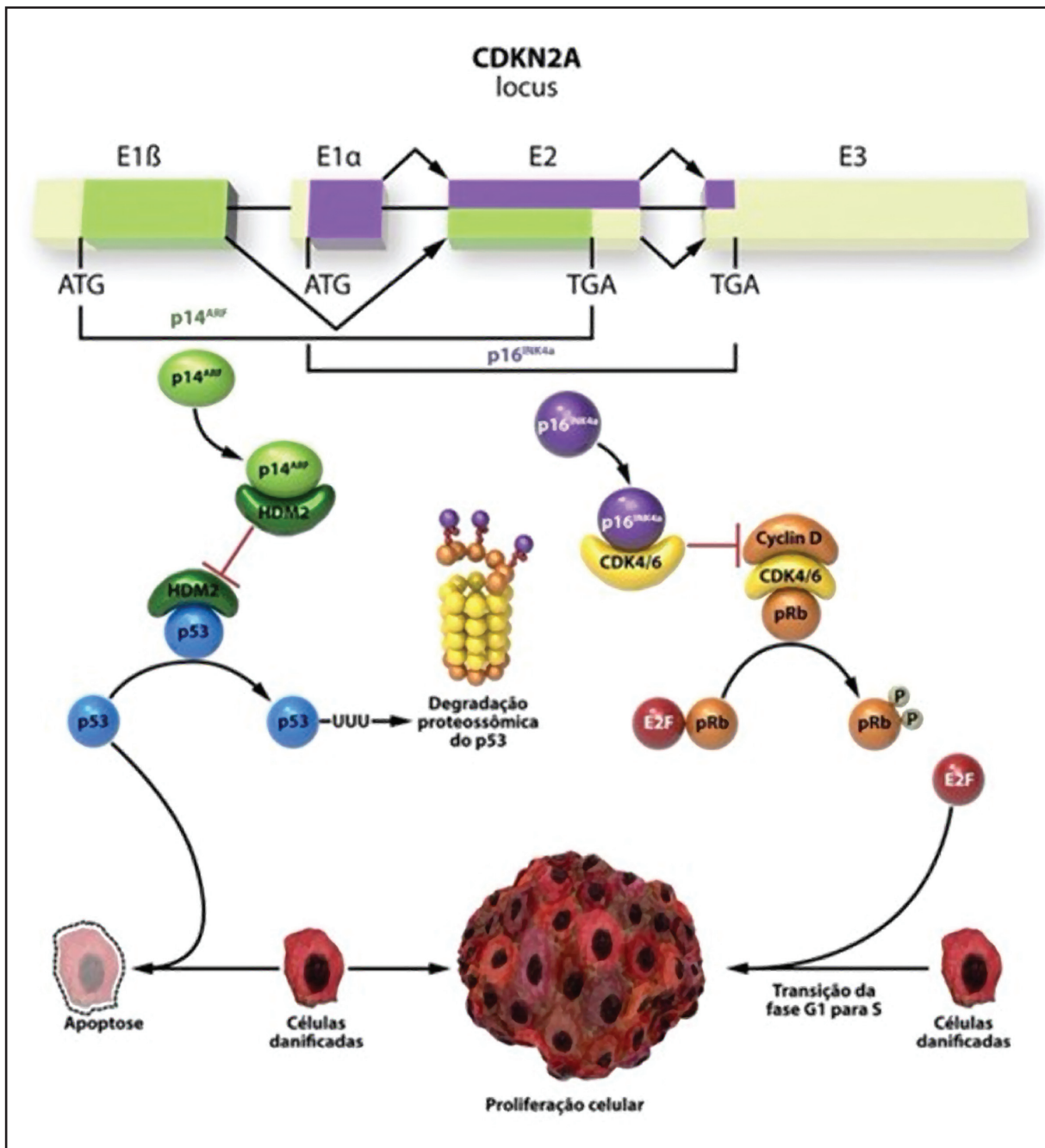
No cenário complexo e multifatorial da patogênese do MC, acredita-se que duas cascatas moleculares sejam importantes - a via CDKN2A, importante na regulação do ciclo celular, e a via MAP kinase, que está implicada na proliferação e na sobrevivência celular.

O ciclo celular é impulsionado por uma série de proteínas-kinases: a ciclina é a unidade reguladora e a CDK é seu parceiro catalítico. Os complexos ciclina / CDK fosforilam substratos protéicos específicos para avançar o ciclo celular durante o qual ocorre a síntese de DNA. A síntese da ciclina-CDK e a subsequente proteólise garantem transições bem definidas entre os estágios do ciclo celular.

A via da p16-ciclina D / CDK-pRb-E2F é uma das ciclinas implicadas na regulação do ciclo celular. De acordo com Bartkova et al, em tumores, pelo menos um dos reguladores do ciclo celular que participa dessa via está desregulado, consistente com o conceito emergente de interação da ciclina D-CDK-p16-pRb como alvo na oncogênese. O CDKN2A está localizado no cromossomo 9p21 e consiste em 4 éxons que codificam 2 proteínas: p16INK4 e p14ARF. Ambos funcionam como supressores de tumores.^{32,33}

O P16INK4, em situações normais, liga-se ao CDK4 e CDK6 (ciclina dependente de 4/6 quinases), mantendo o pRb (proteína do retinoblastoma) em um estado ativo de hipofosforilação. Na ausência de p16INK4a, CDK4 e CDK6 se ligam à ciclina D e fosforilam pRb. O pRb fosforilado libera o fator de transcrição EF2, que promove a transição da fase G1 para S no ciclo celular e conseqüente divisão e multiplicação celular (Figura 1).^{32,33}

Figura 1 - Via do CDKN2A



O P16INK4, em situações normais, liga-se ao CDK4 e CDK6 (ciclina dependente de 4/6 quinases), mantendo o pRb (proteína do retinoblastoma) em um estado ativo de hipofosforilação. Na ausência de p16INK4a, CDK4 e CDK6 se ligam à ciclina D e fosforilam pRb. O pRb fosforilado libera o fator de transcrição E2F, que promove a transição da fase G1 para S no ciclo celular e consequente divisão e multiplicação celular.

FONTE: A autora

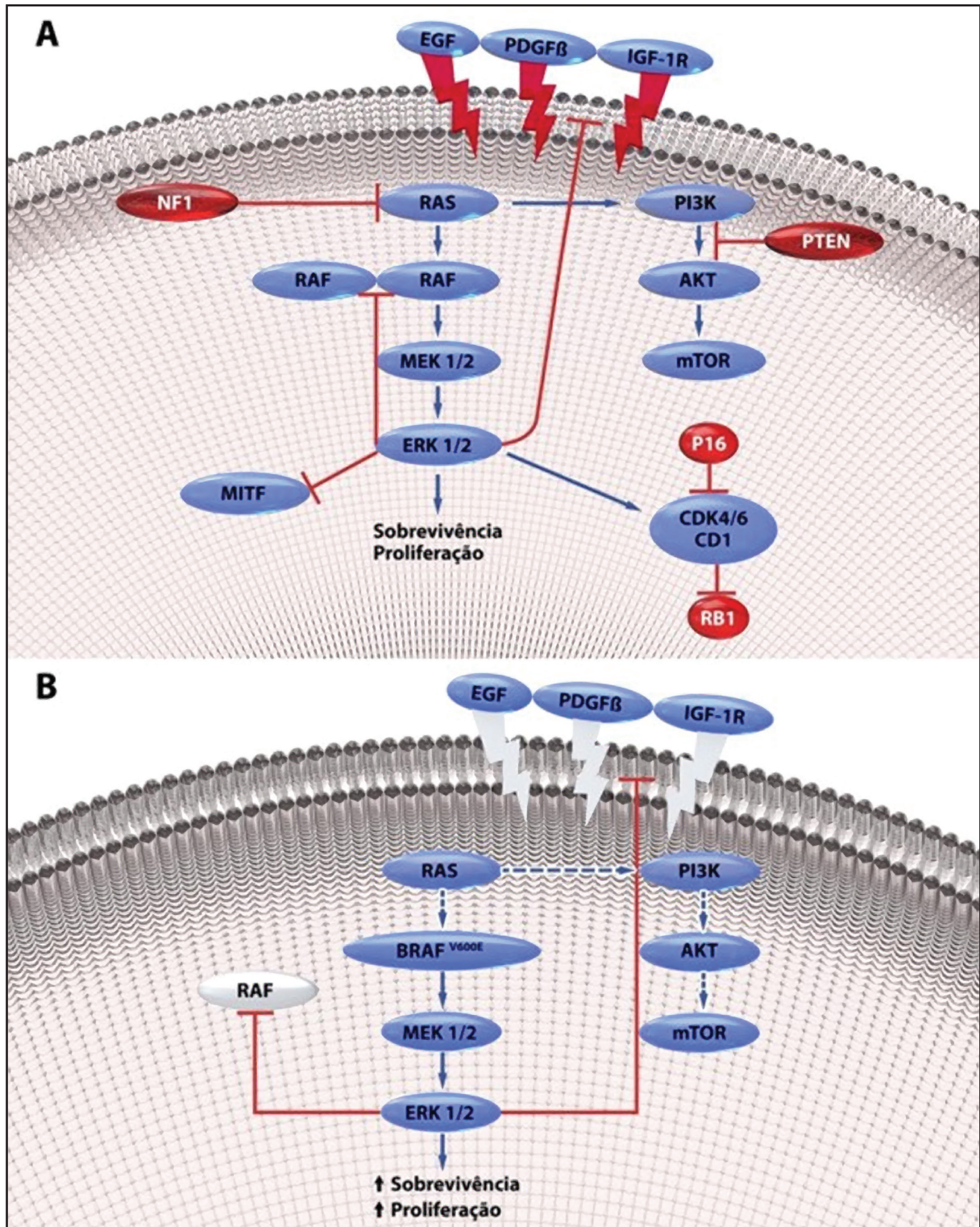
A via da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) (incluindo a cascata das proteínas RAS, BRAF, MEK 1/2 e ERK 1/2) é uma importante cascata de sinalização que controla o crescimento, a proliferação e a migração celular e governa o desenvolvimento e a progressão do melanoma. O aumento da atividade das proteínas ERK 1/2, que são constitutivamente ativas nos melanomas, implica no rápido crescimento das células do melanoma, na melhora da



sobrevivência das células e na resistência à apoptose.

A ativação da via MAPK é uma etapa fundamental em vários processos intracelulares que requerem uma fosforilação sequencial dos diferentes componentes da via. Nas células normais, quando há ativação da via MAPK ocorre o crescimento e diferenciação celular. Para evitar a ativação persistente da via MAPK, ocorre *feedback* negativo fisiológico a montante (Figura 2A). Nas células que abrigam mutações BRAFV600, o processo que leva à ativação da via MAPK é diferente. Nessas células, a ativação do BRAFV600 não requer ativação do RAS (Figura 2B). Os monômeros BRAFV600 estão continuamente ativos levando ao crescimento e proliferação celular.³⁴

Figura 2 - A - via MAPK em situação normal. B - via MAPK quando há mutação em BRAF.



Nas células normais, quando há ativação da via MAPK ocorre o crescimento e diferenciação celular. Para evitar a ativação persistente da via MAPK, ocorre *feedback* negativo fisiológico a montante (A). Nas células que abrigam mutações BRAFV600, o processo que leva à ativação da via MAPK é diferente. Nessas células, a ativação do BRAFV600 não requer ativação do RAS (B). Os monômeros BRAFV600 estão continuamente ativos levando ao crescimento e proliferação celular.

FONTE: A autora



Há evidências crescentes de que a ativação da via MAPK está associada ao desenvolvimento de melanoma. Cerca de 36 % dos melanomas primários têm mutações no homólogo do vírus RAS do neuroblastoma (NRAS). Mutações no BRAF são observadas em até 80% dos melanomas.³⁵ Por outro lado, a mutação no gene CDKN2A é mais frequente em pacientes com histórico familiar de melanoma. Pode ser encontrada em 20 a 40% dos casos em que existem mais de 2 parentes com MC. Essa incidência é menor em famílias com apenas 2 casos.^{36,37} Outro estudo de 2004, realizado com 51 indivíduos com idade abaixo de 20 anos, demonstra mutação de CDKN2A em apenas 1 paciente.³⁸

A detecção da mutação nesses genes pode ser estudada por meio da imunohistoquímica, que evidencia a expressão proteica, ou por meio de métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR) que avalia a alteração na sequência genética. Mais recentemente, o *Next Generation Sequencing* (NGS) passou a ser utilizado para a detecção de alterações genéticas. A sua vantagem é que, enquanto o PCR e a imunohistoquímica são frequentemente usados para detectar alterações específicas relacionadas a um único gene, o *Next Generation Sequencing* (NGS) é capaz de determinar informações mais amplas, sobre vários genes ao mesmo tempo, com vantagens potenciais em tempo de resposta. Sua desvantagem é a necessidade de mais material para estudo, que nem sempre está disponível e do alto custo das análises.

1.5.1 Estudo do CDKN2A

As mutações no CDKN2A em geral são autossômicas dominantes germinativas e herdadas.³⁹ A mutação germinativa em um alelo torna mais fácil e rápida a perda de heterozigose e consequente progressão da neoplasia.⁴⁰ As mutações somáticas existem, mas são incomuns no MC.⁴¹

A mutação germinativa de CDKN2A é sabidamente associada ao melanoma familiar. Na Itália, por exemplo, 7-40% dos casos de melanoma com histórico familiar carregam a mutação neste gene, enquanto a ocorrência em melanomas esporádicos é de 1-2%.¹⁷

Daniotti et al. analisaram a mutação no gene CDKN2A em melanomas na faixa etária infantil (2 a 19 anos) e detectaram a mutação em 2 dos 21 pacientes analisados, sendo que um



deles tinha histórico familiar de melanoma. Apesar de parecer baixa, essa proporção de mutações no CDKN2A é maior do que a relatada em melanomas esporádicos de adultos.¹⁷ Outros estudos também relataram que pacientes com melanoma e mutação CDKN2A desenvolvem melanoma cerca de 10 anos mais cedo do que os que não apresentam a mutação.^{37,41,42}

Soma-se a isso, o fato de indivíduos com mutação em CDKN2A em geral apresentarem maior frequência de nevos displásicos,^{37,41,42}; também há evidência de que indivíduos com múltiplos melanomas primários (mais de uma lesão) apresentam maior incidência dessa mutação.³⁶

A mutação em CDKN2A é revelada pela perda da expressão da proteína p16 em estudos com a técnica imunoistoquímica. Na literatura, existem diferentes interpretações em relação à imunoistoquímica, considerando a amostra positiva quando há marcação no núcleo, citoplasma ou em ambos. Em geral, a perda de expressão nuclear ocorre primeiro, deixando um resíduo citoplasmático.⁴³

Apesar dessas evidências bem documentadas, a perda de p16 vista por imunoistoquímica não necessariamente indica mutação, uma vez que ela pode ocorrer em lesões mais espessas ao longo da evolução do tumor. Nessas lesões avançadas, pode ocorrer perda da expressão do p16 por diminuição de sua expressão protéica, metilação/inativação^{40,44} ou ainda a proteína pode ser expressa, mas estar disfuncional. Por outro lado, a perda de p16 em jovens está mais relacionada à mutação no gene já que essa é vista em fases mais iniciais e tumores mais finos.⁴¹

A presença da mutação em CDKN2A também pode aumentar a susceptibilidade para as outras mutações. Dessa maneira, esses pacientes aparentam ter melanomas mais precocemente também por esta razão.⁴⁴

Sendo assim, sugere-se que a perda da expressão de p16 detectada por imunoistoquímica possa estar relacionada a casos familiares de melanoma, acometimento mais precoce, melanomas múltiplos e melanomas espessos e invasivos.⁴⁵



1.5.2 Estudo do BRAF

As mutações em BRAF são somáticas e em geral relacionadas a indução pela radiação ultravioleta. Alguns estudos sugerem que pacientes jovens com melanoma podem ser mais sensíveis à radiação UV do que a população em geral e essa suscetibilidade pode ser geneticamente determinada.⁴⁶ O entendimento da sucessão de alterações genéticas que levam ao melanoma é incompleto. A mutação em BRAF pode ocorrer em nevos benignos, indicando que ela provavelmente ocorre precocemente no processo de progressão da lesão.⁴⁷ Por outro lado, há estudo que mostra a mutação ausente na lesão primária e presente na metástase, o que pode contestar essa teoria.⁴⁸

Mutações no gene BRAF estão localizadas no cromossomo 7q e trata-se da mutação mais frequente encontrada em melanomas. Oitenta por cento dessas mutações são encontradas no exon 15, num aminoácido único, usualmente relacionada à substituição de valina por ácido glutâmico (BRAFFV600E). Pacientes em torno dos 50 anos de idade ou menos têm mais mutações no BRAF, especialmente a BRAFFV600E. Enquanto isso, pacientes mais velhos apresentam taxas mais baixas de mutações no BRAF no geral, mas taxa maior em mutações de BRAFFV600K.⁴⁶

A detecção da mutação em BRAF pode ser feita por análise molecular, como PCR e NGS, e por análise da expressão proteica através da imunohistoquímica. Estudos comparativos mostram que a correlação entre esses dois métodos é confiável, apesar de discrepâncias poderem ocorrer até mesmo quando analisamos áreas diferentes da lesão com o mesmo método. Dessa forma, a combinação de métodos de detecção é preconizada.⁴⁹

1.5.3 Estudo do NRAS

No melanoma, as mutações do NRAS foram identificadas em 15 a 30% das amostras de tumor e acredita-se ser um importante fator de oncogênese nesses pacientes, embora o valor terapêutico do direcionamento para o NRAS ainda não tenha sido completamente elucidado. A mutação em NRAS desativa a capacidade de hidrolização do trifosfato de guanosina em difosfato de guanosina, deixando o NRAS mutado predominantemente ligado ao trifosfato de



guanosina o que leva a uma ativação constante da via.⁵⁰

A frequência de mutações em NRAS é semelhante em amostras primárias e metastáticas e elas afetam mais frequentemente o códon 61.⁵¹ No entanto, a correlação entre as alterações de NRAS e a progressão da melanogênese no melanoma é controversa na literatura. Alguns autores sugerem que as mutações NRAS são encontradas em nevos benignos (que aparecem mais associados a nevos melanocíticos congênitos), mas raramente são encontradas em nevos displásicos e em uma quantidade substancial de melanomas, incluindo aqueles relacionados à exposição solar.³⁵ Em contrapartida, Shain et al sugerem que a mutação em NRAS é mais frequente em lesões intermediárias, ou seja, que apresentam algum grau de atipia, por exemplo os nevos displásicos.⁴⁷

Estudos mostram que provavelmente as mutações NRAS e BRAF são eventos mutuamente exclusivos. Mesmo a maior série de estudos sobre melanomas (n = 513) não detectou mutações concomitantes de BRAF e NRAS.³⁵ Existem evidências mostrando que mutações germinativas em CDKN2A podem predispor a mutação em NRAS induzida por radiação UV.⁵²

Em relação aos métodos diagnósticos da mutação em NRAS, os resultados sugerem que o anticorpo NRAS (Q61R) é altamente sensível e específico para a presença da mutação NRASQ61R. Sendo assim, a imunohistoquímica é um método fidedigno para esse fim.⁵³

1.6 Apresentação clínica e histopatologia

O melanoma cutâneo invasivo é classificado em quatro subtipos clínicos e histológicos, baseados no padrão de crescimento ou na localização anatômica: melanoma extensivo superficial, nodular, lentigo maligno e lentiginoso acral. Suas características podem ser observadas na Tabela 1. No melanoma *in situ* as células neoplásicas localizam-se na epiderme e no epitélio anexial, não ultrapassando a camada basal.



Tabela 1 - Classificação clínica do melanoma

Subtipo	Frequência	Localização comum	Achados adicionais
Melanoma extensivo superficial	50-75%	Tronco, membros	75% ocorrem “de novo” Crescimento radial
Melanoma nodular	15-35%	Tronco, membros	Crescimento rápido, pode ser nodular, polipoide ou pedunculado
Melanoma lentiginoso acral	5-10%	Palmas, plantas, unhas	Não relacionado à exposição solar Afeta todas as raças Responsável por 30-70% dos melanomas em pessoas de pele negra
Lentigo maligno melanoma	5-15%	Cabeça e pescoço de idosos	Associado à exposição solar crônica

FONTE: A autora

Existem diferenças de apresentação clínica e histopatológica do melanoma entre o grupo de crianças e o grupo de adolescentes/adultos jovens. Estudo recente do final de 2012 compara 2 grupos com diagnóstico de melanoma, sendo o primeiro deles (A) com idade entre 0 a 10 anos e o segundo (B) entre 11 e 19 anos. No grupo A, 77 % dos melanomas foram amelanóticos, nodulares e espessos contra 23% no grupo B. Sendo assim, o estudo sugere que a regra do ABCD (Assimetria, Bordas irregulares, Variabilidade de cores e Diâmetro > 6,0mm), tão bem aceita para diagnóstico de melanomas em adultos, parece não funcionar nas crianças, principalmente no período pré-puberal. A medida que a idade aumenta, os subtipos encontrados em adultos tornam-se mais frequentes.⁵⁴

Na série de 33 indivíduos com idades entre 3 e 14 anos estudados por Ferrari et al em 2005⁵⁴ a maioria das lesões primárias eram espessas e atípicas (amelanóticas ou verrucosas, simulando granuloma piogênico). Lambie et al. em 2011 relatou dois casos de melanoma infantil, um “de novo” e outro associado a nevo melanocítico congênito gigante. Ambas lesões eram espessas e apresentaram acometimento linfonodal.²⁰



Apesar desses estudos recentes e de não se conhecer ao certo a etiologia, história natural e prognóstico⁵⁵ dos melanomas infantis, seus critérios de classificação, estadiamento e abordagem terapêutica ainda são os mesmos utilizados em adultos. Evidências sugerem um curso favorável deste tumor em crianças, mesmo com alta incidência de comprometimento linfodonal.⁵⁶

Na faixa etária de 0 a 15 anos, as extremidades seguidas pelo tronco são os locais de maior acometimento, e os tumores presentes na cabeça, pescoço e tronco relacionam-se com pior prognóstico.⁵⁶

Já em adolescentes e adultos jovens (15 a 39 anos) a relação entre tipo histológico, localização e raça, não mostra diferença entre as idades, visto que o tipo histológico mais comum é o extensivo superficial e nodular, e os melanomas acrais são mais comuns em indivíduos pretos.²³

O padrão de distribuição de melanoma em adolescentes e adultos jovens difere dos adultos mais velhos e crianças já que em ambos os sexos os melanomas no tronco são mais frequentes. Isso sugere a importância da exposição solar intermitente, pois no tronco a exposição solar é mais curta, porém mais intensa.^{9,23}

Olsen et al⁵⁷ observaram que indivíduos com muitos nevos no dorso desenvolvem melanoma nestas áreas, e que indivíduos sem tendência a ter nevos desenvolvem melanoma em áreas habitualmente fotoexpostas. Chang et al⁵⁸ mostraram que a exposição UV intermitente e queimaduras solares são fortes preditores de melanoma em áreas protegidas, como o tronco, e que a exposição solar crônica está mais relacionada a melanoma na cabeça e pescoço.

O Quadro 1 compara os dois grupos citados acima com a população geral.



Quadro 1 - Características do melanoma em adolescentes e adultos jovens comparadas à população em geral

	Geral	Infância	Adultos jovens
Faixa etária	todas	0 a 14 anos	15 a 39 anos
Relação homens x mulheres	homens > mulheres	homens > mulheres	mulheres > homens
Cor de pele	brancos	brancos	brancos
Principais fatores de risco	-exposição UV -múltiplos nevos melanocíticos adquiridos -história pessoal de MC -história familiar de MC	-história familiar de MC -síndrome do nevo displásico -nevo congênito gigante -imunodeficiências	-exposição UV -história pessoal de MC -história familiar de MC -síndrome do nevo displásico -múltiplos nevos melanocíticos adquiridos -nevo congênito gigante
Localização	extremidades, em mulheres / tronco em homens	extremidades	tronco
Tipos histológicos	extensivo superficial, nodular	nodular, amelanótico	extensivo superficial nodular

FONTE: A autora

1.7 Diagnóstico e prognóstico

A baixa frequência, atipia clínica e histopatológica e as características do melanoma na criança, combinadas com relativa dificuldade de critérios histopatológicos disponíveis para discriminar entre lesões melanocíticas benignas e malignas, podem retardar diagnóstico e tratamento. Mais de 66% dos casos de morte tem sido atribuído ao diagnóstico tardio.⁵⁶

Bleyer et al⁹ observaram que indivíduos diagnosticados com melanoma nas idades entre 10 e 39 anos apresentam taxa de sobrevida em 5 anos acima de 90%. Apesar da maior incidência de melanoma em mulheres jovens, os homens têm maior taxa de mortalidade. Estudo realizado através da plataforma SEER de 1973 a 2004 mostrou que a incidência de melanoma em mulheres jovens aumentou neste período, enquanto entre os homens permaneceu estável. No entanto, houve declínio da mortalidade em ambos os gêneros.⁵⁹



O diagnóstico do melanoma é realizado por meio de biópsia excisional para análise do tipo histológico e estadiamento microscópico. Embora seja a neoplasia cutânea mais letal, se diagnosticada e tratada precocemente tem prognóstico favorável. Na ausência de metástases à distância conhecidas, o fator prognóstico mais importante é a presença de envolvimento do linfonodo regional.⁶⁰

Foram descritos dois sistemas de estadiamento microscópico: nível de Clark e índice de Breslow⁵ (Figura 1).

Os níveis de Clark classificam o melanoma de acordo com o envolvimento da epiderme, derme e subcutâneo.⁶¹ O estadiamento microscópico de Clark é menos preciso uma vez que a espessura da pele varia com os diferentes locais anatômicos do corpo. Já o índice de Breslow é a medida absoluta da espessura do tumor desde a camada granulosa (camada nucleada mais superficial da epiderme) até a célula tumoral contígua mais profunda da lesão.⁶² O estadiamento microscópico de Breslow é o maior fator prognóstico no melanoma não-metastático, pois há uma relação direta entre a espessura da lesão primária e a probabilidade de envolvimento linfonodal em pacientes com linfonodos clinicamente normais.

São também fatores prognósticos os achados histopatológicos de ulceração, índice mitótico maior ou igual a 1, infiltrado inflamatório, invasão vascular e sinais de regressão.⁶⁰

1.8 Tratamento

O tratamento do melanoma maligno primário é cirúrgico para todas as idades, com ampliação das margens⁵ de acordo com a Tabela 2.



Tabela 2 - Parâmetros para ampliação de margens cirúrgicas

Espessura do tumor	Margem recomendada
in situ	0,5 a 1 cm
≤ 1mm	1cm
1,01-2mm	1-2cm
2,01-4mm	2cm
> 4mm	2 cm

FONTE: A autora

A biópsia do linfonodo sentinela é um procedimento para a detecção de micrometástase nodal, indicada para os casos de MC que apresentam espessura maior ou igual a 1 mm. Em melanomas com Breslow entre 0,8 mm e 1 mm considera-se a também a presença de mitose ou ulceração. Consiste na injeção na pele de tecnécio^{99m} em colóide sulfúrico e corante azul patente para a identificação do primeiro linfonodo de drenagem do sítio do tumor primário. Este linfonodo é excisado para análise histopatológica por congelação e, se positivo para micrometástase, é realizada uma linfadenectomia regional.⁶³

Estudo de 2012 mostra maior prevalência de metástases linfonodais detectadas por linfonodo sentinela em crianças até 10 anos, quando comparadas a adolescentes e adultos jovens (11 a 24 anos), provavelmente devido à maior espessura nos primeiros.⁵⁹

Indivíduos com metástase linfonodal podem ser submetidos a linfadenectomia regional e/ou quimioterapia adjuvante.⁶⁴

O tratamento da doença metastática no estadió IV está em constante estudo, sendo que a terapia alvo e imunoterapia apresentam os resultados mais promissores.^{63,65}

A literatura vigente apresenta lacunas acerca do melanoma em jovens e por isso, nosso estudo objetiva verticalizar as investigações sobre esse tema, com foco em pacientes atendidos no HC-FMUSP, desde epidemiologia até estudo genético, passando pelo padrão histológico.



2 OBJETIVOS E RELEVÂNCIA

Dadas as lacunas de conhecimento acerca das características de melanomas em pacientes jovens, especialmente na população brasileira, nosso estudo visa responder às seguintes perguntas:

- 1- Mapear a incidência de melanoma nas faixas etárias de 0 a 14 anos e de 15 a 39 e correlacionar os aspectos epidemiológicos ao clínico-patológicos;
- 2- Analisar os perfis de expressão das vias MAP kinase e CDKN2A por meio de estudo imunoistoquímico;
- 3- Sequenciar os casos de melanomas em jovens por meio da técnica *Next Generation Sequencing* (NGS) para avaliação do perfil de mutações dessas lesões.



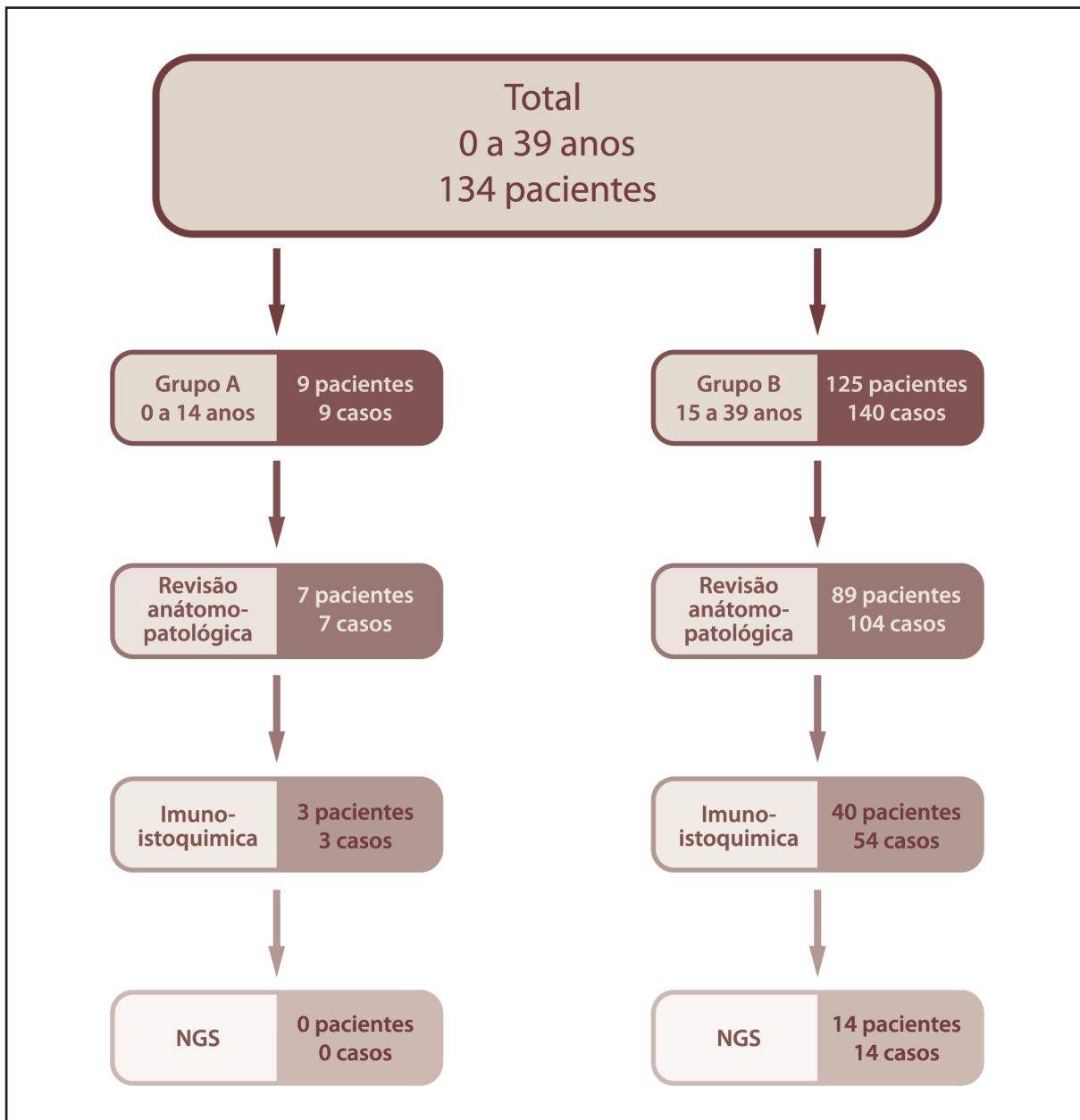
3 METODOLOGIA

3.1 Distribuição dos casos

A distribuição dos casos está representada no diagrama abaixo.

Note que alguns pacientes apresentaram mais de um melanoma e, por isso, optou-se também por designar o número de casos, que se refere ao número total de blocos de melanomas estudados.

Figura 3 - Desenho do estudo





3.2 A avaliação de dados clínicos

O presente estudo foi realizado observando as melhores práticas de ética em pesquisa para estudo transversal de casuística. Após recebimento da autorização do responsável da instituição envolvida para acessar os arquivos, foi realizada análise minuciosa dos prontuários de 134 pacientes e todos os dados clínico-epidemiológicos presentes foram coletados e tabulados.

Critérios de inclusão de casos: foram incluídos consecutivamente pacientes com idade entre 0 e 39 anos, diagnosticados com melanoma entre 1992 e 2017, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Esse período foi escolhido devido à disponibilidade de material histológico proveniente das biospias de cada caso, de registros médicos e de banco de dados da clínica.

Critérios de exclusão de casos: foram excluídos casos diagnosticados em outros hospitais sem revisão patológica em nossa instituição, devido a ausência das amostras de pele e/ou dos laudos anatomopatológicos externos. Além disso, casos não confirmados como melanomas devido à falta de concordância entre dois ou mais patologistas não foram incluídos no nosso estudo. Esses tumores foram chamados tumores melanocíticos de potencial maligno incerto (MELTUMP).⁶⁶

Os dados coletados incluíram características clínicas dos pacientes, como sexo, idade, tipo de pele, histórico pessoal e familiar de melanoma, local do tumor, histórico de exposição solar e presença de metástase.

3.3 A avaliação histopatológica

Cortes seriados dos espécimes dos casos incluídos no estudo foram analisados em lâminas coradas com hematoxilina e eosina. A análise foi realizada por dois pesquisadores em microscópio de luz binocular, e os padrões histopatológicos analisados foram tabulados.

Critérios considerados para a análise histológica: tipo histológico, espessura de Breslow, índice de Clark, presença de mitoses, ulceração e regressão.

Para os casos em que a revisão histopatológica não pôde ser realizada por falta de material, foi considerado o Breslow descrito no prontuário dos pacientes.

Os blocos com tumor grande suficiente para realização de TMA foram separados. A área



tumoral de cada caso foi cuidadosamente delimitada na própria lâmina, que serviu de referência para confecção de matrizes de Tissue Microarray (TMA) e para extração de material genômico. Os demais casos foram cortados apenas para avaliação imunoistoquímica.

Dos casos disponíveis para avaliação histopatológica, os blocos de 43 pacientes apresentavam material para realização de imunoistoquímica e 14 deles também puderam ser submetidos à técnica de NGS.

3.4 Confecção do Tissue Microarray (TMA)

Para a confecção do TMA foi utilizado o aparelho *tissue microarrayer* (Beecher Instruments®, Silver Spring, EUA). A área identificada no bloco doador foi puncionada em 2 locais diferentes (selecionadas previamente) com agulha de 1 mm e os cilindros obtidos foram transferidos para o bloco receptor. Foram incluídas 14 amostras de melanomas referentes a 14 pacientes. As amostras foram representadas em duplicatas, totalizando 28 amostras no TMA.

3.5 Técnica de Imunoistoquímica

Para a realização da técnica imunoistoquímica foram utilizados cortes de 4µm do bloco preparado de TMA contendo os casos de melanoma. Os casos que apresentavam material insuficiente para inclusão no TMA foram estudados individualmente pela técnica da imunoistoquímica. Essas amostras totalizaram 41, referentes a 29 pacientes. Esse total de espécimes considera todas as lesões representadas de cada paciente, já que alguns apresentaram lesões em sítios distintos. Os cortes foram desparafinados em banhos de xilol e reidratados em cadeia descendente de alcoóis. Para remoção dos pigmentos formólicos, os cortes foram incubados em solução de etanol 95% contendo 10% de Hidróxido de Amônio. Na etapa de recuperação antigênica dos epítomos dos tecidos, os cortes foram incubados com tampão de TRIS EDTA (pH = 9,0) e aquecidos através de um *stamer* por 45 minutos, em seguida foram resfriadas em temperatura ambiente durante 20 minutos. O resumo do protocolo de imunoistoquímica para os anticorpos primários está na Tabela 3.

**Tabela 3** - Protocolo de imunohistoquímica dos anticorpos primários para os marcadores avaliados

Soro Primário	Clone/Procedência	Recuperação Antigênica	Controle Positivo
Anti BRAF	EP152Y / abcam	Tampão TRIS EDTA pH 9.0 em Steamer 45'	Melanoma
Anti BRAF V600	VE1 / abcam	Tampão TRIS EDTA pH 9.0 em Steamer 45'	Melanoma
Anti p16	Ab189302 / abcam	Tampão TRIS EDTA pH 9.0 em Steamer 45'	Melanoma
Anti NRAS	Ab198820 / abcam	Tampão CITRATO pH 6.0 em Steamer 45'	Rim

FONTE: A autora

Para revelação da reação foi utilizado o kit Envision Fosfatase Alcalina GII (Dako), seguindo as instruções do fabricante: incubação do *Rabbit/Mouse* LINK durante 20 minutos, 2 lavagens em tampão, em seguida incubação do polímero AP *Enzime ENHANCER* por 20 minutos, seguido de 2 lavagens em tampão. Por fim a reação foi revelada com uma solução contendo: 1 ml de *Permanent Red Chromogen* + 4 ml de Levamisole (bloqueador de fosfatase endógena) + 100 ml de *Substrate Buffer*. Finalmente os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Carazzi, e após secos em temperatura ambiente por 1 hora, cobertos por meio de montagem Ervmount (*Easypath*) e lamínulas de vidro.

Foram considerados positivos os casos com expressão dos fatores estudados em acima de 10% da área representada do tumor. No caso da imunohistoquímica de p16, avaliamos se a expressão concentrava-se predominantemente no núcleo ou no citoplasma.

3.6 Extração do DNA

Os casos de melanoma com material suficiente para extração do material genômico foram selecionados, utilizando-se o kit de extração de DNA QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia,



CA), seguindo o protocolo informado pelo fabricante.

O tecido contendo células neoplásicas foi coletado em microtubos de 1,5 ml separadamente, seguido da remoção da parafina contida no tecido, por meio de incubação com 1 ml de xilol; os tubos contendo o tecido foram então centrifugados na velocidade de 14000 rpm por 1min. O excedente de xilol foi então descartado e 1ml de álcool 100% foi adicionado para a remoção de resíduos de xilol, seguida de nova centrifugação. O excesso de líquido foi descartado e o tecido foi desidratado em centrífuga a vácuo. Após essa etapa inicial o tecido foi submetido a digestão enzimática com 20ml de proteinase K diluída em 90ml de tampão ATL do QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA), em um agitador de tubos a 57°C e 450 rpm durante 12 horas.

Após a etapa da digestão enzimática, foi iniciada a etapa de extração do DNA com a neutralização do conteúdo dos tubos, adicionando nele 200 ml de tampão AL e 1 ml de RNA *Carrier* (substância que separa o RNA do DNA), ambos providos do mesmo kit. Em seguida, foram adicionados 200ml de etanol absoluto e incubados a temperatura ambiente durante 5 minutos.

A próxima etapa consistiu na separação do DNA genômico de interesse. Todo conteúdo do microtubo foi transferido para uma coluna de filtragem acoplada a tubos de coleta, que foram submetidos a centrifugação a 8000 rpm por 1 minuto. Transferiu-se a coluna para um tubo coletor novo, adicionando 500 ml de tampão AW1 e centrifugando-os a 8000 rpm durante 1 minuto. Novamente a coluna foi transferida para um tubo coletor novo e foi adicionado 500 ml de tampão AW2 e centrifugando-os a 8000 rpm durante 1 minuto.

Para uma melhor eficiência, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor, foi adicionado 500 ml de etanol 70% e centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto. Para ajudar a secar todo conteúdo, o tubo foi centrifugado novamente em 14000 rpm durante 3 minutos.

Finalmente, para obtenção do material genômico extraído, transferiu-se a coluna de filtragem para um microtubo de 1,5 ml, adicionando 50 ml de água MilliQ autoclavada no centro da membrana da coluna, deixando incubar por 1 minuto, seguida de uma centrifugação a 14000 rpm durante 1 minuto e meio. A água que atravessou a membrana continha todo material genômico extraído.

O DNA extraído foi quantificado pelo espectrofotômetro NANODROP 1000 (Thermo



Scientific), a análise da quantidade de material genômico extraído foi feita no comprimento de onda 260/280.

3.7 Amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Para confirmação da qualidade e integridade do material extraído, foi realizada a amplificação por reação de PCR utilizando-se de um gene constitutivo b-Actina. Cada reação de PCR continha: 10 ng de DNA genômico; 10 pmol de cada primer da b-Actina (senso e anti-senso), 1X tampão de PCR; 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado (DNTP); 1,25 U de Taq Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA) para um volume final de 50 µl. A amplificação foi realizada com o seguinte ciclo: 95°C durante 15 minutos; 45 ciclos de 95°C por 20 segundos, 58°C por 20 segundos, 72°C por 20 segundos; e extensão final por 5 minutos. A reação de PCR foi realizada no termociclador PCR Eppendorf Mastercycler Gradient (Brinkman Instruments, Westbury).

Os produtos amplificados foram submetidos por eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com *Sybr Safer* (Invitrogen, Carlsbad, CA) contendo um padrão de peso molecular *Mass Ladder* (Invitrogen, CA) para confirmação do sucesso da amplificação.

3.8 Next-Generation Sequencing (NGS)

As mutações somáticas do tumor foram analisadas em áreas relevantes de cada caso por meio de sequenciamento enriquecido usando o kit tecidual QIAmp DNA FEPE (Qiagen, Valencia, CA). A quantidade e qualidade do material foram acessadas em equipamento Nanodrop 1000 com Qubit dsDNA HS kit (*Thermo Fisher Scientific*).

As mutações somáticas foram analisadas por meio de Painel Ampliseq™ (*Thermo Fisher Scientific*), compreendendo BRAF, EGFR, ERBB2, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, KIT, KRAS, MET, NRAS, PDGFRA, PIK3CA e ROS1. Para reduzir artefatos, 30 ng de DNA foram tratados com 1 µL (1 unidade/µL) de enzima UNG (*Life Technologies*) por 15 minutos a 37°C, antes da preparação da biblioteca a ser analisada (Berra et al., 2019). A amplificação foi realizada com



20 ng de DNA tratado usando o Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (*Thermo Fisher Scientific*), e o sequenciamento de alto rendimento foi realizado na plataforma Ion Proton, de acordo com as instruções do fabricante (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts).

A leitura do sequenciamento do DNA foi realizado usando o Torrent Suite Browser e TVC. Mutações somáticas foram consideradas positivas quando o alelo variante estava presente em mais de 5% das leituras, considerando uma cobertura mínima de 100x. Estas foram identificadas, anotadas e filtradas no VarSeq (*Golden Helix*). Apenas variantes de codificação que afetaram a sequência da proteína (*missense e indels*) e as variantes do sítio de *splicing* foram selecionadas.



4 RESULTADOS

Os casos estudados totalizaram 134 pacientes que foram distribuídos em 2 grupos:

Grupo A: pacientes com idade de 0 a 14 anos (n=9)

Grupo B: pacientes com idade de 15 a 39 anos (n=125)

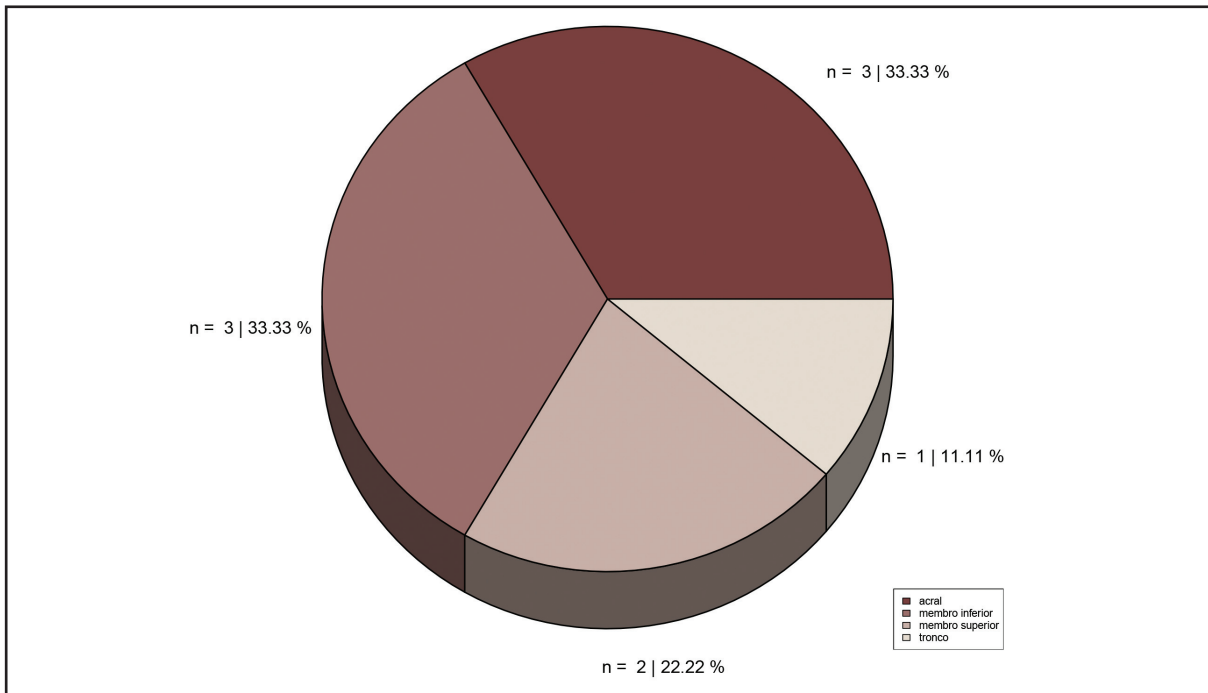
No grupo B (15 a 39 anos), 8 pacientes apresentaram mais de um bloco/topografia e, por isso, na análise foi considerada a quantidade total de blocos (n=140).

4.1 Dados epidemiológicos

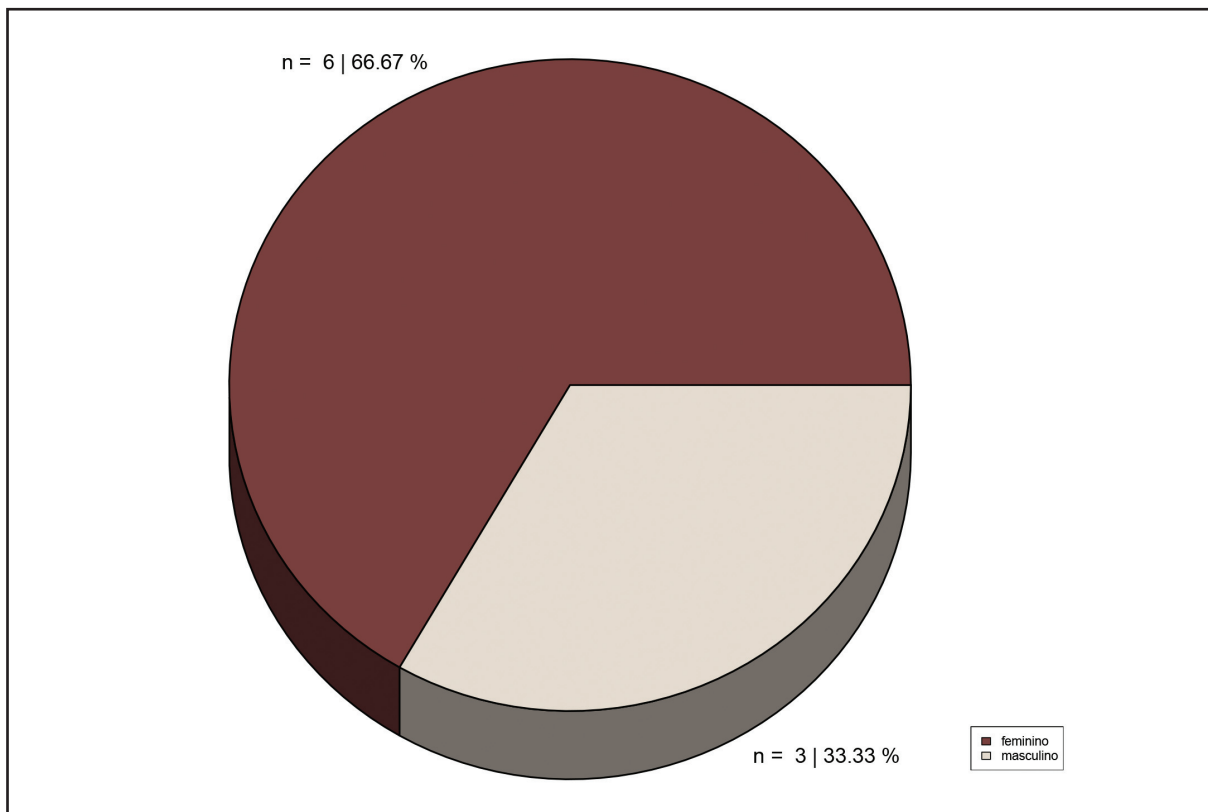
A- Grupo de pacientes com idade de 0 a 14 anos (n=9)

No grupo de crianças de 0 a 14 anos, os melanomas predominaram no sexo feminino, nos membros e em pacientes de fototipo baixo.

A representação dos dados obtidos pode ser vista nos gráficos abaixo e maiores detalhes podem ser vistos na tabela ao final dos resultados epidemiológicos, assim como fotos clínicas dos melanomas.

**Gráfico 1** - Frequências Topografia - pacientes 0 a 14 anos

FONTE: A autora

Gráfico 2 - Frequências Sexo - pacientes 0 a 14 anos

FONTE: A autora



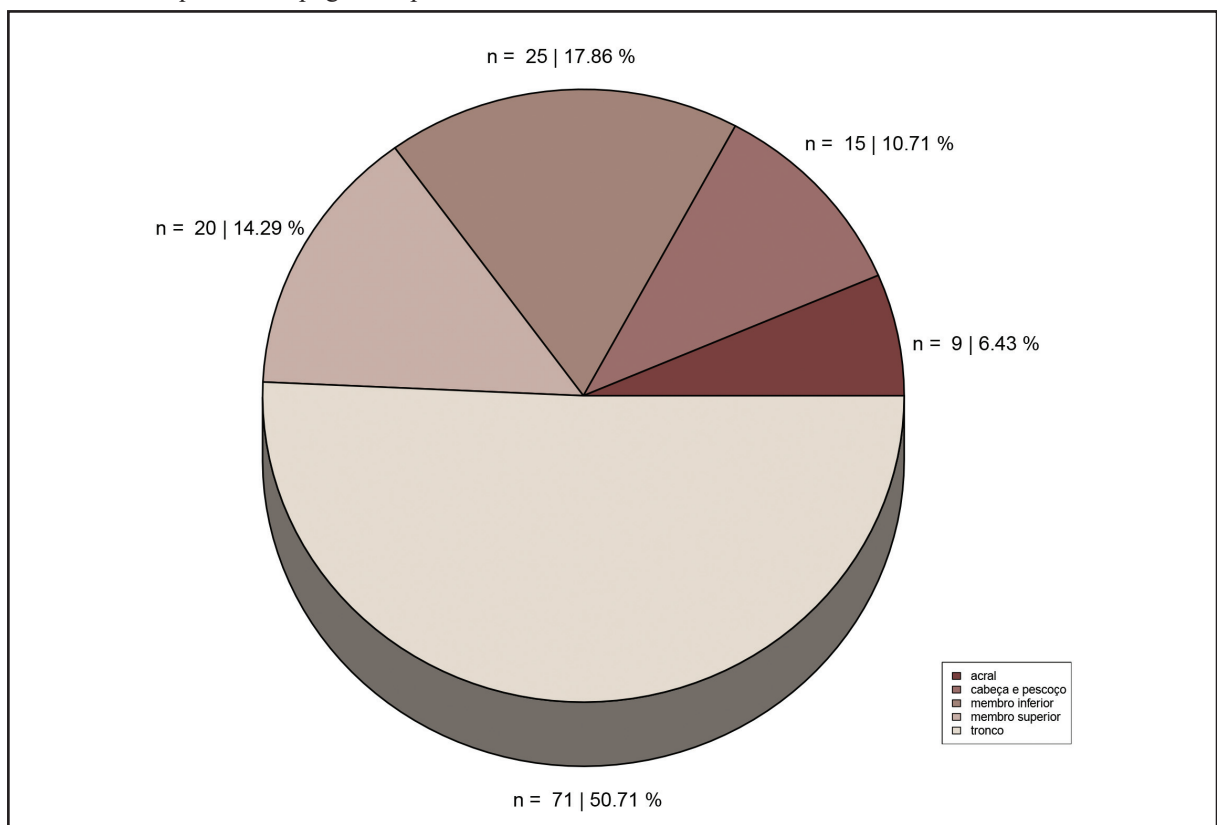
B- Grupo de pacientes com idade de 15 a 39 anos (n=140)

No grupo de adolescentes e adultos jovens, a localização dos melanomas foi predominante no tronco, em mulheres e em fototipos baixos.

Mais da metade dos pacientes apresentaram histórico de queimadura solar, 15% tinham história familiar de melanoma e 34% apresentavam múltiplos nevos melanocíticos.

A representação dos dados obtidos pode ser vista nos gráficos abaixo e maiores detalhes podem ser vistos na tabela ao final dos resultados epidemiológicos, assim como fotos clínicas dos melanomas.

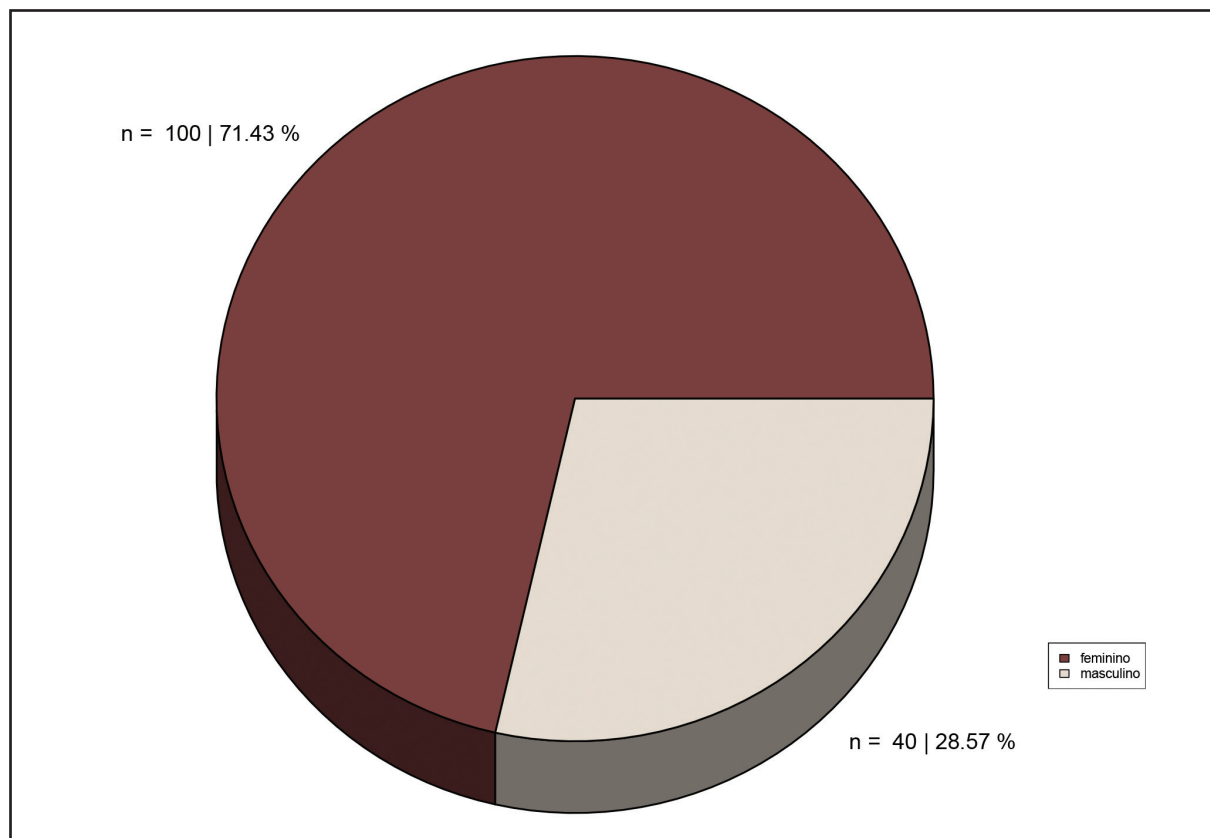
Gráfico 3 - Frequências Topografia - pacientes 15 a 39 anos



FONTE: A autora



Gráfico 4 - Frequências Sexo - pacientes 15 a 39 anos



FONTE: A autora



Tabela 4 - Dados epidemiológicos

Grupo A : 0 a 14 anos			
Sexo	n	(%)	
feminino	6	67	
masculino	3	33	
Total	9	100	
Topografia	n	(%)	
acral	3	33.33	
membro inferior	3	33.33	
membro superior	2	22.22	
tronco	1	11.11	
Total	9	100	
Cor	n	(%)	
amarelo	1	11	
branco	6	67	
pardo	2	22	
Total	9	100	
Idades	n	(%)	
2	1	11.11	
3	1	11.11	
5	2	22.22	
8	3	33.33	
9	2	22.22	
Total	9	100	
Queimadura solar	n	(%)	
desconhecido	1	11	
não	7	78	
sim	1	11	
Total	9	100	
História familiar	n	(%)	
desconhecido	2	22	
não	6	67	
Sim	1	11	
Total	9	100	
Múltiplos nevos melanocíticos	n	(%)	
desconhecido	3	33.33	
não	4	44.44	
sim	2	22.22	
Total	9	100	
Múltiplos melanomas primários	n	(%)	
desconhecido	0	0	
não	9	100	
sim	0	0	
Total	9	100	
Metástase	n	(%)	
desconhecido	0	0	
não	9	100	
sim	0	0	
Total	9	100	

FONTE: A autora



Tabela 5 - Dados epidemiológicos

Grupo B: 15 a 39 anos		
Sexo	n	(%)
feminino	100	71
masculino	40	29
Total	140	100
Topografia	n	(%)
acral	9	6.43
cabeça e pescoco	15	10.71
membro inferior	25	17.86
membro superior	20	14.29
tronco	71	50.71
Total	140	100
Cor	n	(%)
amarelo	1	0.71
branco	124	88.57
pardo	11	7.86
negro	4	2.86
Total	140	100
Idades	n	(%)
16	1	0.71
17	1	0.71
18	1	0.71
19	3	2.14
21	1	0.71
22	2	1.43
23	10	7.14
24	7	5.00
25	5	3.57
26	2	1.43
27	10	7.14
28	13	9.29
29	7	5.00
30	3	2.14
31	6	4.29
32	7	5.00
33	6	4.29
34	8	5.71
35	7	5.00
36	6	4.29
37	14	10.00
38	7	5.00
39	13	9.29
Total	140	100
Queimadura solar	n	(%)
desconhecido	11	8
não	57	41
sim	72	51
Total	140	100
História familiar	n	(%)
desconhecido	12	9
não	107	76
sim	21	15
Total	140	100
Múltiplos nevos melanocíticos	n	(%)
desconhecido	34	24
não	59	42
sim	47	34
Total	140	100
Múltiplos melanomas primários	n	(%)
desconhecido	10	7
não	103	74
sim	27	19
Total	140	100
Metástase	n	(%)
desconhecido	12	8.57
não	123	87.86
sim	5	3.57
Total	140	100

FONTE: A autora

Figura 4 - Exemplos clínicos de melanomas incluídos no estudo



A - Placa assimétrica e irregularmente pigmentada no nariz; B - Placa com múltiplas cores no tronco; C - Três lesões pigmentadas ao redor da aréola direita. Note as cicatrizes provenientes de múltiplas exéreses prévias; D - Placa enegrecida no pé direito.

FONTE: A autora

4.2 Dados Histológicos

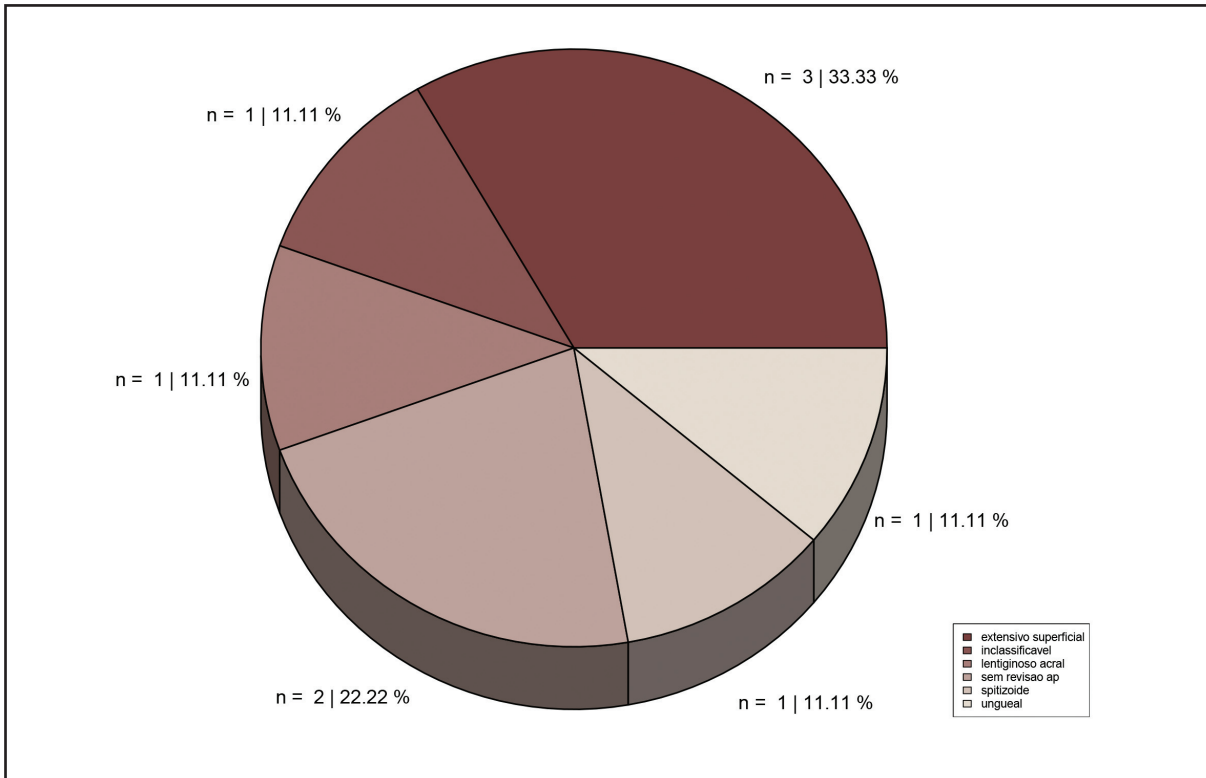
A- Grupo de pacientes com idade de 0 a 14 anos (n=9)

No grupo A, predominaram melanomas extensivos superficiais finos.

A representação dos dados obtidos pode ser vista nos gráficos abaixo e maiores detalhes podem ser vistos na tabela ao final dos resultados histológicos assim como fotos histológicas dos casos.

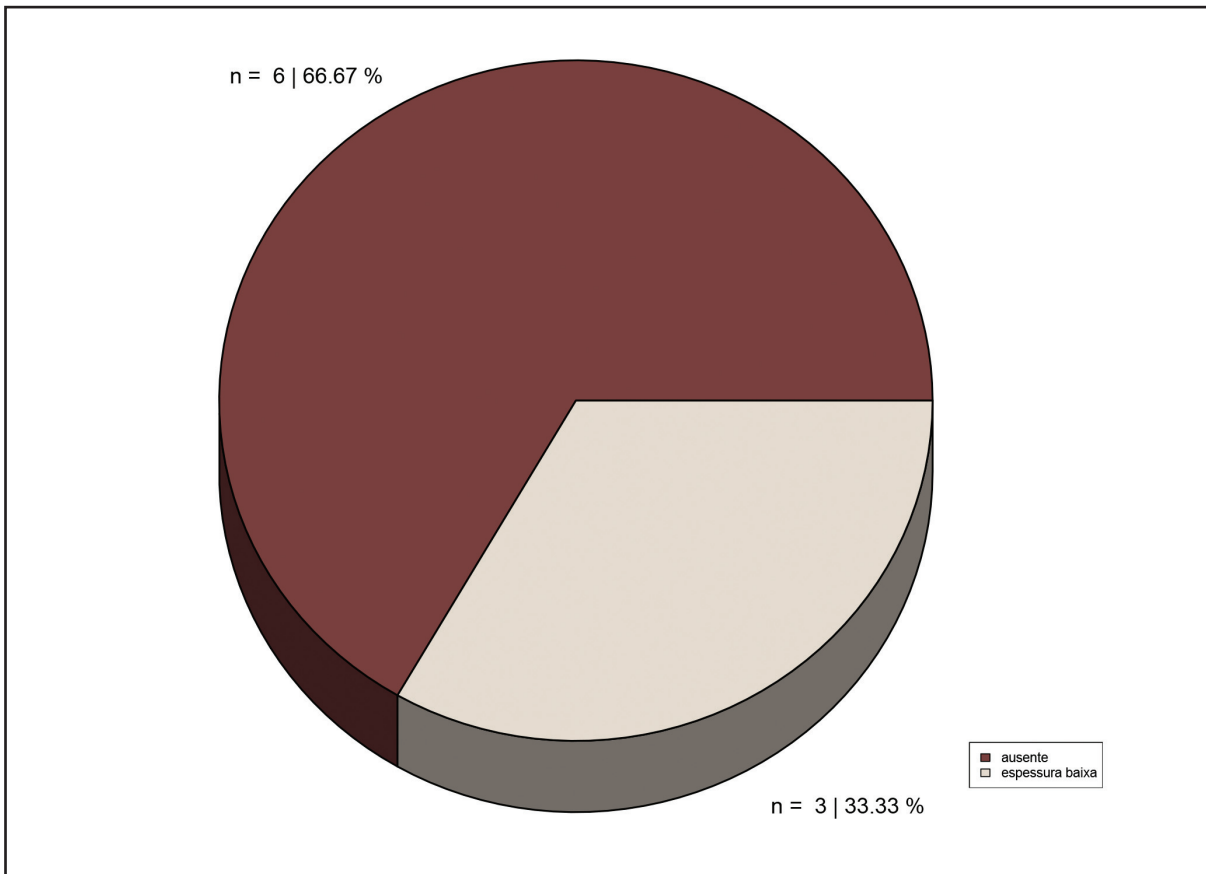


Gráfico 5 - Frequências Morfologia - pacientes 0 a 14 anos



FONTE: A autora

Gráfico 6 - Frequências Categorias Breslow - pacientes 0 a 14 anos



FONTE: A autora

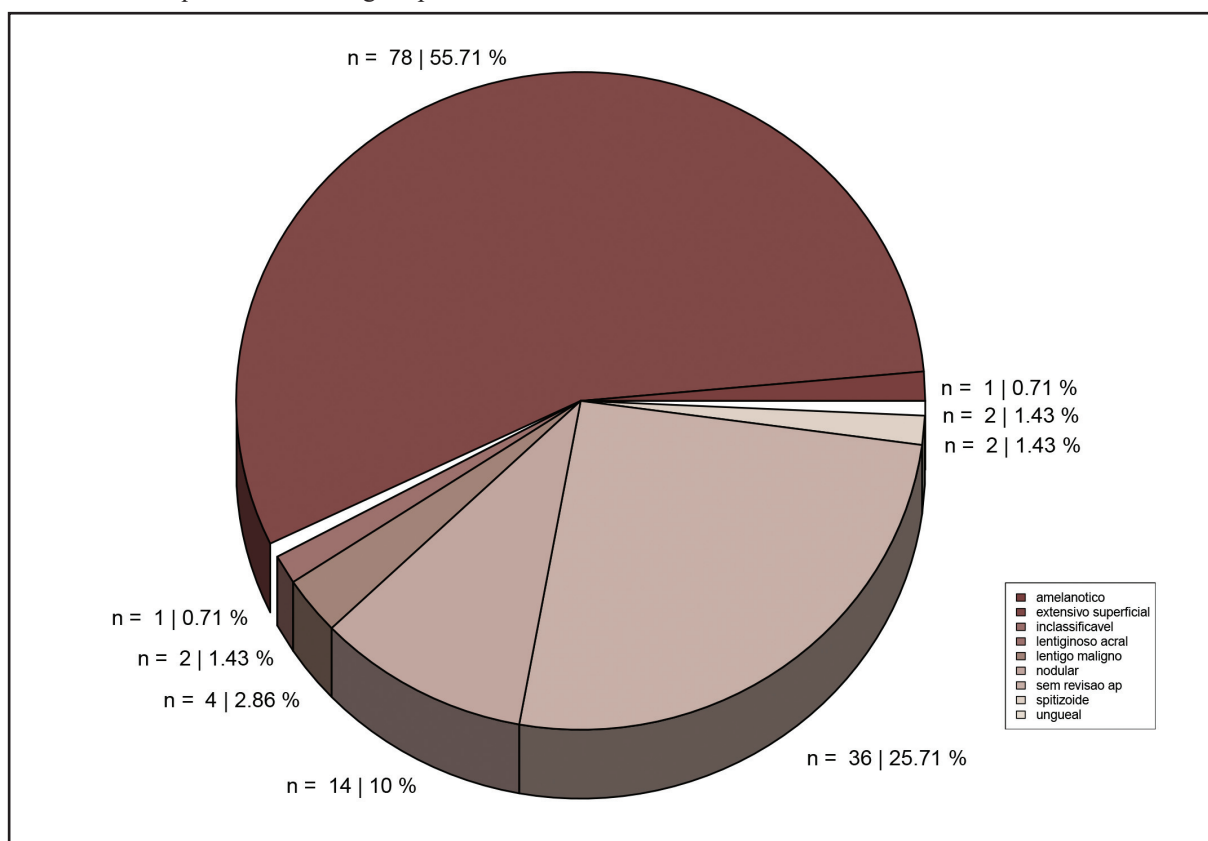


B- Grupo de pacientes com idade de 15 a 39 anos (n=140)

No grupo B, predominaram melanomas extensivos superficiais finos.

A representação dos dados obtidos pode ser vista nos gráficos abaixo e maiores detalhes podem ser vistos na tabela ao final dos resultados histológicos assim como fotos histológicas dos casos.

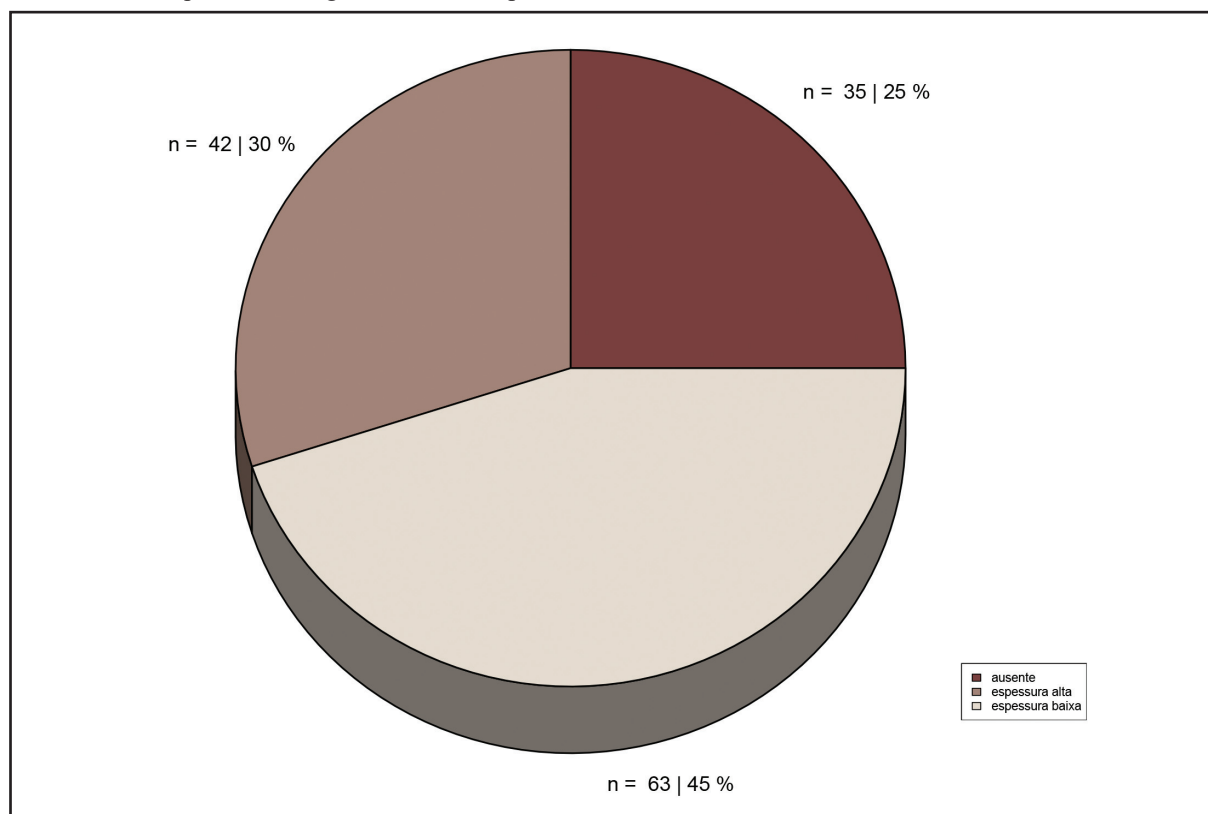
Gráfico 7 - Frequências Morfologia - pacientes 15 a 39 anos



FONTE: A autora



Gráfico 8 - Frequências Categorias Breslow - pacientes 15 a 39 anos



FONTE: A autora

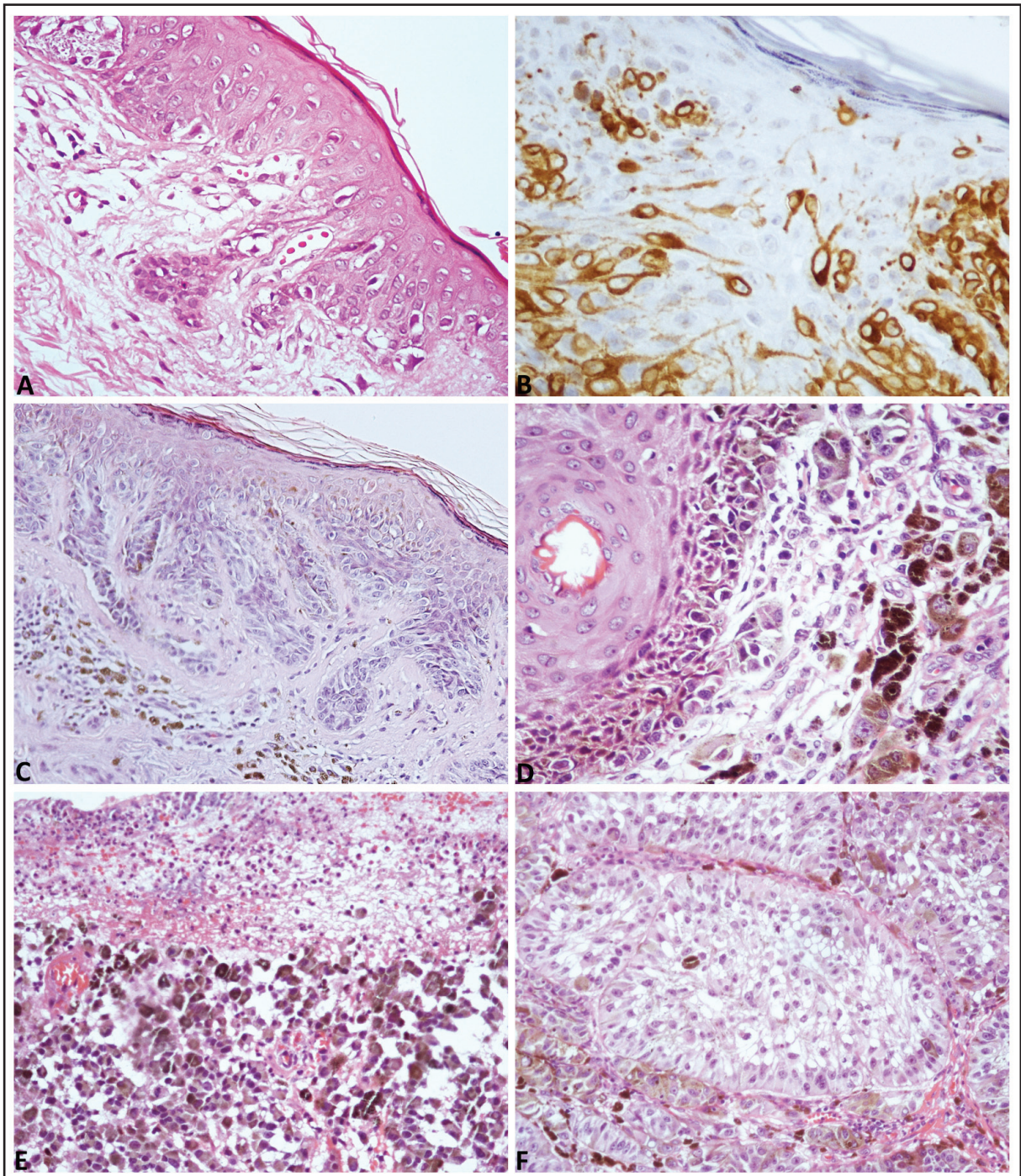
Tabela 6 - Dados histológicos

Grupo A : 0 a 14 anos		
Tipo histológico	n	(%)
amelanotico	0	0
extensivo superficial	3	33.33
inclassificavel	1	11.11
lentiginoso acral	1	11.11
lentigo maligno	0	0
nodular	0	0
sem revisao ap	2	22.22
spitizoide	1	11.11
ungueal	1	11.11
Total	9	100
Breslow		
ausente	6	67
finos (<1mm)	3	33
espessos (>1mm)	0	0
Total	9	100

Grupo B: 15 a 39 anos		
Tipo histológico	n	(%)
amelanotico	2	1
extensivo superficial	78	56
inclassificavel	1	1
lentiginoso acral	2	1
lentigo maligno	4	3
nodular	14	10
sem revisao ap	36	26
spitizoide	2	1
ungueal	1	1
Total	140	100
Breslow		
ausente	35	25
finos (<1mm)	63	45
espessos (>1mm)	42	30
Total	140	100

FONTE: A autora

Figura 5 - Imagens histológicas de pacientes do estudo



A e B - Melanomas in situ: Presença de melanócitos atípicos com processos dendríticos proeminentes em meio aos queratinócitos (A); em B - há presença de melanócitos com processos dendríticos proeminentes e positivos para HMB45. (aumentos de X200 e X400, respectivamente); C - Melanoma invasivo com infiltrado inflamatório e melanófagos (aumento X100); D - Melanoma invasivo com acometimento folicular. (aumento X400); E e F - Melanomas nodulares: área com extensa ulceração e células epitelióides (E); áreas do melanoma com arquitetura organoide (F). (aumento de X200 and X400, respectivamente)

FONTE: A autora



4.3 Dados de imunoistoquímica

A- Grupo de pacientes com idade de 0 a 14 anos (n=3)

No grupo A, dois dos três melanomas foram negativos para p16, BRAF e BRAF mutado. Todas as amostras vieram negativas para NRAS.

B- Grupo de pacientes com idade de 15 a 39 anos (n=54)

Já no grupo B, a maior parte das amostras foi positiva para p16 e em todos esses casos a positividade predominava no citoplasma. Nos casos em que houve positividade também do núcleo, os melanomas eram iniciais (intraepiteliais ou finos) e observou-se um padrão nuclear positivo rechaçado na periferia dos núcleos. Já quando a lesão era mais invasiva e apresentava ninhos de células atípicas, a positividade, quando presente, limitava-se ao citoplasma.

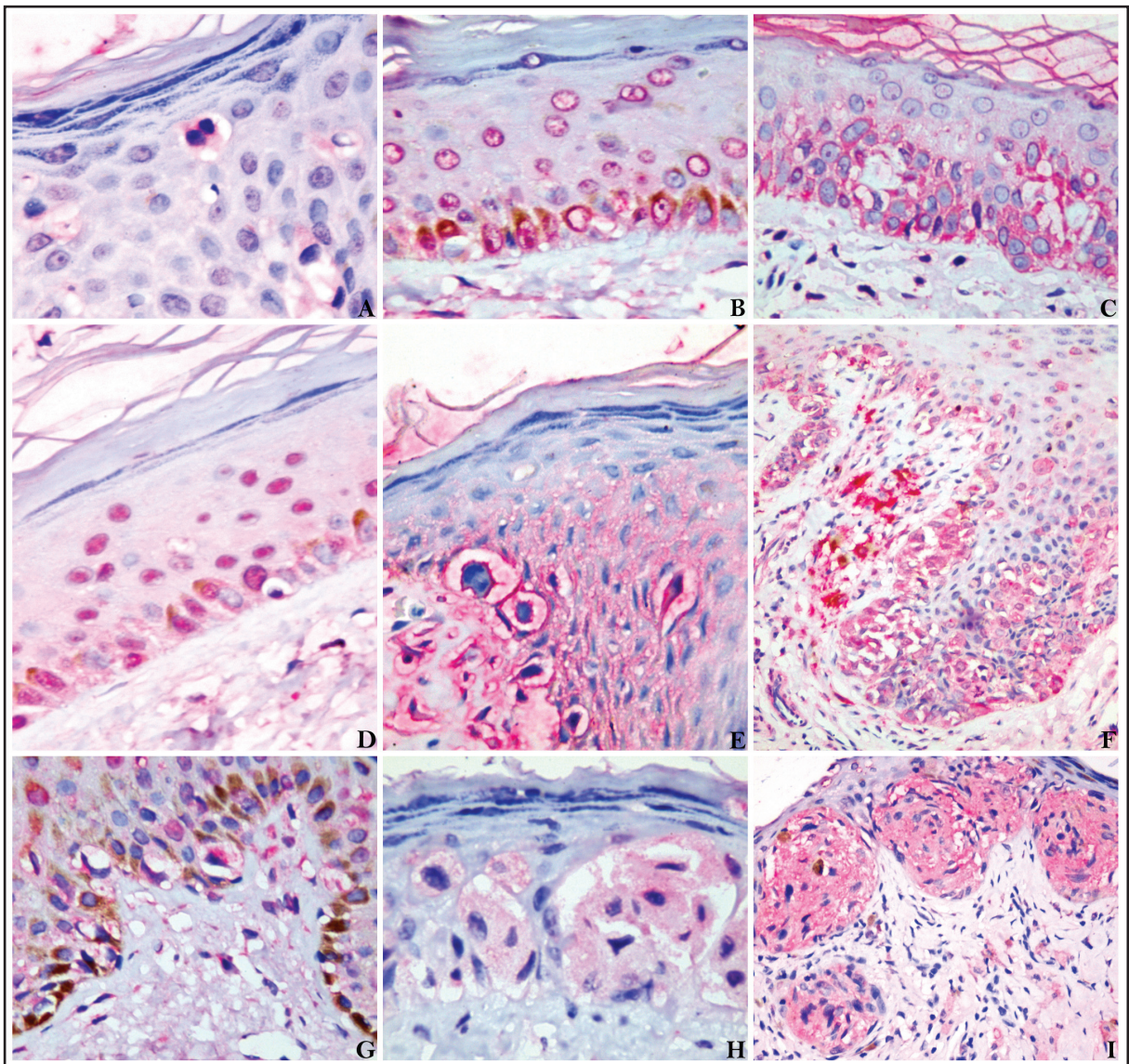
As amostras de imunoistoquímica de BRAF e BRAF mutado também foram predominantemente positivas. Já para a de NRAS, a maior parte foi negativa.

Os detalhes da imunoistoquímica e exemplos do padrão de expressão de cada marcador estão representados na tabela 7 e ilustrados nas figuras 6, 7 e 8.

Tabela 7 - Dados de imunoistoquímica

Grupo A : 0 a 14 anos			Grupo B: 15 a 39 anos		
Imunoistoquímica p16	n	(%)	Imunoistoquímica p16	n	(%)
inconclusivo	0	0	inconclusivo	1	1.85
negativo	2	67	negativo	16	29.63
positivo C	1	33	positivo C	37	68.52
Total	3	100	Total	54	100
Imunoistoquímica BRAF	n	(%)	Imunoistoquímica BRAF	n	(%)
negativo	2	67	negativo	21	39
positivo	1	33	positivo	33	61
Total	3	100	Total	54	100
Imunoistoquímica BRAF mutado	n	(%)	Imunoistoquímica BRAF mutado	n	(%)
negativo	2	67	negativo	20	37
positivo	1	33	positivo	34	63
Total	3	100	Total	54	100
Imunoistoquímica NRAS	n	(%)	Imunoistoquímica NRAS	n	(%)
negativo	3	100	negativo	41	76
positivo	0	0	positivo	13	24
Total	3	100	Total	54	100

Figura 6 - Aspectos imunistoquímicos do p16 em melanomas de pacientes jovens.

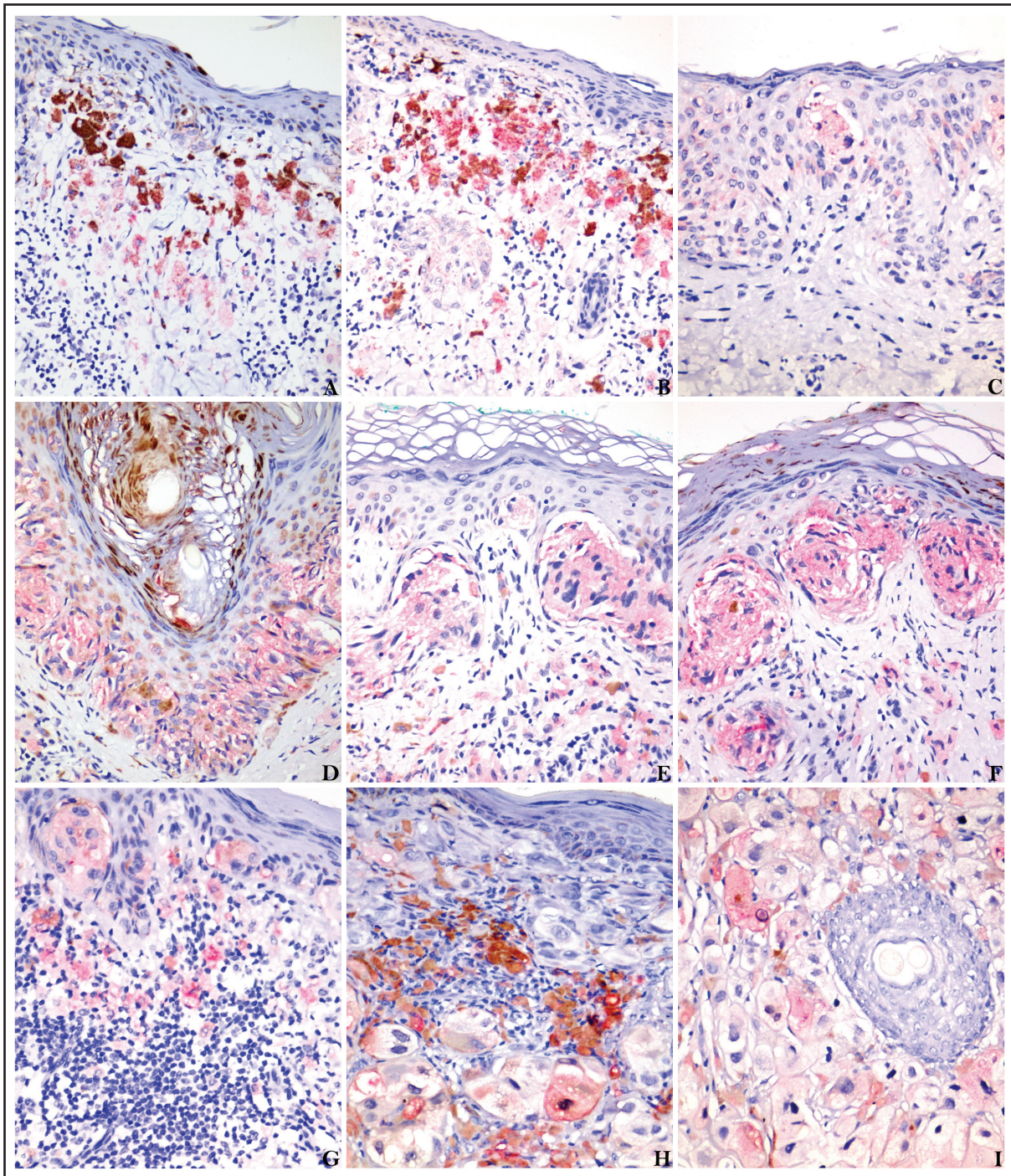


A e B - expressão do p16 em núcleos de melanócitos intraepiteliais. Notar a expressão de p16 rechaçada na periferia dos núcleos em B. Magnificação original x 400 e x400, respectivamente; C - positividade para a proteína p16 no citoplasma de melanócitos neoplásicos que formam ninhos intraepiteliais. Magnificação original x400; D - Expressão da proteína p16 em núcleos de melanócitos intraepiteliais em todos os estratos da epiderme. Magnificação original x400; E - Expressão da proteína p16 nuclear e citoplasmática em caso de melanoma com invasão superficial. Magnificação original x400; F - Expressão citoplasmática da proteína p16 em melanoma invasivo. Magnificação original x250; G - imunexpressão da proteína p16 no citoplasma de melanócitos neoplásicos intra-epidêrmicos. Magnificação original x 400; H e I - expressão da proteína p16 no citoplasma de ninhos de melanócitos neoplásicos intraepidêrmicos e intra-dérmicos. Magnificação original x 400 e x250, respectivamente.

FONTE: A autora



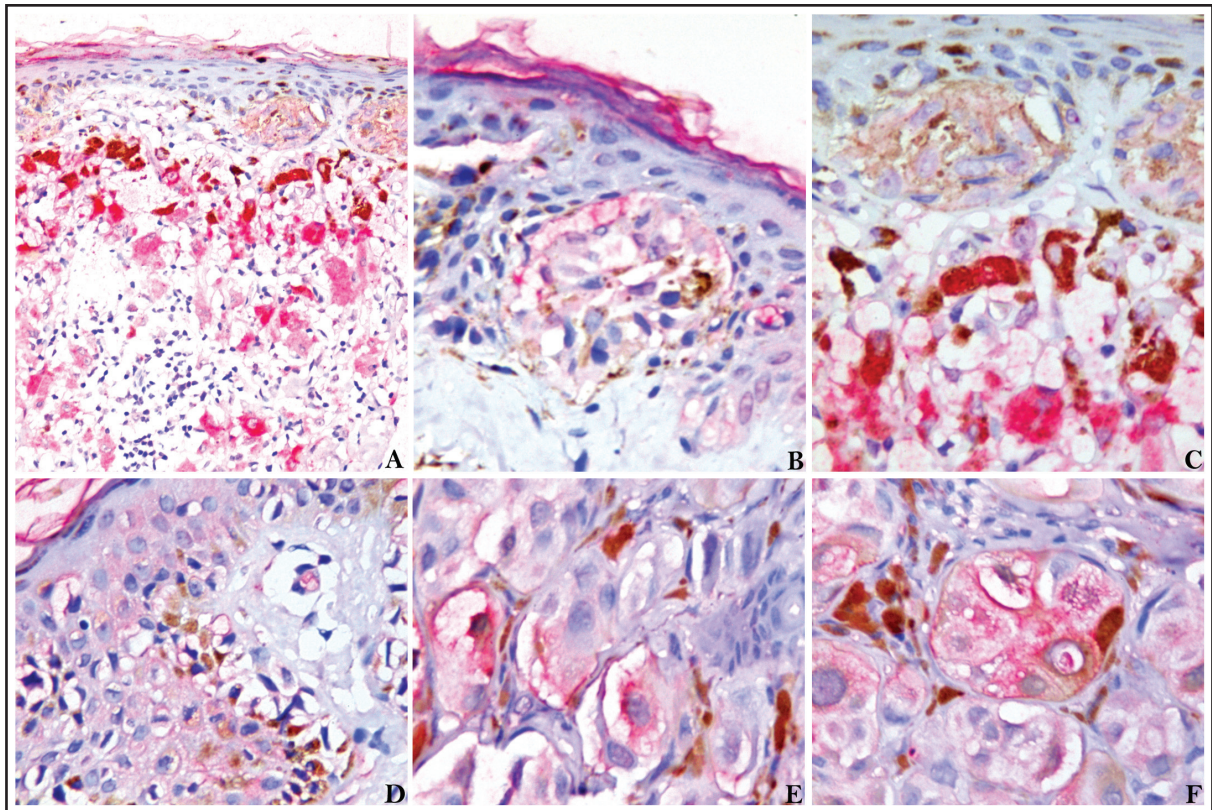
Figura 7 - Imunoexpressão do BRAF mutado em melanomas de pacientes jovens.



A a C - positividade citoplasmática em melanócitos neoplásicos na derme. Note em C a imunoexpressão do BRAF mutado em ninhos de melanócitos neoplásicos na derme juncional. Magnificação original x150, X150 e x250, respectivamente; D a F - Detalhes dos padrões de expressão do BRAF em melanócitos neoplásicos. Note a positividade citoplasmática presente em melanócitos neoplásicos região juncional. Magnificação original x200, x200 e x200, respectivamente; G - Imunoexpressão citoplasmática do BRAF mutado em melanócitos neoplásicos na derme em região de regressão. Magnificação original x200; H e I - Imunoexpressão citoplasmática do BRAF mutado em melanócitos balonizados de citoplasma amplo na derme e, em I, ao redor de estrutura anexial. Magnificação original x200 e x400, respectivamente.

FONTE: A autora

Figura 8 - Imunoexpressão de NRAS em melanomas de pacientes jovens.



A a C - Expressão leve da proteína NRAS no citoplasma de melanócitos neoplásicos intraepiteliais (A) e intensa expressão nuclear da proteína em ninhos de melanócitos neoplásicos na derme. Magnificação original x100, X250 e x250, respectivamente; D a F - Detalhes dos padrões de expressão do NRAS em melanócitos neoplásicos. Note a positividade citoplasmática presente em melanócitos neoplásicos na epiderme em D e a expressão nuclear e citoplasmática nas células neoplásicas na derme em E e F. Magnificação original X250, x400 e x400, respectivamente.

FONTE: A autora

4.4 Dados de *Next Generation Sequencing*

Apenas pacientes do grupo B foram examinados com o NGS.

A maior parte das amostras apresentou uma única mutação, a mais prevalente foi BRAF e dois casos não apresentaram nenhuma variante.

Quatro amostras apresentaram mutações concomitantes.

Os detalhes podem ser visualizados nas tabelas abaixo.

**Tabela 8** - Mutações NGS únicas

Mutações	EGFR	RET	IDH1	ERBB2	HRAS	KRAS	BRAF	PDGFRA	nenhuma variante
não	13	12	12	13	12	12	6	12	12
sim	1	2	2	1	2	2	8	2	2

FONTE: A autora

Tabela 9 - Mutações NGS concomitantes

Mutações	EGFR	RET	IDH1	ERBB2
não	13	13	13	13
sim	1	1	1	1

FONTE: A autora



5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

5.1 Grupo 0 a 14 anos

As informações estatísticas epidemiológicas e histopatológicas das variáveis dos blocos de 0 a 14 anos estão apresentadas nas tabelas 4, 5, 6, 7 e 8.

Nas correlações entre as variáveis Epidemiologia e Histopatologia para o grupo Criança, destacam-se que as escalas das variáveis “Cor” e “Topografia” estão diretamente e fortemente relacionadas.

Tabela 10 - Tabela das correlações Epidemiologia e Histopatologia – 0 a 14 anos

Variável 1	Variável 2	Coef de correlação	Significância (p)
Cor	Topografia	0.8590	0.0030
Historia familiar de MM	Historia de queimadura solar	0.8686	0.0024
Breslow mm	Categorias Breslow	0.9853	0.0000
Mitoses	Topografia	-0.7076	0.0330
Mitoses	Cor	-0.8238	0.0063

Valores de Significância(p) abaixo de 5% (0.05) indicam relevância estatística para a correlação entre os pares de variáveis apresentadas.

Interpretação das intensidades das correlações de Spearman: de 0.00 a 0.19 - correlação muito fraca; de 0.20 a 0.39 - correlação fraca; de 0.40 a 0.69 - correlação moderada; de 0.70 a 0.89 - correlação forte e de 0.90 a 1.00 - correlação muito forte.

Interpretação da direção da associação nas correlações de Spearman: valor do coeficiente positivo (+) - correlação direta; valor do coeficiente negativo (-) - correlação inversa.

FONTE: A autora

Não foi possível realizar as correlações entre as variáveis Epidemiologia, Histopatologia e Imunoistoquímica para grupo criança de 0 a 14 anos pois há limitação mínima de $n > 4$ para executar a correlação.



5.2 Grupo 15 a 39 anos

As informações estatísticas epidemiológicas e histopatológicas das variáveis dos blocos de 15 a 39 anos estão apresentadas nas tabelas 4, 5, 6, 7 e 8.

Nas correlações entre as variáveis Epidemiologia e Histopatologia para o grupo de 15-39 anos, destacam-se:

Tabela 11 - Tabela das correlações Epidemiologia e Histopatologia – 15 a 39 anos

Variável 1	Variável 2	Coef. de correlação	Significância (p)
Topografia	Sexo	0.1710	0.0434
Topografia	Idade	-0.1727	0.0413
Topografia	Localizacao em membro	-0.3796	0.0000
Topografia	Morfologia	0.1693	0.0455
Sexo	Localizacao em membro	-0.2088	0.0133
Sexo	MM multiplos primarios	-0.1680	0.0472
Sexo	Morfologia	0.1848	0.0288
Sexo	Mitoses	0.1873	0.0267
Cor	Idade	-0.2320	0.0058
Idade	Categorias Breslow	0.2063	0.0145
Idade	Mitoses	0.1865	0.0274
Historia de queimadura solar	Historia familiar de MM	0.4988	0.0000
Historia de queimadura solar	Multiplos nevos melanociticos	0.3622	0.0000
Historia de queimadura solar	MM multiplos primarios	0.5465	0.0000
Historia de queimadura solar	Metastase	0.3717	0.0000
Historia de queimadura solar	Morfologia	-0.2283	0.0067
Historia familiar de MM	Multiplos nevos melanociticos	0.2739	0.0011
Historia familiar de MM	MM multiplos primarios	0.4710	0.0000
Historia familiar de MM	Metastase	0.5072	0.0000
Multiplos nevos melanociticos	MM multiplos primarios	0.3771	0.0000
Multiplos nevos melanociticos	Metastase	0.2043	0.0155
MM multiplos primarios	Metastase	0.4130	0.0000
Morfologia	Mitoses	0.4367	0.0000
Breslow mm	Categorias Breslow	0.6394	0.0000
Categorias Breslow	Mitoses	0.2957	0.0004

Valores de Significância(p) abaixo de 5% (0.05) indicam relevância estatística para a correlação entre os pares de variáveis apresentadas.

Interpretação das intensidades das correlações de Spearman: de 0.00 a 0.19 - correlação muito fraca; de 0.20 a 0.39 - correlação fraca; de 0.40 a 0.69 - correlação moderada; de 0.70 a 0.89 - correlação forte e de 0.90 a 1.00 - correlação muito forte.

Interpretação da direção da associação nas correlações de Spearman: valor do coeficiente positivo (+) - correlação direta; valor do coeficiente negativo (-) - correlação inversa.

FONTE: A autora



Nas correlações entre as variáveis Epidemiologia, Histopatologia e imunoistoquímica para o grupo de 15-39 anos, destacam-se:

Tabela 12 - Tabela das correlações Epidemiologia, Histopatologia e Imunoistoquímica – 15 a 39 anos

Variável 1	Variável 2	Coef. de correlação	Significância (p)
Localizacao em membro	IH NRAS	-0.2705	0.0479
Historia de queimadura solar	Ulceracao	0.3745	0.0053
Historia de queimadura solar	Regressao	0.3070	0.0239
Historia de queimadura solar	IH P16	0.2824	0.0385
Historia familiar de MM	Ulceracao	0.2520	0.0660
Multiplos nevos melanociticos	IH NRAS	0.2916	0.0324
MM multiplos primarios	Ulceracao	0.3033	0.0258
MM multiplos primarios	Regressao	0.3798	0.0046
MM multiplos primarios	IH BRAF	-0.2991	0.0280
MM multiplos primarios	IH BRAF mutado	-0.2723	0.0464
Metastase	Ulceracao	0.3127	0.0213
Metastase	Regressao	0.3980	0.0029
Morfologia	IH P16	-0.2724	0.0463
Ulceracao	Regressao	0.8083	0.0000
IH_BRAF	IH BRAF mutado	0.4895	0.0002

Valores de Significância(p) abaixo de 5% (0.05) indicam relevância estatística para a correlação entre os pares de variáveis apresentadas.

Interpretação das intensidades das correlações de Spearman: de 0.00 a 0.19 - correlação muito fraca; de 0.20 a 0.39 - correlação fraca; de 0.40 a 0.69 - correlação moderada; de 0.70 a 0.89 - correlação forte e de 0.90 a 1.00 - correlação muito forte.

Interpretação da direção da associação nas correlações de Spearman: valor do coeficiente positivo (+) - correlação direta; valor do coeficiente negativo (-) - correlação inversa.

FONTE: A autora



Nas correlações entre as variáveis Epidemiologia, Histopatologia, Imunohistoquímica e NGS para o grupo Adulto, destacam-se:

Tabela 13 - Tabela das correlações Epidemiologia, Histopatologia, Imunohistoquímica e NGS - Adulto

Variável 1	Variável 2	Coef. de correlação	Significância (p)
Sexo	NGS nenhuma variante	0.6504	0.0087
Localizacao em membro	NGS BRAF	0.6667	0.0066
Metastatico ou recidiva ao diagnostico	NGS KRAS	0.6814	0.0052
Multiplos nevos melanociticos	NGS PDGFRA	0.5421	0.0368
Breslow mm	NGS nenhuma variante	0.6427	0.0098
IH P16	NGS BRAF	0.6124	0.0152
NGS IDH1	NGS HRAS	1.0000	0.0000
NGS PDGFRA	NGS EGFR	0.6814	0.0052

Valores de Significância(p) abaixo de 5% (0.05) indicam relevância estatística para a correlação entre os pares de variáveis apresentadas.

Interpretação das intensidades das correlações de Spearman: de 0.00 a 0.19 - correlação muito fraca; de 0.20 a 0.39 - correlação fraca; de 0.40 a 0.69 - correlação moderada; de 0.70 a 0.89 - correlação forte e de 0.90 a 1.00 - correlação muito forte.

Interpretação da direção da associação nas correlações de Spearman: valor do coeficiente positivo (+) - correlação direta; valor do coeficiente negativo (-) - correlação inversa.

FONTE: A autora



6 DISCUSSÃO

As características clínico-epidemiológicas mostradas em nossa série estão predominantemente de acordo com outros relatos da literatura. Em todas as idades, o melanoma foi mais comum nos indivíduos brancos e sua frequência aumentou com a idade. Não encontramos predileção significativa por sexo para melanoma em crianças, pois nossa série contou apenas com 6 meninas e 3 meninos. No entanto, em adolescentes e adultos jovens, a frequência de melanoma nas mulheres foi maior.^{9,23,24} Alguns estudos relataram que o uso de terapia hormonal oral (contraceptiva ou de reposição) estaria associado ao aumento do risco de melanoma nas mulheres, enquanto outros estudos não encontraram essa associação.²³ Estudos adicionais são necessários para explicar por que o melanoma é mais comum em mulheres nessa faixa etária.

Em relação à cor da pele, observou-se predominância de fototipos mais baixos. Em contrapartida, os casos acrais foram predominantes em pacientes de cor negra ou parda sendo que a análise estatística das crianças mostrou uma forte correlação entre cor de pele e topografia da lesão, em concordância com a literatura, uma vez que tumores acrais costumam ser mais comum na população negra.²⁵

É importante frisar que no Brasil, devido à intensa integração racial, não é possível confirmar se os pacientes relatados como brancos têm outra origem étnica mista.

Observamos também que nas crianças, a maior parte dos melanomas ocorreu nos membros. Já na faixa etária de 15 a 39 anos, os melanomas do tronco foram mais comuns, ambos concordando com os dados da literatura.¹⁸ A predominância no tronco desses pacientes provavelmente se deve ao fato de que, o principal fator de risco modificável em adolescentes e adultos jovens é a exposição à radiação UV, e mais especificamente a exposição intensa e ocasional. Sendo assim, o tronco é uma região cuja exposição não é constante, mas que quando ocorre, pode ser intensa e provocar queimaduras solares.^{25,27,28} A análise estatística nessa faixa etária mostrou correlação de queimadura solar com a presença de múltiplos nevos melanocíticos e múltiplos melanomas primários, o que corrobora a importância desse fator de risco. Além disso, observou-se uma correlação direta moderada entre histórico de queimadura solar e história familiar de melanoma, o que pode ser atribuído a hábitos familiares de exposição solar, assim como a uma maior tendência genética ao desenvolvimento de melanoma, que associado às queimaduras solares aumenta o risco de melanoma mais precoce.



Ao estudar-se os pacientes com história familiar de melanoma, também encontrou-se correlação com múltiplos nevos melanocíticos e múltiplos melanomas primários, sendo que esses dois últimos também se correlacionaram entre si. Dessa forma, podemos sugerir que pacientes com múltiplos nevos melanocíticos e histórico familiar têm maior número de melanomas.

Quando avaliamos as características histopatológicas, os melanomas extensivos superficiais foram mais comuns no grupo B. No grupo A, 3 casos também eram extensivos superficiais, porém observamos 2 casos de melanomas lentiginosos acrais, um spitzoide e um ungueal inclassificável. Na série de 33 indivíduos com idades entre 3 e 14 anos estudados por Ferrari et al⁵⁵, a maioria das lesões primárias em crianças era espessa e atípica (amelanótica, simulando granuloma piogênico). Em nosso estudo, a maior parte dos pacientes do grupo A apresentaram melanomas na fase *in situ*. Esse achado difere da literatura internacional, mas atribuímos esse resultado à pequena amostra de indivíduos entre 0 e 14 anos no nosso estudo.⁵⁵ A análise estatística do grupo de 15 a 39 anos demonstrou uma correlação moderada entre a morfologia do melanoma e o número de mitoses, ou seja, tumores nodulares têm maior correlação com a presença de mitoses no exame histopatológico.

Em relação às lesões precursoras relacionadas ao desenvolvimento de melanoma, verificamos que apenas 3 pacientes do grupo A apresentaram nevo congênito gigante prévio ao diagnóstico de melanoma. Alguns autores associam o desenvolvimento do melanoma infantil ao nevo melanocítico congênito gigante, síndrome do nevo displásico, numerosos nevos atípicos, xeroderma pigmentoso, imunodeficiência ou história familiar de melanoma.¹⁷ Na presente série, não foi possível analisar esses outros parâmetros, pois as informações coletadas nos prontuários médicos não mencionavam essas outras lesões na maioria dos casos.

Já um dos fatores de risco conhecidos mais importantes para o desenvolvimento de melanoma em adolescentes e adultos jovens é a história familiar de melanoma e indivíduos com múltiplos nevos melanocíticos.^{23,29} Em nosso estudo, houveram 17 casos com história familiar de melanoma. Desses casos, a maioria foi em menores de 30 anos (11 casos).

Em relação ao estudo imunoistoquímico do p16 (via do CDKN2A), observou-se a presença da proteína na maior parte dos casos, predominantemente em seu citoplasma. Na literatura há divergências em relação ao corte para a positividade do p16. Alguns estudos consideram



a marcação positiva independentemente de sua presença no núcleo ou citoplasma, enquanto em outros, apenas a marcação nuclear é considerada positiva. Aparentemente, a amostra pode apresentar perda de expressão nuclear e, mesmo assim, ainda apresentar expressão citoplasmática, que pode ou não ser considerada. Observa-se que o grupo de estudos que considera apenas a marcação nuclear como positiva, apresenta menor variabilidade de resultados, tendo assim, maior acurácia.^{47,67}

Neste trabalho optou-se por considerar positiva a expressão de p16 em mais de 10% das células do citoplasma e no núcleo. Sendo assim, em 18 amostras (sendo que 3 correspondiam ao mesmo paciente) a expressão do p16 resultou negativa.

A ausência da expressão de p16 pode ser atribuída à mutação germinativa no gene CDKN2A, que é hereditária. Quando o indivíduo já tem um dos alelos mutados, a perda da heterozigose ocorre quando o alelo funcional remanescente também se inativa por mutação. Isso faz com que a via do p16 fique disfuncional e pode resultar no surgimento do melanoma de forma mais rápida e precoce. Indivíduos sem a mutação germinativa também podem perder p16, porém, esse processo ocorre numa fase muito mais avançada, quando o tumor já é espesso e ocorre por *downregulation*, metilação, mutação somática, inativação do gene ou produção de proteína disfuncional.^{45,46,48}

A literatura mostra que a mutação de CDKN2A em melanomas esporádicos é muito incomum, trata-se de gene de suscetibilidade pouco penetrante.⁶⁸ No entanto, a sua frequência aumenta em tumores espessos ou em casos familiares. Nosso trabalho não evidenciou correlação entre perda da expressão de p16 e espessura de Breslow, o que está de acordo com a hipótese de que pacientes jovens podem perder p16 mesmo em tumores finos, uma vez que a expressão está relacionada a mutações germinativas nesses indivíduos. Também foi evidenciada uma correlação entre presença do p16 e queimadura solar. Pode-se especular que isso ocorra porque os pacientes que não têm a mutação germinativa, e por isso, mantêm o p16, necessitam de maior exposição solar para desenvolver o melanoma em relação aos que apresentam predisposição genética.

Por outro lado, ambas as mutações somáticas em BRAF e NRAS parecem estar mais associadas à exposição solar do que à predisposição genética. Demonstramos na análise estatística que a imunistoquímica em BRAF e BRAF mutada está inversamente relacionada à



múltiplos melanomas primários, que usualmente têm correlação com histórico familiar.

Além de melanomas, BRAF e NRAS também podem aparecer em lesões benignas. Em lesões intermediárias, a incidência de BRAF cai e NRAS aumenta.⁴⁷ Nosso estudo mostrou correlação da presença de NRAS em pacientes com múltiplos nevos melanocíticos.

Já em melanomas iniciais o BRAF se torna novamente mais comum, sendo que a mutação em NRAS volta a aparecer quando a lesão avança e se torna invasiva.³⁴ Apesar de alguns trabalhos sugerirem que essas mutações são mutuamente exclusivas em melanomas, nosso estudo mostrou que 5 pacientes apresentaram imunistoquímica positiva para ambas as proteínas.³⁵ Isso é importante já que, apesar de a imunistoquímica ser um método fidedigno para detectar BRAF e NRAS, a associação com a análise genética também é importante e aumenta a acurácia, uma vez que na mesma amostra podem coexistir áreas imunistoquímicas positivas e negativas.⁵³

O teste de NRAS também é considerado importante pois os portadores dessa mutação podem ser sensíveis a inibidores da MEK. Além disso, a associação entre mutação em BRAF e NRAS em tumores avançados pode significar perda de resposta precoce aos inibidores da BRAF sendo a mutação em NRAS um marcador de resistência adquirida aos inibidores de BRAF.⁵³

Analisamos também as diferenças de expressão entre o BRAF e sua forma mais comum de mutação, o BRAF V600E. Pudemos observar que 4 casos foram positivos para BRAF e negativos para o BRAF V600E, provavelmente porque apresentavam outro tipo de mutação em BRAF.⁶⁹ Em contrapartida, também vimos casos com BRAF mutado V600E positivo e BRAF negativo. Provavelmente, essa discordância se deve a diferentes sensibilidades dos reagentes.

Finalmente, os pacientes com material disponível para o NGS foram avaliados sendo que apenas 2 não apresentaram variantes de mutações. Dos 14 testados, 8 apresentaram mutação em BRAF. Também observamos mutações em HRAS e KRAS que são isoformas de RAS.⁵⁰

Outras mutações encontradas foram: IDH1, RET, ERBB2, PDGFRA, EGFR. A isocitrato-desidrogenase (IDH1) é normalmente relacionada com gliomas, condrossarcomas, colangiocarcinomas e carcinomas na tireóide.⁷⁰ O protooncogene RET também tem sido pouco



associado com melanoma.⁷¹

Em contrapartida, ERBB2 é expresso em melanomas primários e em metástases já que pode ativar a via MAPK. Recentemente, foi implicado no crescimento e sobrevivência da célula do melanoma e já é visto como um potencial alvo para o tratamento.⁷²

O receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas a (PDGFRA) é um alvo para os inibidores de tirosina quinase (TKI). A desregulação do PDGFRA foi relatada em muitos cânceres, sendo ainda pouco estudada em melanomas. As mutações PDGFRA parecem ser mutuamente exclusivas com as mutações KIT, mas podem coexistir com as em BRAF e NRAS.⁷³

Finalmente, a mutação no receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) está normalmente associada ao câncer de pulmão e desempenha um papel importante na regulação do tumor. Porém há poucos estudos sobre sua relação com melanoma.⁷⁴

No nosso estudo, observamos correlações entre HRAS e IDH1 além de entre PDGFRA e EGFR. Porém, é importante frisar que a análise estatística usando os dados do NGS é limitada, uma vez que apresenta um pequeno número de amostras.

As informações expostas nesse trabalho trazem especificidades de uma população de pacientes atendidos e acompanhados no HC-FMUSP, mas que tem peculiaridades de uma população que é bastante distinta da caucasiana, apresentada na maioria dos estudos. Temos como perspectiva futura ampliar esse estudo para populações de outras regiões do Estado de São Paulo e do Brasil, para compreendermos as características dessa doença frente às características regionais da população, o que poderá trazer informações relevantes para o manejo dos pacientes a longo prazo.



7 CONCLUSÃO

Nosso estudo mostra a maior prevalência de melanomas no tronco de indivíduos com 15 a 39 anos e sua relação com exposição solar aguda e intermitente. A maioria da população do estudo foi de mulheres com fototipo baixo. Observou-se correlação de múltiplos melanomas primários e múltiplos nevos melanocíticos com histórico familiar de melanoma.

Em relação à histopatologia, os melanomas *in situ* e extensivos superficiais finos foram os mais prevalentes, mesmo nas crianças. Apenas uma pequena parte dos casos apresentou metástase, ulceração e regressão.

O estudo imunoistoquímico do CDKN2A demonstrou que nos pacientes jovens a perda de expressão de p16 não está relacionada diretamente com o Breslow, ao contrário do que ocorre nas outras faixas etárias. Sugere-se que ocorra perda de heterozigose precoce nesses indivíduos que provavelmente herdaram a mutação germinativa em CDKN2A. Destaca-se, portanto, a importância de avaliar a perda da expressão de p16 na imunoistoquímica dos melanomas, a fim de direcionar esses casos para estudo genético da mutação em CDKN2A nos pacientes jovens e /ou com melanoma familiar. Assim, lesões nesses pacientes podem ser diagnosticadas mais precocemente possibilitando mais intervenções terapêuticas.

Finalmente, o estudo imunoistoquímico das mutações somáticas demonstrou relação inversa de BRAF e direta de NRAS com a presença de múltiplos nevos melanocíticos. Em 5 casos, a positividade de ambos foi concomitante. O NGS demonstrou que a presença de mutação em KRAS está mais relacionada a metástase e recidiva ao diagnóstico.



REFERÊNCIAS

- 1 Davis NC, McLeod GR. From Hunter to Handley (1787-1907). A retrospective on management approaches to melanoma. In: *Cutaneous melanoma*. Blach CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong SJ, editors. 3rd ed, QMP, St Louis, Missouri, 1998. p. 1-8.
- 2 Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest*. 2005; 115:813-824.
- 3 Laennec RTH. Sur les melanoses. *Bulletin de Faculte de Medecine Paris*. 1806; 1:24.
- 4 Norris, w. A case of fungoid disease. *Edinb. Med. Surg* 1820, 16: 562-565.
- 5 Bandarchi B, Ma L, Navab R, et al. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol Res Pract*. 2010; 2010, Article ID 583748, 8 pages.
- 6 Anger M, Friedhofer H, Fukutakim MF, Ferreira MC, Landman G. Primary cutaneous melanoma: na 18 years study. *Clinics*. 2010; 65(3):257-63.
- 7 Parichy DM, Reedy MV, Erickson CA. Regulation of melanoblast migration and differentiation. In: *The pigmentary system*. Norlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Oetting WS, Ortonne JP editors. 2nd Ed. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 2006. p. 140-154.
- 8 Hicks MJ, Flaitz CM. Oral mucosal melanoma: epidemiology and pathobiology. *Oral Oncol*. 2000 Mar; 36(2): 152-69.
- 9 Bleyer A, O'Leary M, Barr R, et al. Cancer Epidemiology in older adolescents and young adults 15 to 29 years of age, including SEER incidence and survival: 1975-2000. *National Cancer Institute, NIH Pub. No. 06-5767*. Bethesda, MD 2006.
- 10 Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin*. 2006; 56(2): 106-130.
- 11 <https://academic.oup.com/jnci/article/113/12/1648/6312532?login>
- 12 Jemal A, Devesa SS, Hartge P, Tucker MA. Recent trends in melanoma incidence among whites in the United States. *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93:678-683.
- 13 Marks R. Epidemiology of melanoma. *Clin Exp Dermatol*. 2000; 25:459-63.
- 14 Bevona, 2002: Bevona C, Sober AJ. Melanoma incidence trends. *Cermzitol Clin*. 2002; 20:589-95.

* De acordo com: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Sistema Integrado de Bibliotecas. *Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP*. Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Maria Cláudia Pestana, Maria Cristina Cavarette Dziabas, Eliana Maria Garcia, Maria Fátima dos Santos, Maria Marta Nascimento e Suely Campos Cardoso. 3ª Edição - Revisada, Ampliada e Modificada - São Paulo; 2016. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.



- 15 Giavina-Bianchi MH, Festa-Neto C, Sanches JA, et al. Worse survival of invasive melanoma patients in men and “de novo” lesions. *An Bras Dermatol*. 2020; 95 (2): 158-164.
- 16 <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>
- 17 Daniotti M, et al. Cutaneous melanoma in childhood and adolescence shows frequent loss of ink4A and gain of KIT. *Journal of Investigative Dermatology*. 2009; 129:1759-68.
- 18 Paradela S, Fonseca E, Pita-Fernandéz S, et al. Prognostic factors for melanoma in children and adolescents. *Cancer*. 2010; 116:4334-44.
- 19 Livestro DP, Kaine EM, Michaelson JS et al. Melanoma in the young: differences and similarities with adult melanoma. *American Cancer Society*. 2007; 110(3):614-24.
- 20 Lambie M, et al. Infantile melanoma – A triple threat diagnosis and management. *Ann Plast Surg*. 2011; 67:85-9.
- 21 Han D, et al. The unique clinical characteristics of melanoma diagnosed in children. *Ann Surg Oncol*. 2012; 19:3888-95.
- 22 Kirkwood JM, Jukic DM, Averbook BJ, Sender LS. Melanoma in pediatric, adolescent, and young adult patients. *Semin Oncol*. 2009; 36(5):419-31.
- 23 Weir HK, Marret LD, Cokkinides V, et al. Melanoma in adolescents and young adults (ages 15-39 years): United States, 1999-2006. *J Am Acad Dermatol*. 2011 Nov; 65(5):S38.e1-13.
- 24 Indini A, Brecht I, Del Vecchio M et al. Cutaneous melanoma in adolescents and young adults. *Pediatr Blood Cancer* 2018; e27292.
- 25 Rouhani P, Hu S, Kirsner RS. Melanoma in hispanic and black americans. *Cancer Control*. 2008; 15:248-53.
- 26 Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations), *National Cancer Institute*. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/, based on November 2011 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2012.
- 27 Bataille V, Winnet A, Sasieni P, et al. Exposure to the sun and sunbeds and the risk of cutaneous melanoma in the UK: a case-control study. *Eur J Cancer*. 2004;40:429-35].
- 28 Jhappan C, Noonan FP, Merlino G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene*. 2003; 22:3099–3112.
- 29 Tucker, M.A., et al. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA*. 1997; 277:1439–1444.



- 30 Bressac-de-Paillerets B, Avril MF, Chompret A, Demenais F. Genetic and Environment factors in cutaneous malignant melanoma. *Biochimie*. 2002; 84:67-74.
- 31 Gosh P; Chin L; Genetics and genomics of Melanoma. *Expert Rev Dermatol*. 2009 April; 4(2); 131.
- 32 Udayakumar D, Mahato B, Gabree M, Tsao H. Genetic Determinants of Cutaneous Melanoma Predisposition. *Semin Cutan Med Surg*. 2010; 29:190-195.
- 33 Van der Rhee JI, Krijnen P, Gruis NA, et al. Clinical and histologic characteristics of malignant melanoma in families with a germline mutation in CDKN2A. *J Am Acad Dermatol*. 2011; 65(2):281-8.
- 34 Amaral T, Sinnberg T, Meier F, Krepler C, Levesque M, Neissner H, Garbe G. European The mitogen-activated protein kinase pathway in melanoma part I e Activation and primary resistance mechanisms to BRAF inhibition. *Journal of Cancer* xx (2017) 1-8
- 35 Hsieh R, Nico MMS, Camillo CMC, Oliveira KK, Sanguenza M, Lourenço SV. Mutational Status of NRAS and BRAF Genes and Protein Expression Analysis in a Series of Primary Oral Mucosal Melanoma. *Am J Dermatopathol* _ Volume 39, Number 2, February 2017.
- 36 Reginster MA, Pierard-Franchimont C, Pierard GE, Quatresooz P. Molecular Dermatopathology in Malignant Melanoma; *Dermatol Res and Prac*. 2012: Article ID 684032, 6 pages. doi:10.1155/2012/684032.
- 37 Van der Rhee JI, Krijnen P, Gruis NA, et al. Clinical and histologic characteristics of malignant melanoma in families with a germline mutation in CDKN2A. *J Am Acad Dermatol*. 2011; 65(2):281-8.
- 38 Berg P, Wennberg A, Tuominen R et al. Germline CDKN2A mutations are rare in child and adolescents cutaneous melanoma. *Melanoma research* 2004; 14: 251-255.
- 39 de Avila ALR, ACV Krepischi, Moredo LF et al. Germline CDKN2A mutations in Brazilian patients of hereditary cutaneous melanoma. *Familial Cancer* (2014) 13:645–649
- 40 Ciarpaglini, CM, Gonzalez J, Sanchez B et al. The Amount of Melanin Influences p16 Loss in Spitzoid Melanocytic Lesions: Correlation With CDKN2A Status by FISH and MLPA. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* Volume 00, Number 00, 2018
- 41 Gironi LC, Colombo E, Pasini B et al. Melanoma-prone families: new evidence of distinctive clinical and histological features of melanomas in CDKN2A mutation carriers *Archives of Dermatological Research*. Published online September 2018.
- 42 Cachia AR, Indsto JO, McLaren KM, Mann GJ, Arends MJ. CDKN2A Mutation and Deletion Status in Thin and Thick Primary Melanoma. *Clinical Cancer Research* Vol. 6, 3511–3515, September 2000
- 43 George E, Polissar NL, Wick M. Immunohistochemical evaluation of p16INK4A,



- E-cadherin, and cyclin D1 expression in melanoma and spitz tumors. *Am J Clin Pathol*. 2010;133(3):370-379.
- 44 Murphy JA , Barrantes-Reynolds R, Kocherlakota R , Bond JP ,Greenblatt MS. The CDKN2A Database: Integrating Allelic Variants With Evolution, Structure, Function, and Disease Association *HUMAN MUTATION* 24:296^304 (2004)
- 45 Hsieh R, Nico MMS, Coutinho-Camillo CM et al. The CDKN2A and MAP Kinase Pathways: Molecular Roads to Primary Oral Mucosal Melanoma. *Am J Dermatopathol* Volume 35, Number 2, April 2013
- 46 Estrozi B, Machado J, Rodriguez R, Bacchi C.E. Clinicopathologic Findings and BRAF Mutation in Cutaneous Melanoma in Young Adults. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* Volume 22, Number 1, January 2014
- 47 Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn, I et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions *N ENGL J MED* 373;20 November 12, 2015
- 48 Saroufim M, Habib R H, Gerges R et al. Comparing BRAF mutation status in matched primary and metastatic cutaneous melanomas: Implications on optimized targeted therapy. *Experimental and Molecular Pathology* 97 (2014) 315–320
- 49 Uguen A, Talagas M, Costa S et al. NRASQ61R, BRAFV600E immunohistochemistry: a concomitant tool for mutation screening in melanomas. *Diagnostic Pathology* (2015) 10:121
- 50 Sullivan RJ, Flaherty K. MAP kinase signaling and inhibition in melanoma. *Oncogene* (2013) 2373 – 2379
- 51 Carlson JA, Xavier Jr JCC , Tarasen A, Sheehan CE, Otto G , Miller VA, Stephens PJ, Elvin JA, Vergilio J, Suh J, Gay LM, Ross JS. Next-Generation Sequencing Reveals Pathway Activations and New Routes to Targeted Therapies in Cutaneous Metastatic Melanoma. *Am J Dermatopathol* _ Volume 39, Number 1, January 2017
- 52 Eskandarpour M, Hashemi J, Kanter L et al. Frequency of UV-inducible NRAS mutations in melanomas of patients with germline CDKN2A mutations. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 95, No. 11, June 4, 2003
- 53 Massi D, Simi L, Sensi E et al. Immunohistochemistry is highly sensitive and specific for the detection of NRASQ61R mutation in melanoma. *Modern Pathology* advance online publication, 24 October 2014
- 54 Cordero KM, Gupta D, Frieden IJ, McCalmont T, Kashani-Sabet M. Pediatric Melanoma: Results of a large cohort study and proposal for modified ABCD detection criteria for children. *J Am Acad Dermatol* 10.1016/j.jaad.2012.12.953)
- 55 Ferrari A, et al. Does melanoma behave differently in younger children than in adults? A retrospective study of 33 cases of childhood melanoma from a single institution. *Pediatrics*. 2005; 115(3):649-54.



- 56 Paradelo S, Fonseca E, Pietro VG. Melanoma in children. *Arch Pathol Lab Med*. 2011; 135(3):307-16.
- 57 Olsen CM, Zens MS, Stukel TA, et al. Nevus density and melanoma risk in women: a pooled analysis to test the divergent pathway hypothesis. *Int J Cancer*. 2009; 124(4):937-44.
- 58 Chang Y, Barret JH, Bishop DT et al. Sun exposure and melanoma risk at different latitudes: a pooled analysis of 5700 cases and 7216 controls. *Int J Epidemiol*. 2009. Jun;38 (3): 814-30.
- 59 Mark PP, Freeman LB, Anderson WF, Tucker MA. Recent trends in incidence of cutaneous melanoma among US caucasian young adults. *J Invest Dermatol*. 2008; 128(12):2905-8.
- 60 Balch, CM, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*. 2009; 27:6199-6206.
- 61 Clark WH, Jr, L From, Bernardino EA, et al. The histogenesis and biologic behavior os primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res*. 1969; 29:705-27.
- 62 Breslow A. Prognostic factors in the treatment of cutaneous melanoma. *J Cutan Pathol*. 1979; 6:208-12.
- 63 Mangas C, Paradelo C, Puig S, et al. Valoración inicial, diagnóstico, estadificación, tratamiento y seguimiento de lós pacientes con melanoma maligno primário de La piel. Documento de consenso de La “Xarxa de Centres de Melanoma de Catalunya i Balears”. *Actas Dermosifiliogr*. 2010; 101(2):129-142.
- 64 Mu E, Lange JR, Strouse J. Comparision of the use and results of sentinel Lymph Node Biopsy in children and young adults with melanoma. *Cancer* 2012; 118:2700-07
- 65 Dahl C, Guldberg P. The genome and epigenome of malignant melanoma. *APMIS*. 2007; 115(10):1161-76.
- 66 Cerroni L, Barnhill R, Elder D, et al. Melanocytic tumors of uncertain malignant potential: results of a tutorial held at the XXIX Symposium of the International Society of Dermatopathology in Graz, October 2008. *Am J Surg Pathol*. 2010;34:314–326
- 67 Koh SS, Cassarino DS. Immunohistochemical expression of p16 in melanocytic lesions: an updated review and meta-analysis. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(7):815-828
- 68 Tsao H, Zhang X, Kwitkiwski K et al. Low prevalence of germline CDKN2A and CDK4 mutations in patients with early-onset melanoma. *Arch Dermatol* 2000 Sep; 136 (9): 1118-22.
- 69 Wilmott JS , Johansson PA, Newell F et al. Whole genome sequencing of melanomas in adolescent and young adults reveals distinct mutation landscapes and the potential role of germline variants in disease susceptibility. *European Genome-phenome Archive: EGAS00001001552*



- 70 Chang S, Yium S, Park H. The cancer driver genes IDH1/2, JARID1C/ KDM5C, and UTX/ KDM6A: crosstalk between histone demethylation and hypoxic reprogramming in cancer metabolism. *Experimental & Molecular Medicine* (2019)51:66
- 71 Li AY, McCusker MG, Russo A, Scilla KA, Gittens A, Arensmeyer K, Mehra R, Adamo V, Rolfo C. RET fusions in solid tumors. *Cancer Treat Rev.* 2019 Dec;81:101911. doi: 10.1016/j.ctrv.2019.101911. Epub 2019 Oct 30. Review.
- 72 Xu Y, Mu Y, Wang L, Zhang X . Detailed Analysis of Molecular Mechanisms in Primary and Metastatic Melanoma. *JOURNAL OF COMPUTATIONAL BIOLOGY* Volume 26, Number 0, 2019
- 73 Dai J, Kong Y, Si L, Chi Z, Cui C, Sheng X, Mao L, Li S, Lian B, Yang R, Liu S, Xu X, Guo J. Large-scale Analysis of PDGFRA Mutations in Melanomas and Evaluation of Their Sensitivity to Tyrosine Kinase Inhibitors Imatinib and Crenolanib. *Clin Cancer Res*; 19(24) December 15, 2013
- 74 Van Haele, M, Borght S V, Ceulemans A, Wieërs M,1 Metsu S, Sagaert X, Weynand B. Rapid clinical mutational testing of KRAS, BRAF and EGFR: a prospective comparative analysis of the Idylla technique with high-throughput next-generation sequencing. *Clin Pathol* 2019;0:1–7