



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA

JULIANA SAYURI SUGITA INUMARU

**ANÁLISE DA MUTAÇÃO V600E DO GENE *BRAF*  
EM MELANOMAS CUTÂNEOS PRIMÁRIOS**

Dissertação de Mestrado

Goiânia

2012

JULIANA SAYURI SUGITA INUMARU

**ANÁLISE DA MUTAÇÃO V600E DO GENE *BRAF* EM MELANOMAS  
CUTÂNEOS PRIMÁRIOS**

Dissertação de mestrado apresentada  
ao Programa de Mestrado em Genética  
da Pontifícia Universidade Católica de  
Goiás como requisito parcial para  
obtenção do Título de Mestre em  
Genética.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Aparecida Saddi

GOIÂNIA  
2012

I61a Inumaru, Juliana Sayuri Sugita.  
Análise da mutação V600E no gene *BRAF* em melanomas cutâneos primários [manuscrito] / Juliana Sayuri Sugita Inumaru. – 2012.  
79 f. ; il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Mestrado em Genética, 2012.  
“Orientadora: Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi”.  
Bibliografia: f. 66-78

1. Melanoma. 2. Mutação (Biologia). 3. Genética. I. Título.

CDU: 616-006.81(043)

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU  
PROGRAMA DE Mestrado EM GENÉTICA**

**ATA DA SESSÃO DE APRESENTAÇÃO E DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE  
CONCLUSÃO DE CURSO DE Mestrado**

- 1 No dia 24 de agosto de 2012, reuniu-se a 62ª Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado, composta  
2 pelos membros: Pro<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Aparecida Saddi / PUC Goiás (Presidente), Prof. Dr. Antonio Márcio  
3 Teodoro Cordeiro Silva / PUC Goiás e Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres / UEG, para avaliação da  
4 dissertação intitulada "ANÁLISE DA MUTAÇÃO V600E DO GENE *BRAF* EM MELANOMAS  
5 CUTÂNEOS PRIMÁRIOS", da candidata **Juliana Sayuri Sugita Inumaru**, aluna do Mestrado em  
6 Genética (MGene) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás. A sessão iniciou-se às 15h25min.,  
7 na sala de estudos do MGene, sob a presidência da Pro<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Aparecida Saddi, que concedeu 30  
8 minutos à candidata para expor sinteticamente o estudo. A seguir, a arguição procedeu-se de forma  
9 interativa. Ao final da defesa, a sessão foi suspensa e a Comissão se reuniu em separado para avaliação e  
10 atribuição de nota. Discutido o trabalho e o desempenho da mestranda, a Banca Examinadora  
11 considerou-a **aprovada** com a nota 10,0 (  Dez ) equivalente ao  
12 conceito "A". Portanto, a discente foi declarada **Mestre em Genética pela Pontifícia Universidade**  
13 **Católica de Goiás**, pela Presidente da Banca Examinadora, que encerrou a sessão às 16h45min.  
14 Não havendo nada mais a tratar, a presente ata foi lavrada e assinada pelos membros da Banca  
15 Examinadora.  
16 Pro<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Aparecida Saddi Vera Aparecida Saddi  
17 Prof. Dr. Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva Antonio Márcio  
18 Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres Flávio Monteiro Ayres  
19 Esta ata contém 19 linhas contínuas, sem rasuras, emendas ou retificação.

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA  
DA PONTIFÍCA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
DEFENDIDA E APROVADA EM 24 DE AGOSTO DE 2012  
COM CONCEITO A**

**BANCA EXAMINADORA**

*Vera Aparecida Saddi*

Prof.ª Dr.ª Vera Aparecida Saddi - PUC Goiás  
(presidente-orientadora)

*Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva*

Prof.º Dr. Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva / PUC Goiás  
(membro interno)

*Flávio Monteiro Ayres*

Prof.º Dr. Flávio Monteiro Ayres / UEG  
(membro externo)

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente e acima de tudo, agradeço a Deus pela oportunidade de poder estudar, cursar Medicina, depois Dermatologia e agora o Mestrado. Sem Ele, nada disso seria possível.

Agradeço aos meus pais, meu marido e meu filho de apenas 6 meses, pelo apoio incondicional, paciência e compreensão no processo árduo da produção de uma dissertação.

Agradeço também a minha orientadora Dra. Vera Aparecida Saddi, pela paciência, dedicação e incentivo para a realização deste trabalho. Com ela aprendi não só sobre Genética, mas passei a valorizar ainda mais o universo da pesquisa científica.

Agradeço ainda aos colaboradores do Serviço de Anatomia Patológica e do Laboratório de Diversidade Genética da PUC-GO, fundamentais para a realização de trabalho, pois como tudo na vida, é impossível fazer uma dissertação sem a ajuda de outras pessoas.

E finalmente, agradeço aos professores que aceitaram participar da banca, e todas as pessoas que direta ou indiretamente, participaram e me ajudaram a finalizar mais uma etapa de minha vida.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Esquema representativo da transformação de um nevo em melanoma-----	18
<b>Figura 2:</b> Esquema representativo de um melanócito e da transferência de melanina aos queratinócitos-----	19
<b>Figura 3:</b> Incidência e mortalidade mundiais de acordo com o sexo e faixa etária-----	21
<b>Figura 4:</b> Esquema demonstrando a função das proteínas p16 e p14-----	24
<b>Figura 5:</b> Esquema ilustrativo da rede de conexões da via MAPK e da atuação de alguns medicamentos no melanoma -----	36
<b>Figura 6:</b> Esquema representativo da via da MAPK-----	38
<b>Figura 7:</b> Localização cromossômica do gene <i>BRAF</i> -----	39
<b>Figura 8:</b> Esquema representativo da proteína BRAF com seus domínios funcionais e as mutações mais comuns-----	40
<b>Figura 9:</b> Esquema representativo da mutação V600E do gene <i>BRAF</i> -----	42
<b>Figura 10:</b> Gel de poliacrilamida a 10% corado com nitrato de prata, mostrando produtos de restrição de um fragmento do gene <i>BRAF</i> com 224 pares de bases, contendo ou não a mutação T1799A, cortado com a enzima <i>TspRI</i> -----	54
<b>Figura 11:</b> Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de <i>BRAF</i> ) com relação à idade-----	56

<b>Figura 12:</b> Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de <i>BRAF</i> ) com relação ao sexo-----	56
<b>Figura 13:</b> Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de <i>BRAF</i> ) com relação à localização-----	57
<b>Figura 14:</b> Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E do gene <i>BRAF</i> ) com relação à exposição solar-----	57
<b>Figura 15:</b> Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de <i>BRAF</i> ) com relação à presença de metástases ao diagnóstico-----	58
<b>Figura 16:</b> Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de <i>BRAF</i> ) com relação ao subtipo histológico-----	58
<b>Figura 17:</b> Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de <i>BRAF</i> ) com relação aos sinais de regressão-----	59
<b>Figura 18:</b> Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de <i>BRAF</i> ) com relação à presença de ulceração-----	59
<b>Figura 19:</b> Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de <i>BRAF</i> ) com relação à presença de infiltração linfocitária-----	59
<b>Figura 20:</b> Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de <i>BRAF</i> ) com relação à presença de satélites microscópicos-----	60
<b>Figura 21:</b> Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de <i>BRAF</i> ) com relação ao índice de Breslow-----	60

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Genes comumente mutados no melanoma-----	41
Tabela 2: Revisão dos estudos da literatura que investigaram a mutação V600E do gene <i>BRAF</i> em melanomas-----	44
Tabela 3: Descrição dos primers e protocolos de ciclagem usados no ensaio de PCR para amplificação do gene BRAF em amostras de melanoma-----	52
Tabela 4: Análise univariada investigando as possíveis associações entre os aspectos clínico patológicos do melanoma com a mutação no gene <i>BRAF</i> -----	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	do inglês <i>American Joint Committee on Cancer</i>
ATP	adenosina trifosfato
BRAF	isoforma B da proteína RAF
<i>BRAF</i>	Gene homólogo B1 do oncogene viral de sarcoma de murino v- raf
BRIM2	fase 2 do estudo comparando a eficácia entre vemurafenib e decarbazina
BRIM3	fase 3 do estudo comparando a eficácia entre vemurafenib e decarbazina
CDKN2A	proteína quinase dependente de ciclina inibitória 2 <sup>a</sup>
CDK	proteína quinase dependente de ciclina
c-KIT	receptor do gene <i>KIT</i> (homólogo do oncogene de sarcoma felino viral v-kit Hardy-Zuckerman 4)
c-MET	receptor do fator de crescimento hepatocitário
CRAF	isoforma C da proteína RAF
CR1	domínio rico em cisteína da proteína RAF
CR2	domínio rico em serina e treonina da proteína RAF
CR3	domínio quinase da proteína RAF

DHL	desidrogenase láctica
DNA	ácido desoxirribonucléico
ERK	proteína ERK
FDA	do inglês <i>Food and Drugs Administration</i>
FGF	receptor do fator de crescimento de fibroblasto
HAJ	Hospital Araújo Jorge
HE	hematoxilina eosina
IARC	do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IFN- $\alpha$	interferon – $\alpha$
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INK4a	proteína CDK inibitória p16
MAL	Melanoma acral lentiginoso
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MC1R	receptor de melanocortina 1
MES	Melanoma extensivo superficial
MEK	proteína MEK
MLM	Melanoma do lentigo maligno
MN	Melanoma nodular
PB	pares de bases

Ph	potencial hidrogeniônico
RB	Retinoblastoma
RFLP	polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição
Rpm	rotações por minuto
RR	taxa de resposta (do inglês <i>rate response</i> )
SEER	do inglês <i>Cancer Institute Surveillance Epidemiology End Results</i>
TILs	linfócitos infiltrados no tumor
TNM	Tumor, Nódulos (metástases linfonodais), Metástases à distância
UK	do inglês <i>United Kingdom</i>
UV	radiações ultravioletas
UVB	radiação ultravioleta B
<i>v-raf</i>	oncogene para fibrosarcoma de crescimento rápido
V600E	troca dos aminoácidos valina por ácido glutâmico na posição 600

## SUMÁRIO

RESUMO-----	15
ABSTRACT-----	16
I – INTRODUÇÃO -----	17
I.1 - Classificação dos melanomas-----	19
I.2 – Epidemiologia-----	20
I.3 - Fatores de risco-----	23
I.4 - Estadiamento do melanoma-----	26
I.5 - Fatores prognósticos-----	31
I.6 - Aspectos genéticos do Melanoma-----	35
I.6-1 - A via MAPK-----	37
I.6-2 - O gene <i>BRAF</i> -----	39
I.6-3 - A proteína BRAF-----	40
I.6-4 - A mutação no gene <i>BRAF V600E</i> no melanoma-----	40
I.6-5 - Implicações clínicas das mutações de BRAF em melanoma-----	42
I.7 - Tratamento do melanoma-----	45
II – OBJETIVOS-----	47
II.1 - Objetivo geral-----	47
II.2 - Objetivos específicos-----	47
III – METODOLOGIA-----	48
III.1 - Aspectos éticos da pesquisa-----	48
III.2 - Seleção de casos de melanoma-----	48
III.3 - Extração de DNA das amostras de melanoma-----	49
III.3-1 - Preparo das amostras-----	49
III.3-2 - Lise celular-----	50
III.3-3 - Precipitação de proteínas-----	50
III.3-4 - Precipitação do DNA-----	50
III.3-5 - Hidratação do DNA-----	51

III.4 - Análise molecular da mutação V600E do gene <i>BRAF</i> por meio de PCR e RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição)-----	51
III.5 - Análise Estatística-----	52
IV – RESULTADOS-----	53
IV.1 - Grupo de estudo-----	53
IV.2 - Análise da mutação V600E do gene <i>BRAF</i> nos pacientes portadores de melanoma-----	53
IV.3 – Distribuição dos pacientes que apresentaram a mutação V600E do gene <i>BRAF</i> e os aspectos clinicopatológicos dos melanomas-----	54
V – DISCUSSÃO-----	60
VI – CONCLUSÕES-----	66
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	67
ANEXOS -----	81

## RESUMO

O melanoma representa 4% das neoplasias malignas da pele, no entanto, mais de 95% dos pacientes com melanoma estágio IV irão morrer em cinco anos e a grande parte dos pacientes irá sucumbir em um ano. O gene mutado mais comumente no melanoma é o *BRAF* e a mutação V600E é descrita em 40 a 70% dos melanomas cutâneos. Tal mutação resulta na substituição da valina por ácido glutâmico no códon 600, resultando na forma ativa desta proteína. O objetivo desse estudo consistiu em investigar a frequência da mutação V600E do gene *BRAF*, em pacientes diagnosticados com melanoma em Goiânia, bem como as possíveis associações, entre tal mutação e os aspectos clinico-patológicos dos casos analisados. Para isso foram analisados 77 casos de melanoma do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge, em Goiânia, Goiás. A análise molecular foi realizada por PCR e RFLP. Análise estatística descritiva e comparativa com o teste Chi-quadrado foi usado neste estudo. A mutação V600E do gene *BRAF* foi encontrada em 54 (70,1%) pacientes portadores de melanoma cutâneo e nenhuma associação estatisticamente significativa foi detectada entre a presença de mutação com outros parâmetros prognósticos como idade, gênero, exposição solar, localização anatômica, presença de metástases, subtipo histológico e parâmetros histológicos (índice de Breslow, presença de ulceração, sinais de regressão, infiltração linfocitária e presença de satélites). Nossos resultados permitem concluir que a mutação V600E de *BRAF* é um evento comum nos melanomas e que representa um alvo molecular importante para as abordagens alvo dirigidas no tratamento desta neoplasia.

Palavras-chaves: *BRAF*; mutação V600E; proteína BRAF; melanoma cutâneo.

## ABSTRACT

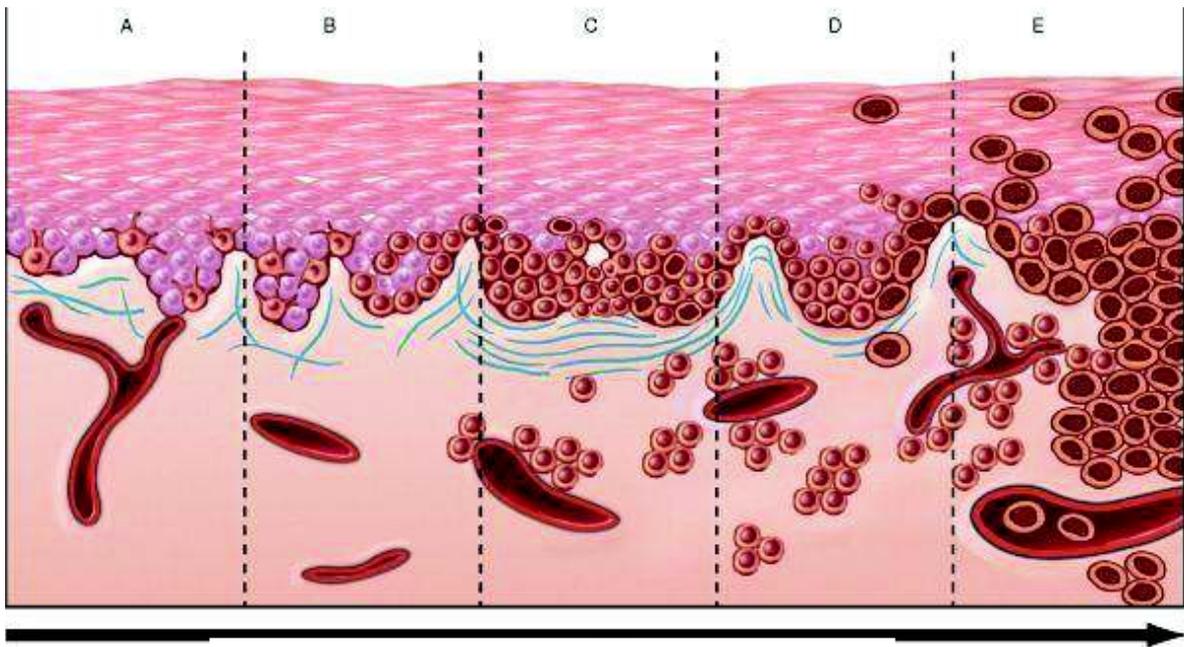
Melanoma comprises about 4% of skin cancers, however, more than 95% of stage IV melanoma patients will die within five years and most patients will succumb in a year. The most commonly mutated gene in melanoma is *BRAF* V600E mutation, described in 40-70% of cutaneous melanomas. This mutation results in the substitution of valine for glutamic acid in codon 600, resulting in the active form of the protein. The objective of this study was to investigate the frequency of *BRAF* V600E mutation in patients diagnosed with melanoma in Goiânia, as well as the possible associations between this mutation and clinical-pathological aspects of the cases analyzed. Seventy seven cases of melanoma from the Pathology Department of Araújo Jorge Hospital, in Goiânia, Goiás were analyzed. Molecular analysis was performed by PCR and RFLP. Descriptive and comparative statistical analysis with Chi-square test were used in this study. The results demonstrated the presence of V600E mutation in 54 (70,1%) patients with cutaneous melanoma and no statistically significant association was found between the presence of mutation with other prognostics parameters such as age, gender, sun exposure, anatomic location, presence of metastasis, histological subtypes and histological parameters (Breslow thickness, presence of ulceration, signs of regression, lymphocytic infiltration and presence of satellites). Our results suggest that *BRAF* V600E mutation is a common event in melanomas and represents an important molecular target for therapeutic approaches in the treatment of this neoplasia.

Key-words: BRAF, V600E mutation, BRAF protein, cutaneous melanoma.

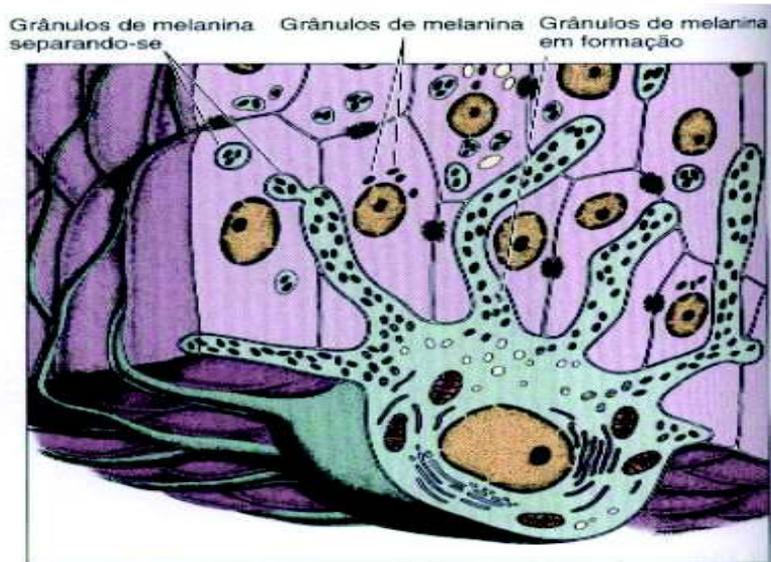
## I – INTRODUÇÃO

A palavra melanoma é originada do grego, em que *melas* significa escuro, negro e *oma* significa tumor. O melanoma pode originar-se a partir da pele normal, ou de uma lesão pigmentada, chamada nevo, mais popularmente conhecido como pinta. Inicialmente, o melanoma pode ser assintomático, mas pode causar coceira, descamação, sangramento e, se originado a partir de uma pinta, pode sofrer alteração no tamanho, formato e coloração (INCA, 2012).

O melanoma resulta de uma transformação maligna dos melanócitos, células derivadas da crista neural e produtoras de melanina (figura 1). Durante a vida embrionária, as células precursoras, conhecidas como melanoblastos, migram para a camada basal da epiderme e menos frequentemente para a derme e glândulas sebáceas e dão origem aos melanócitos (Fitzpatrick *et al.*, 2005). Os melanócitos atuam protegendo a pele das radiações UV, por transferência do pigmento que produzem aos queratinócitos (figura 2). Assim, o melanoma pode surgir dos melanócitos localizados na epiderme, derme e glândulas sebáceas e de células melanocíticas diferenciadas, chamadas de células névicas, em lesões precursoras (Ghosh *et al.*, 2009), os chamados nevos. Além da pele, o melanoma pode ocorrer no olho, meninges e trato digestivo (Fitzpatrick *et al.*, 2005).



**Figura 1:** Esquema representativo da transformação de um nevo em melanoma. A – hiperplasia melanocítica lentiginosa. B – nevo juncional lentiginoso. C – Nevo displásico (nevo com características citológicas e arquiteturais anormais). D – melanoma inicial, ou em fase de crescimento radial (células largas escuras na epiderme). E – Melanoma avançado (fase de crescimento vertical), com células malignas disseminadas pela derme e vasos sanguíneos. (Fonte: <http://peebmsp20102.blogspot.com.br/>)



**Figura 2:** Esquema representativo de um melanócito e da transferência de melanina aos queratinócitos (Fonte: Junqueira, 2004)

### I.1 - Classificação dos melanomas

O melanoma pode ser classificado em quatro padrões de crescimento principais, definidos pelas características macro e microscópicas correlacionadas com a história clínica:

- Melanoma extensivo superficial (MES)

O MES representa aproximadamente 70% de todos os melanomas, sendo o tipo mais comum do melanoma cutâneo na pele clara (Fernandes *et al.*, 2005). Geralmente, ocorre a partir de uma lesão precursora e acomete principalmente os membros inferiores nas mulheres e a porção superior do dorso nos homens, sendo mais frequentes na quarta e quinta décadas de vida e em áreas de exposição solar intermitente (Gosh *et al.*, 2009).

- Melanoma nodular (MN)

O melanoma nodular é o segundo subtipo mais comum, correspondendo a 15% dos casos. Apresenta-se mais frequentemente na meia-idade, sendo o tronco, a cabeça e o

pescoço os sítios mais comuns. É caracterizado por sua rápida evolução, com crescimento estimado de 0,49 mm de profundidade por mês (Chamberlain *et al.*, 2009).

- Melanoma do lentigo maligno (MLM)

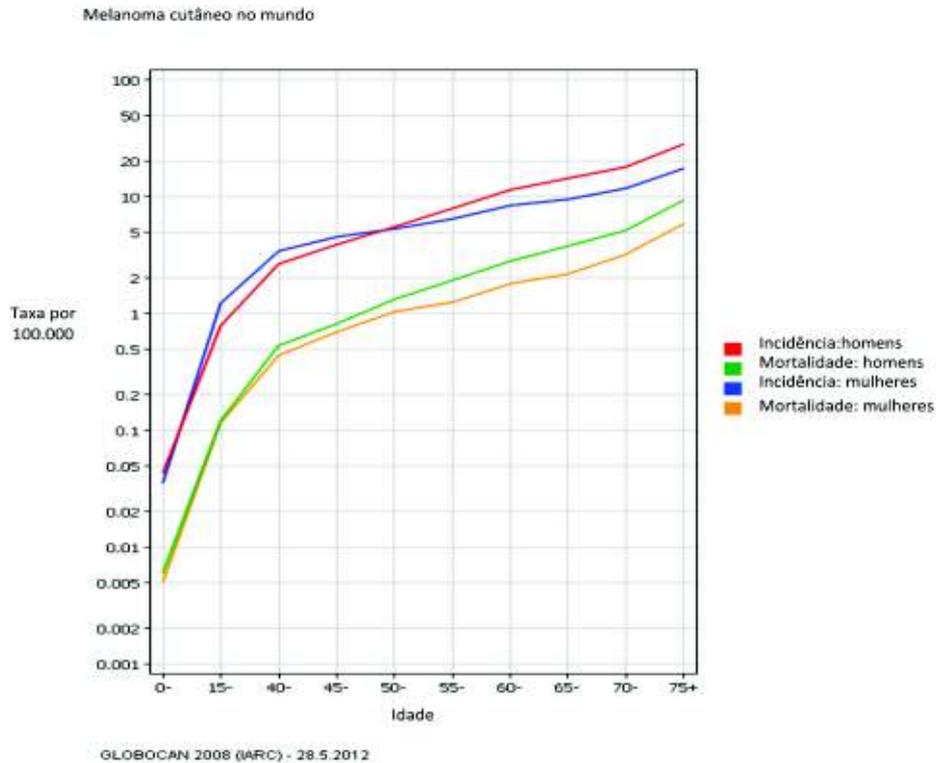
O lentigo maligno (melanoma *in situ*, tipo lentigo maligno) e sua forma respectiva invasiva, melanoma do lentigo maligno, representa 10 a 15% de todos os melanomas (Chamberlain *et al.* 2009). Localiza-se em áreas expostas ao sol e principalmente em pacientes com idade avançada (Piazza *et al.*, 2009).

- Melanoma acral lentiginoso (MAL)

O MAL é relativamente infreqüente nos indivíduos de pele clara, porém representa a forma mais comum nos indivíduos de pele escura ou asiáticos (Chamberlain *et al.*, 2009). Ocorre nas palmas, plantas, extremidades digitais, mucosas e semimucosas (Fernandes *et al.*, 2005).

## **I.2 – Epidemiologia**

A incidência mundial de melanoma, em 2008, nos homens foi de 101.807 casos, com mortalidade de 25.860 pacientes. Nas mulheres, de 97.820 novos casos e mortalidade de 20.512 pacientes (Ferlay *et al.*, 2010; Bray *et al.*, 2012). A publicação regular da Incidência de Câncer em Cinco Continentes pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) fornece uma visão comparativa da incidência mundial do melanoma e abrange o período de 1998 a 2002 (figura 3). A publicação mostra que, como no passado, a maior incidência mundial registrada para o melanoma cutâneo invasivo está em Queensland, Austrália, sendo de 55,8/100.000/ano para homens e 41,1/100.000/ano para mulheres (Ferlay *et al.*, 2010; Bray *et al.*, 2012).



**Figura 3:** Incidência e mortalidade mundiais de acordo com o sexo e faixa etária. (Fonte: Adaptado de Globocan - IARC)

Embora o câncer de pele seja o mais freqüente no Brasil e corresponda a 25% de todos os tumores malignos registrados no país, o melanoma representa apenas 4% das neoplasias malignas da pele, apesar de ser o tipo mais grave devido a sua alta capacidade de metástase (INCA, 2012). No Brasil, estima-se em 2012, 6.230 novos casos, sendo 3.170 homens e 3.060 mulheres. O número de mortes registrado, em 2009, foi de 1.392 casos, sendo 827 homens e 565 mulheres. Em Goiás, o melanoma representa o oitavo tipo de câncer mais freqüente, com estimativa de incidência em 2010 de 1,76 a 3,25 casos em 100.000 homens e 1,38 a 2,82 casos em 100.000 mulheres (INCA, 2012). Em um estudo de base populacional realizado em Goiânia, no período entre 1988 e 2000, foram registrados 290 casos novos de melanoma cutâneo, sendo 50,4% em homens e 49,6% em mulheres, com idade mediana de 54 anos (Sortino-Rachou *et al.*, 2006).

O prognóstico para pacientes com melanoma e metástases à distância é preocupante. Apesar do tratamento padrão, mais de 95% dos pacientes com melanoma estágio IV irão morrer em cinco anos e a grande parte dos pacientes irá sucumbir em um ano (Sullivan *et al.*, 2011). No Reino Unido, as taxas de incidência em homens e mulheres tem aumentado mais rapidamente do que qualquer um dos 10 principais cânceres em homens e mulheres (*Cancer Research UK Skin Cancer – UK Incidence Statistics*, 2010).

Diferentemente dos outros tipos de câncer, o melanoma cutâneo afeta indivíduos jovens, com idade média de cinquenta anos e por esta razão está entre as neoplasias mais sérias quando avaliado de acordo com número de anos de vida perdida (Ferrari Junior *et al.*, 2008). No Reino Unido, mais de duas pessoas, entre 15-34 anos, são diagnosticadas com melanoma diariamente, sendo o segundo tipo de câncer mais comum nesta faixa etária (*Cancer Research UK Skin Cancer – UK Incidence Statistics*, 2010).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, através de dados do Programa de Sobrevida, Epidemiologia e Resultados Finais (SEER), estima-se que há um milhão de sobreviventes de melanoma nos Estados Unidos em 2012, e que nos últimos 30 anos, a incidência de melanoma vem aumentando. A idade média de diagnóstico para melanoma é de 63 anos em homens e 56 anos em mulheres, e apesar da ocorrência ser rara antes dos 30 anos, o melanoma é o segundo e terceiro tipo de câncer mais comum em homens e mulheres, respectivamente, entre os 20 e 29 anos de idade. Para aqueles pacientes com tumores localizados, a taxa de sobrevivência em 5 anos é de 98,2%. Já para indivíduos com metástase regional e à distância, a taxa de sobrevivência em 5 anos é de 61,7% e 15,2%, respectivamente. Pacientes sobreviventes de melanoma são aproximadamente 9 vezes mais propensos a desenvolverem outro melanoma (Siegel *et al.*, 2012).

### I.3 - Fatores de risco

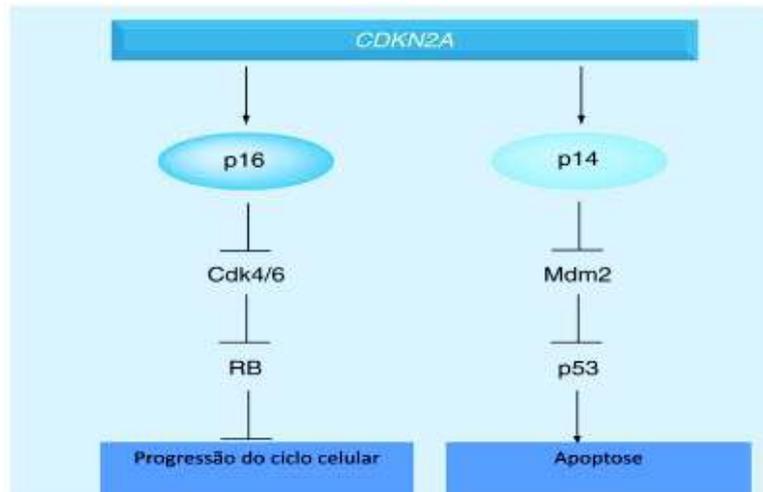
Vários fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma foram identificados, incluindo sensibilidade ao sol, pele branca, cabelos louros, olhos claros, tendência a sardas, história familiar de melanoma, nevos displásicos, aumento no número de nevos típicos, nevos congênitos grandes e imunossupressão. Em adição aos fatores ambientais, fatores genéticos influenciam no risco para melanoma. Uma história familiar de melanoma em parentes de primeiro grau está associada a um aumento do risco de 8 a 12 vezes (Rager *et al.*, 2005).

Na Austrália, em crianças com idades abaixo de 15 anos e diagnosticadas com melanoma cutâneo, os fatores de risco mais importantes foram: a presença de mais de dez nevos maiores que cinco milímetros de diâmetro, múltiplas sardas faciais e a dificuldade de se bronzear quando expostas ao sol (Whiteman *et al.*, 1997).

#### Fatores de risco genéticos

Oito estudos casos-controles na população branca foram analisados em uma meta-análise, incluindo 2.952 pacientes com melanoma e 3.618 pacientes controles. O risco de desenvolver melanoma foi 2,24 vezes maior naqueles que relataram pelo menos um parente de primeiro grau afetado e o efeito da história familiar foi independente da idade, do número de nevos, da cor dos olhos e cabelo, e da presença de sardas (Ford *et al.*, 2005). O melanoma familiar está associado com a alteração no cromossomo 9p21, onde se localiza o gene *CDKN2A* (Hussussian *et al.*, 1994)

O gene *CDKN2A* codifica duas proteínas distintas: INK4A ou p16<sup>INK4a</sup> e ARF ou p14<sup>ARF</sup>. A molécula p16<sup>INK4a</sup> inibe as quinases dependentes de ciclina (CDKs) 4/6, que por sua vez, inativam a proteína retinoblastoma (RB), permitindo o início da fase S do ciclo celular (figura 4). Assim, quando há perda de função da proteína p16<sup>INK4a</sup>, ocorre uma inativação da molécula RB e progressão constante do ciclo celular. Já a proteína p14<sup>ARF</sup> está relacionada com a degradação da proteína p53. Com a perda de p14<sup>ARF</sup>, há uma inativação da proteína p53 (Chin *et al.*, 2006).



**Figura 4:** Esquema demonstrando a função das proteínas p16 e p14 (Fonte: adaptado de Gosh *et al.*, 2009).

Alguns autores incluem ainda a importância do gene *MC1R* no melanoma cutâneo. Este gene é responsável por codificar um receptor transmembranar de melanocortina, hormônio relacionado a pigmentação da pele e que atua no melanócito, célula alvo do melanoma (Whiteman *et al.*, 2005). Algumas variantes deste gene seriam responsáveis por aumentar o risco de desenvolver melanoma em pacientes com a pele mais escura, característica normalmente considerada como um fator protetor (Palmer *et al.*, 2000).

#### **Fatores de risco fenotípicos**

Nos Estados Unidos foi realizado um estudo com seguimento de 152.949 mulheres e 25.204 homens durante 14 anos. Desses, 511 desenvolveram melanoma cutâneo invasivo, com algumas associações importantes. Os homens demonstraram um risco maior de desenvolver melanoma na cabeça, pescoço e tronco do que as mulheres; o antecedente de queimaduras solares graves e dolorosas mostrou-se mais relacionada com melanoma em extremidades superiores; indivíduos com mais de 10 queimaduras possuíram risco 6,86 vezes maior de desenvolver melanoma do que os pacientes sem queimadura; o número de nevos estava mais relacionado com melanomas em tronco; o risco relativo do paciente com mais de 10 nevos foi 4,67 vezes maior em desenvolver melanoma do que o paciente sem nevos (Cho *et al.*, 2005).

## **Exposição natural às radiações ultravioletas e o risco para melanoma**

A exposição às radiações ultravioleta (UV) criam um ambiente bioquímico chamado de queimadura solar. A exposição intermitente intensa na infância e puberdade, com formação de bolhas pela queimadura, é um fator de risco para o melanoma e o carcinoma basocelular, enquanto que a exposição crônica, cumulativa, está mais relacionada ao carcinoma escamocelular. Apesar das evidências, ainda não há um estudo relacionando o gene alterado, as radiações ultravioletas e o melanoma (Jou *et al.*, 2012), ou seja, os genes relacionados ao melanoma mais frequentemente alterados pela exposição às radiações UV não são conhecidos.

Parece haver também uma associação entre exposição crônica às radiações UV e o tipo de melanoma desenvolvido subsequentemente. O subtipo histológico lentigo maligno, encontrado mais comumente em sítios do corpo de exposição constante, como a face, está mais associado com uma exposição crônica ocupacional do que com episódios de exposição intermitentes (MacKie *et al.*, 2009). Whiteman *et al.* compararam os locais anatômicos de incidência de melanoma, sinais clínicos de exposição solar (ceratoses solares) e presença de nevos. Duas vias distintas foram sugeridas para a iniciação do melanoma, que dariam origem a desfechos clínicos diferentes. A primeira via envolve exposição intermitente intensa no tronco de indivíduos que possuem um número grande de nevos banais e tem um melanoma diagnosticado em idade relativamente precoce. A segunda via, provavelmente mais relacionada com a exposição crônica às radiações UV, encontra-se em indivíduos mais velhos que podem ter uma história passada de câncer de pele não-melanoma. Estes melanomas desenvolvem-se a partir do dano solar, em sítios expostos constantemente (Whiteman *et al.*, 2003).

A suscetibilidade à radiação ultravioleta B (UVB) é determinada geneticamente e está ligada a sensibilidade de contato. Os grupos UVB resistentes e UVB suscetíveis são determinados através de um hapteno sensibilizante (difenciprone) aplicado em uma área da pele previamente irradiada. Os indivíduos que não reagem à exposição do hapteno após sensibilização prévia, são considerados UVB suscetíveis, enquanto os pacientes que respondem com vigorosa reação de hipersensibilidade são considerados UVB resistentes (Nasser, 2010). Em outro estudo, realizado no Brasil, comparando a

suscetibilidade UVB em indivíduos portadores de melanoma maligno e pacientes controle, demonstrou-se que 81,5% dos pacientes com melanoma eram UVB suscetíveis e que pessoas UVB suscetíveis tem 9,7 vezes maior risco de desenvolver melanoma do que a população em geral. Concluiu-se então que a suscetibilidade ao UVB pode ser considerada um fator de risco para o desenvolvimento do melanoma maligno (Nasser, 2010).

Na Suécia, os Registros de Câncer do país, no período de 1960 a 2004, descreveram 46.337 casos de melanomas malignos em 44.623 pacientes. O estudo conclui que, neste período, a incidência de melanoma aumentou principalmente nos membros superiores (885% em homens e 1216% em mulheres), tronco (729% em homens e 759% em mulheres) e membros inferiores (418% em homens e 289% em mulheres). Além disso, a incidência de melanomas no tronco e membros inferiores foi maior nos pacientes abaixo de 70 anos enquanto os tumores na cabeça tiveram incidência maior em pacientes acima de 70 anos. Os melanomas do tronco tiveram uma proporção maior crescente em todos os períodos estudados, particularmente em mulheres. As justificativas para essas mudanças, de acordo com o artigo, seriam a mudança da população, neste período, da área rural para a urbana, mudando o tipo de exposição solar, de contínua para intermitente; o aparecimento de câmaras de bronzeamento artificial e o aumento de atividades recreativas, com bronzeamento intencional, ocorrendo exposição solar intermitente, principalmente na população jovem (Dal *et al.*, 2007).

#### **I.4 - Estadiamento do melanoma**

Para entender os fatores prognósticos do melanoma e as indicações de tratamento, é necessário saber como seu estadiamento é realizado. O estadiamento do melanoma, realizado pelo AJCC (*American Joint Committee on Cancer*), foi atualizado pela última vez em 2010. Leva-se em conta na categoria T, a espessura do tumor (índice de Breslow) e se há ulceração. Já na categoria N, considera-se o comprometimento de linfonodos regionais e na categoria M, as metástases à distância (Gershenwald *et al.*, 2010), conforme esquematizado abaixo, adaptado do AJCC (2012):

## Categorias T

T0	Não há evidência de câncer
TX	O tumor não pode ser avaliado.
Tis	Melanoma <i>in situ</i> (células malignas apenas na epiderme) O tumor primário é de apenas 1,0mm:
T1	<ul style="list-style-type: none"><li>■ T1a – o tumor primário não tem ulceração e tem taxa mitótica menor que 1 mm<sup>2</sup></li><li>■ T1b – o tumor primário tem ulceração e taxa mitótica maior ou igual a 1 mm<sup>2</sup></li></ul>
T2	O tamanho do tumor primário está entre 1,0 mm e 2,0 mm: <ul style="list-style-type: none"><li>■ T2a - O tumor primário não tem ulceração.</li><li>■ T2b - O tumor primário tem ulceração.</li></ul>
T3	O tamanho do tumor primário está entre 2,0 mm e 4,0 mm: <ul style="list-style-type: none"><li>■ T3a - O tumor primário não tem ulceração.</li><li>■ T3b - O tumor primário tem ulceração.</li></ul>
T4	O tumor primário é maior que 4,0 mm: <ul style="list-style-type: none"><li>■ T4a - O tumor primário não tem ulceração.</li><li>■ T4b - O tumor primário tem ulceração.</li></ul>

## Categorias N

NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Sem metástase em linfonodos regionais
N1	O câncer se espalhou para um linfonodo: <ul style="list-style-type: none"><li>■ N1a –Micrometástase*.</li><li>■ N1b –Macrometástase**.</li></ul>
N2	O câncer se espalhou para dois ou três linfonodos: <ul style="list-style-type: none"><li>■ N2a –Micrometástase*.</li><li>■ N2b –Macrometástase**.</li></ul> <p>N2c - Metástases em trânsito</p>
N3	Qualquer uma das seguintes condições: <ul style="list-style-type: none"><li>■ O câncer espalhou-se para 4 ou mais linfonodos.</li><li>■ Dois ou mais linfonodos aparecem comprometidos.</li><li>■ Metástases em trânsito, com qualquer número de linfonodos comprometidos</li></ul>

\*Micrometástases são diagnosticadas após a biópsia do linfonodo sentinela ou linfadectomia (quando realizada).

\*\*Macrometástases são definidas como clinicamente evidentes e confirmadas após a linfadectomia terapêutica ou quando a metástase apresenta extravasamento extra-capsular macroscópico.

## **Categorias M**

<b>MX</b>	Metástase à distância não pode ser avaliada
<b>M0</b>	Sem metástase à distância
<b>M1a</b>	Metástase para a pele, subcutâneo ou linfonodos distantes
<b>M1b</b>	Metástase para o pulmão
<b>M1c</b>	Metástase para demais vísceras ou metástases a distância de qualquer sítio combinado com DHL (desidrogenase láctica) elevada

## Fases do Agrupamento do Melanoma

Estágio 0	Melanoma <i>in situ</i> .
Estágio IA	Melanoma de 1,0 mm ou menor, sem ulceração, e taxa mitótica de menos de 1/mm <sup>2</sup>
Estágio IB	Descreve uma das seguintes situações: Melanoma até 1 mm com ulceração ou taxa mitótica maior ou igual a 1/mm <sup>2</sup> Melanoma entre 1 mm e 2 mm sem ulceração
Estágio IIA	Descreve uma das seguintes condições: Melanoma entre 1,0 mm e 2,0 mm com ulceração Melanoma entre 2,0 mm e 4,0 mm sem ulceração
Estágio IIB	Descreve uma das seguintes condições: Melanoma entre 2,0 mm e 4,0 mm com ulceração Melanoma maior do que 4,0 mm sem ulceração
Estágio IIC	Melanoma maior que 4,0 mm e tem ulceração
Estágio III	Melanoma de qualquer tamanho, que disseminou para um ou mais linfonodos regionais ou que se encontre em trânsito, sem metástase para outros órgãos
Estágio IIIA	Melanoma primário sem ulceração, com metástase para até três linfonodos sob a forma de micrometástases
Estágio IIIB	Descreve qualquer uma destas condições: Melanoma sem ulceração com metástase para até três linfonodos regionais sob a forma de macrometástase Melanoma com ulceração, com metástase para até três linfonodos regionais, mas ainda é microscópico Existe doença em trânsito sem envolvimento dos linfonodos regionais
Estágio IIIC	Descreve qualquer uma destas condições: Melanoma com ulceração, com metástase para até três linfonodos regionais, e apresentam macrometástase Melanoma com metástase para quatro ou mais linfonodos regionais Melanoma em trânsito, com metástase para qualquer um dos gânglios linfáticos
Estágio IV	Melanoma primário com metástase para outras partes distantes do corpo, além dos gânglios linfáticos regionais, independentemente do tamanho do tumor

## **I.5 - Fatores prognósticos**

Os fatores prognósticos são aqueles que podem interferir na evolução da doença do paciente, independente do tratamento. De acordo com dados do AJCC, incluindo informações de 10.233 pacientes com melanoma nos estágios I e II, os fatores independentes preditivos de sobrevivência, em ordem de significância estatística são: espessura do tumor, índice mitótico, idade do paciente, ulceração, sítio anatômico e gênero. O nível de invasão de Clark não é considerado um fator independente de sobrevivência (Thompson *et al.*, 2011).

### **Espessura do tumor primário**

O índice de Breslow determina a espessura tumoral, medida verticalmente entre o ponto mais profundo de invasão ao topo da camada granulosa ou a célula mais superficial, em caso de ulceração (Fernandes *et al.*, 2005). A última atualização do AJCC com relação aos melanomas confirmou o significado prognóstico do índice de Breslow, com a taxa de sobrevida de 10 anos de 92% em pacientes com melanoma T1 ( $\leq 1,00\text{mm}$ ) e de 50% em pacientes com melanoma T4 ( $\geq 4,01\text{mm}$ ) (Balch *et al.*, 2009).

### **Atividade mitótica**

Para quantificar o número de mitoses é necessário que o patologista encontre o *hot spot*, área na derme onde se encontra o maior número de mitoses. Contam-se as mitoses desta área e campos adjacentes até atingir  $1\text{mm}^2$  de área (Thompson *et al.*, 2011). A proliferação do melanoma, definida pela taxa de mitoses, é um preditor independente e poderoso de sobrevida (Spatz *et al.*, 2010). Essa conclusão foi obtida a partir de estudos como o realizado por Azzola *et al.* (2003), em Sidney, Austrália, com 3.661 pacientes, em que pacientes com 0 mitoses/ $\text{mm}^2$  tiveram uma taxa de sobrevida superior do que aqueles com uma mitose/ $\text{mm}^2$ . No estudo realizado por Thompson *et al.* (2011), 93% dos pacientes que apresentaram tumores com índice mitótico de 0 mitose/ $\text{mm}^2$  tiveram uma taxa de sobrevivência de 93%, enquanto pacientes com mais de 20 mitoses/ $\text{mm}^2$ , tiveram uma taxa de sobrevivência de 48%.

Dados do AJCC demonstraram uma correlação importante entre o aumento do índice mitótico e a diminuição da taxa de sobrevivência. Em uma análise multivariada

com 10.233 pacientes, o índice mitótico foi o segundo preditor de sobrevivência mais importante, atrás apenas do Índice de Breslow. Por isso o Comitê de Estadiamento do Melanoma do AJCC recomendou a substituição do nível de Clark pelo índice mitótico, como critério para definição do estágio T1b do melanoma (Balch *et al.*, 2009).

### **Idade**

A idade dos pacientes é demonstrada como um fator prognóstico independente, relacionado com a taxa de sobrevivência. Ocorre uma diminuição da taxa de sobrevivência de acordo com o aumento das décadas de vida do paciente. Uma justificativa possível seria a diminuição dos mecanismos de defesa do paciente associada com a idade avançada (Balch *et al.*, 2001).

### **Ulceração do melanoma primário**

A ulceração é definida histologicamente como a ausência da epiderme intacta sobreposta a uma parcela significativa do tumor primário (Homsí *et al.*, 2005). Assim, as taxas de sobrevivência dos pacientes com melanoma ulcerado são mais baixas do que dos melanomas não-ulcerados de categoria T equivalente, mas são muito semelhantes as dos pacientes com melanoma não-ulcerado da categoria T próxima mais alta. Por exemplo, a sobrevida em cinco anos é de 79% para um melanoma T3a e de 82% para um melanoma ulcerado T2b. Um melanoma não ulcerado T4a tem sobrevida de cinco anos de 71%, similar a um melanoma ulcerado T3b, com taxa de 68% (Balch *et al.*, 2009).

O fato da presença de ulceração ser uma variável de substituição de um evento biológico, ao invés de um fator direto causal de evolução metastática, está ilustrado na taxa de sobrevivência de cinco anos em pacientes estágio III com macrometástases de melanoma em 4 linfonodos ou mais (N3). Em pacientes N3, sem ulceração no tumor primário, a taxa de sobrevivência em cinco anos é de 45,4%, contra 29,2%, em pacientes N3 com melanoma ulcerado. Portanto, mesmo nesta subpopulação com carga tumoral elevada, o status de ulceração em tumor primário mantém um valor extraordinariamente elevado no prognóstico (Spatz *et al.*, 2010). Além disso, metástases linfonodais de melanomas primários ulcerados estão associadas com uma maior capacidade de metástases a distância do que melanomas não ulcerados (Balch *et al.*, 2001).

O significado biológico da ulceração do melanoma ainda é controverso. Há duas explicações possíveis para o valor prognóstico desfavorável da ulceração do melanoma: a ulceração ser um substituto de um atributo biológico intrínseco do tumor ou do hospedeiro, que favorece a disseminação; ou a ulceração favorece diretamente a disseminação do tumor, por exemplo, modificando o ambiente local. A proliferação do tumor nas proximidades da epiderme pode destruir por contato e, portanto, favorecer a expansão do tumor (Spatz *et al.*, 2010).

### **Localização do tumor**

Na ausência de doença metastática, e para todos os tumores com a mesma espessura, a taxa de sobrevivência em 10 anos foi de 90% nos melanomas primários de extremidades, comparado com 70% quando observado em tronco, cabeça ou pescoço (Schuchter *et al.*, 1996). Callender *et al.*, chegaram a mesma conclusão: melanomas primários em tronco, cabeça e pescoço tiveram pior prognóstico do que em outras localizações anatômicas.

### **Gênero**

O efeito do gênero na sobrevivência é um mistério não resolvido no campo do melanoma. O sexo masculino está associado com um resultado adverso que persiste mesmo após ajuste para outras variáveis prognósticas. Após o ajuste para a idade, período de diagnóstico, sítio anatômico, índice de Breslow, envolvimento de linfonodo e condição de metástase, o risco relativo de excesso para pacientes homens morrerem de melanoma é de 1,9 (de Vries *et al.*, 2008). O impacto do gênero no risco de mortalidade é observado em todas as fases. Não há explicação biológica identificada até agora. Em particular, é difícil evocar uma influência hormonal, já que as estimativas de risco ajustadas são semelhantes entre os pacientes abaixo de 45 ou acima de 60 anos de idade. (de Vries *et al.*, 2008).

Uma metanálise realizada com dados obtidos de centros de tratamentos em todo o mundo mostrou que mulheres possuem uma taxa de sobrevivência estatisticamente maior do que os homens. Mulheres possuem melanomas em sítios favoráveis, são mais finos, menos ulcerados e são diagnosticados em estágios mais iniciais (Balch *et al.*, 1992).

### **Envolvimento linfonodal**

Em uma análise feita em 2001 pelo AJCC, 49% de todos os pacientes com metástase em linfonodo sobreviveram cinco anos e 37% sobreviveram 10 anos (Balch *et al.*, 2001). O envolvimento linfonodal, definido empiricamente no sistema de estadiamento do AJCC em metástases microscópicas e macroscópicas, foi o segundo fator prognóstico mais importante em pacientes com doença em estágio III, de acordo com os dados analisados pelo AJCC (Dickson *et al.*, 2011)

### **Nível de Clark**

O nível de Clark tem sido usado para descrever o envolvimento anatômico do tumor dentro das estruturas cutâneas e subcutâneas. O nível I representa crescimento intraepidérmico, com membrana basal intacta. No nível II, há invasão da derme papilar, no nível III, o tumor preenche a derme papilar e envolve a junção entre derme papilar e reticular, no nível VI, há invasão da derme reticular, e no nível V, as células tumorais estão presentes na gordura subcutânea (Homsí *et al.*, 2005).

Comparados com o índice de Breslow, os níveis de Clark são menos reprodutíveis, mais dependentes do operador e com valor preditivo menor. Além disso, seu significado prognóstico é limitado em pacientes com tumores muito finos, de acordo com o sistema de estadiamento do AJCC (Göppner *et al.*, 2011). Em um trabalho que comparou os laudos entre patologistas gerais e especializados em melanoma, houve uma concordância alta quanto ao índice de Breslow e ulceração, mas uma concordância baixa quanto aos estágios IB e IIB na classificação de Clark (aproximadamente 25% dos casos) (Murali *et al.*, 2009).

### **Infiltração linfocitária**

No melanoma, os linfócitos infiltrados no tumor (TILs) são responsáveis pela morte das células tumorais e podem induzir a regressão espontânea. TILs ativos são visualizados na fase de crescimento vertical do melanoma e representam um fator prognóstico forte, apesar de não serem independentes, associados a uma sobrevivência superior (Spatz *et al.*, 2010).

Em um estudo com 1.171 pacientes portadores de melanoma em fase de crescimento vertical, com seguimento de pelo menos três anos, foi investigado com

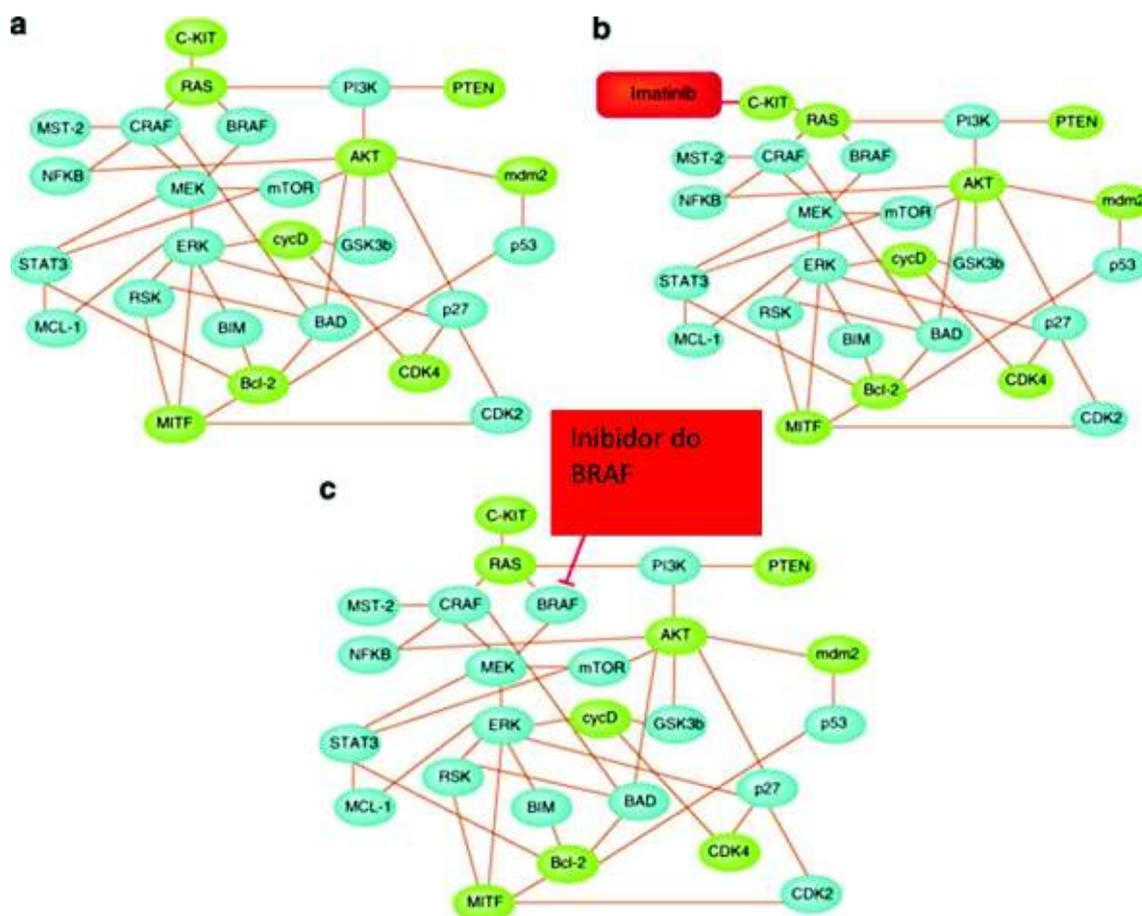
mais detalhes os padrões dos TILs, baseado na topografia e intensidade. Concluiu-se que a infiltração linfocitária é um fator importante e identifica pacientes com bom prognóstico. É provável que exista uma pequena população de pacientes “super-respondedores”, nos quais o tumor é caracterizado por um infiltrado TIL denso e contínuo e que não apresentam sinais de progressão do tumor (Spatz *et al.*, 2007).

### **Metástase à distância**

O tempo de sobrevivência médio de 1.521 pacientes tratados com melanoma e metástases à distância foi de 7,5 meses e a taxa estimada de sobrevivência em 5 anos desses pacientes foi de 6% (Barth *et al.*, 1995). Baseado em análises mais recentes, pacientes com metástases para pele distantes, tecido subcutâneo e/ou linfonodo (M1a), possuem as mais altas taxas de sobrevivência em um ano (62%) entre os pacientes no estágio IV. Pacientes com metástases pulmonares (M1b) possuem prognóstico intermediário (sobrevivência em um ano de 53%) enquanto pacientes com metástases viscerais não-pulmonares e/ou aumento sérico de DHL (M1c) tem o pior prognóstico (média de 33% de sobrevivência em um ano) (Dickson *et al.*, 2011).

## **I.6 - Aspectos genéticos do melanoma**

A compreensão da origem e evolução do melanoma necessariamente passa pelo estudo dos mecanismos genéticos envolvidos na oncogênese dos melanócitos. A interação entre várias moléculas sinalizadoras envolvendo a progressão do melanoma pode ser vista como uma série de ligações conectadas entre si, sendo que algumas dessas conexões possuem um número maior de ligações. Uma característica dessas redes é a robustez, o que significa que a remoção de uma conexão da rede não irá prejudicar sua função. Em termos de terapia para o melanoma, isso significa que atacar a rede em uma conexão (por exemplo, inibindo MEK) é improvável que o sistema falhe, uma vez que haverá outras conexões da rede, permitindo que a célula contorne o local de ataque. Assim, atacando a rede em conexões com maior número de ligações, pode-se levar à falha do sistema (figura 5) (Smalley *et al.*, 2010) e dessa forma, estabelecer uma terapia alvo dirigida mais eficiente para o melanoma.



**Figura 5:** Esquema ilustrativo da rede de conexões da via MAPK e da atuação de alguns medicamentos no melanoma (Fonte: adaptado de Smalley *et al.*, 2010)

Uma grande quantidade de pesquisa básica, na última década, mudou o entendimento molecular do melanoma. A identificação de mutações genômicas específicas, como no gene *BRAF*, pôde não só demonstrar uma relação causal com a progressão da doença, mas também dar origem a novas terapias altamente eficazes voltadas especificamente para essas moléculas mutadas. Enquanto as várias etapas da carcinogênese do melanoma ainda são muito pouco compreendidas na sua complexidade, a fim de prever quando, como e que tipo de mutação origina um tumor invasivo ou metastático, a análise genética dos tumores primários ou metastáticos, sem dúvida, irá mudar as classificações futuras e subsequentemente os algoritmos de tratamento (Göppner *et al.*, 2011).

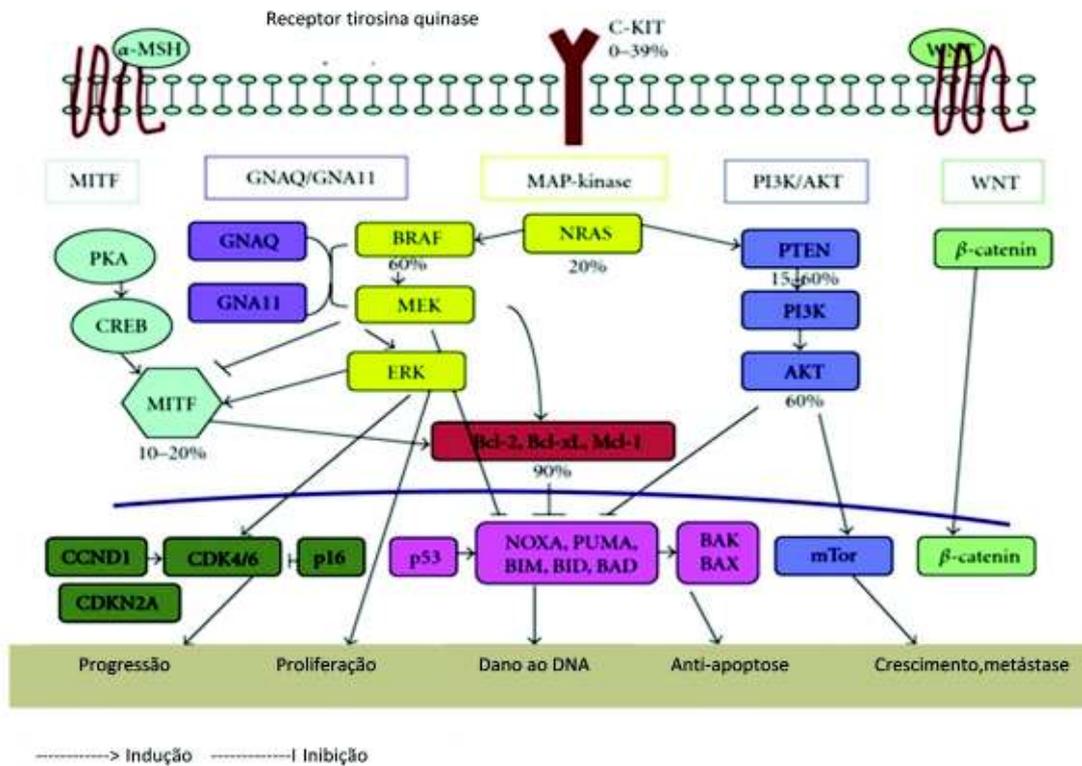
O evento primário na transformação melanocítica pode ser considerado como uma mudança, que ocorre como resultado secundário, de alguma ativação oncogênica, seja ela genética, incluindo mutação gênica, deleção, amplificação ou translocação, ou de eventos epigenéticos, como alterações herdadas que não sejam na sequência do DNA, geralmente na modulação da transcrição pela metilação do DNA e/ou por alterações na cromatina, como modificações nas histonas. O resultado dessas mudanças pode ser a geração de um clone melanocítico com vantagem de crescimento sobre as células adjacentes (Palmieri *et al.*, 2009).

### **I.6-1 - A via MAPK**

A via da MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno, é uma cascata de sinais de transdução dirigida por fosforilação e que acopla respostas intracelulares aos fatores de crescimento e seus respectivos receptores de superfície celular. Essa via regula vários processos, incluindo a proliferação, a diferenciação celular, a apoptose e muitas vezes está desregulada em uma variedade de cânceres (Vidwans *et al.*, 2011).

A via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) é importante nas células para a transdução de sinais extracelulares ao núcleo, permitindo a produção de uma resposta celular apropriada. Os componentes principais dessas vias são uma proteína G pequena (RAS) e três quinases: RAF, MEK e ERK, sendo que a via de ativação ocorre nesta ordem (figura 6) (Rushworth *et al.*, 2006). A via é ativada por vários receptores, incluindo c-KIT, receptor FGF e c-MET (Ghosh *et al.*, 2009). As proteínas RAF são ativadas pelo RAS, uma GTPase pequena que reside na membrana celular e se torna ativada em resposta a uma variedade grande de mitógenos. A ligação de RAF com RAS causa a translocação de RAF do citosol para a membrana celular onde a ativação ocorre. O RAF ativado pode então fosforilar as quinases MEK1 e MEK2, as quais ativam ERK (Rushworth *et al.*, 2006). Por sua vez, isto leva a fosforilação da família de proteínas específicas - de transformação eritroblástica, ativação do fator de transcrição nuclear, expressão de reguladores do ciclo celular, como

a ciclina D, conduzindo finalmente à progressão do ciclo celular e regulação da diferenciação celular, senescência, apoptose ou sobrevivência (Lemech *et al.*, 2012).



**Figura 6:** Esquema representativo da via da MAPK (Fonte: adaptado de Goppner *et al.*, 2011).

A interação entre um receptor de fator de crescimento e seu ligante induz tipicamente uma série de eventos que promovem o crescimento celular e sua sobrevivência. Nos melanócitos, a via MAPK é ativada por fatores de crescimento liberados do microambiente local, como fatores de células pluripotentes, hormônio estimulador  $\alpha$ -melanocítico, fator de crescimento hepatocitário. Em condições fisiológicas, esses fatores de crescimento apenas induzem uma estimulação fraca da via MAPK, insuficiente para induzir uma proliferação melanocítica (Smalley *et al.*, 2010).

O RAS ativado também desencadeia a ativação da via MAPK, por meio de interações com as oncoproteínas RAF (BRAF e CRAF), levando ao início da cascata de sinalização. Essa via pode ser iniciada por qualquer isoforma RAF, BRAF ou CRAF. Interessante é que diferentemente de CRAF, BRAF ativado não tem outros substratos

conhecidos. Assim, melanomas com BRAF mutante sinalizam exclusivamente através de MEK e subsequentemente ERK, levando à oncogênese. Essa característica clínica importante torna esses tumores sensíveis aos inibidores potentes da MAPK (Sullivan *et al.*, 2011).

### I.6-2 - O gene *BRAF*

Em 1983, Ulf Rapp relatou a clonagem de um vírus de transformação aguda associado ao sarcoma murino (3611-MSV) e a caracterização do seu respectivo oncogene, chamado de *v-raf* (para fibrosarcoma de crescimento rápido) (Baccarini, 2005).

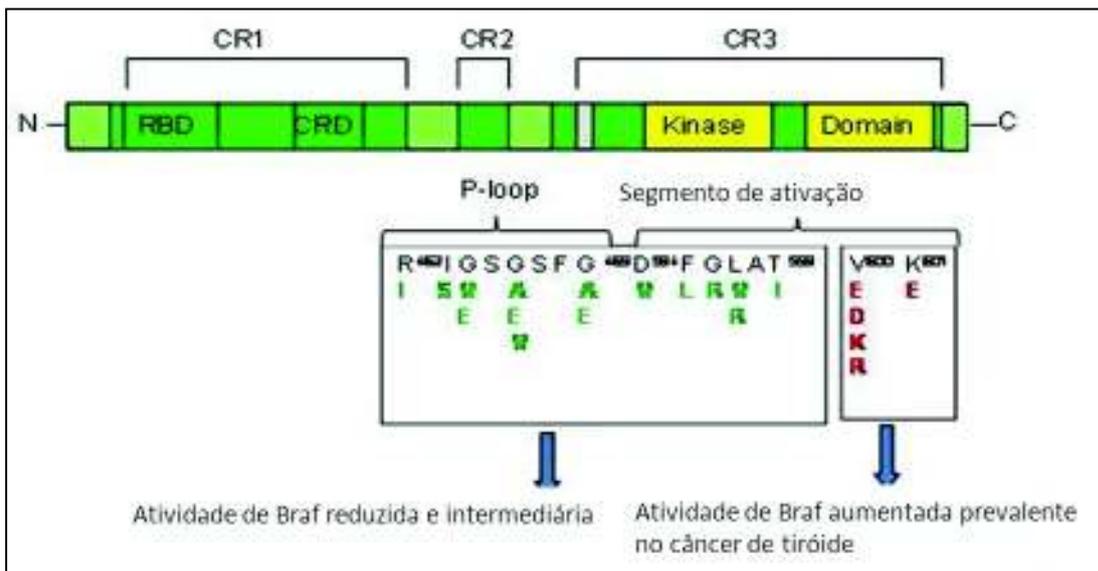
O gene *BRAF* (7q34) (figura 7), cujo nome oficial é homólogo B1 do oncogene viral do sarcoma murino *v-raf*, codifica a proteína RAF tipo B. Ele está localizado no braço (q) longo do cromossomo 7, região 3, banda 4, é composto por 17 íntrons e 18 exons abrangendo uma região de 190.284 pb e codifica uma serina/treonina quinase, sendo caracterizado como o gene mutado mais comum no melanoma, pois a mutação é observada em 40-70% dos melanomas (Davies *et al.*, 2002).



**Figura 7:** Localização cromossômica do gene *BRAF* (Fonte: site [www.genome.ucsc.edu](http://www.genome.ucsc.edu))

### I.6-3 - A proteína BRAF

A proteína BRAF tem 766 aminoácidos e peso molecular de 84.436 daltons, com localização no citoplasma celular (figura 8). A família RAF quinase compreende 3 isoformas, que se diferenciam no perfil de expressão, regulação e habilidade de funcionar no contexto da cascata da quinase (ERK) regulada extracelularmente. Todas as três RAF quinases compartilham uma estrutura comum que abrange três regiões conservadas: CR1, contendo dois sítios de ligação RAS com domínio RAS-ligante (RBD), e um domínio rico em cisteína (CRD); CR2, rico em resíduos de Ser/Thr; e CR3, representando no final da molécula, o domínio quinase (Baccarini *et al.*, 2005).



**Figura 8:** Esquema representativo da proteína BRAF com seus domínios funcionais e as mutações mais comuns (Fonte: adaptado de Brzezianska *et al.*, 2011)

### I.6-4 - A mutação no gene *BRAF V600E* no melanoma

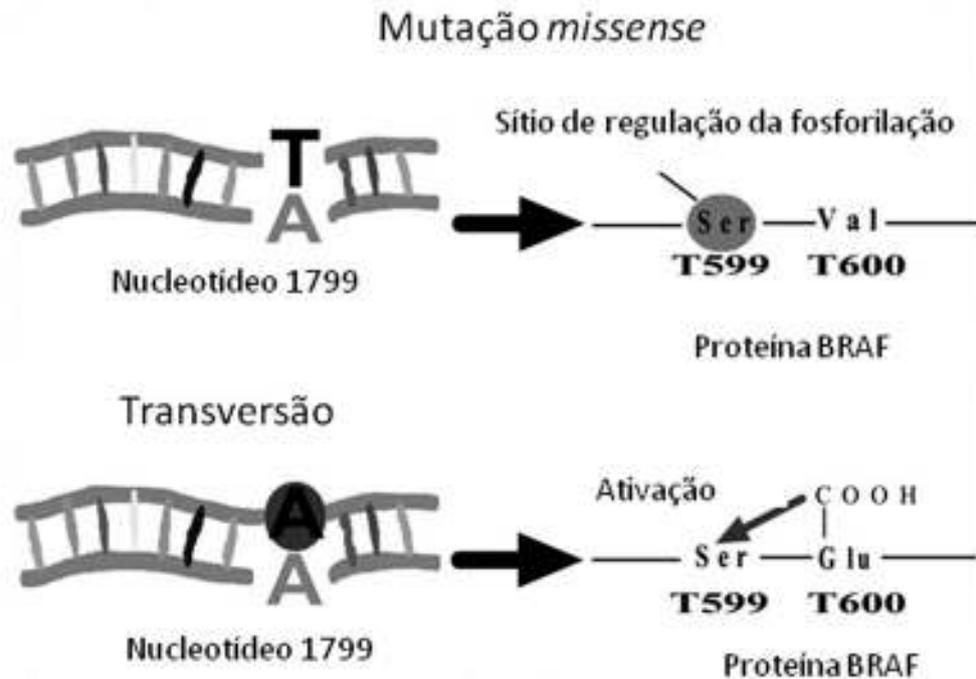
As mutações somáticas no gene BRAF são encontradas em vários tipos de cânceres humanos, mas chegam a porcentagem de 70% (tabela 1) nos melanomas

malignos (Lee *et al.*, 2011). A mutação mais frequente envolve a mudança da valina por ácido glutâmico no códom 600 (GTG por GAG, conhecido como V600E). Esta substituição compreende 80% das mutações descritas no gene *BRAF* (Davies *et al.*, 2002). A mutação no *hotspot* V600E afeta o exon 15 do *BRAF* (Nucera *et al.*, 2010) e leva a sua ativação constitutiva, dispensando a necessidade de ativação pelo NRAS e ATP. Além disso, a proteína mutante é 10 vezes mais ativa que a *BRAF* selvagem. Somados, esses dados indicam a importância de *BRAF* como alvo terapêutico no melanoma (Vidwans *et al.*, 2011).

<b>Gene</b>	<b>Porcentagem de mutação</b>
<i>BRAF</i>	70%
<i>MITF</i>	20%
<i>NRAS</i>	15%
<i>FGFR</i>	15%
<i>p16</i>	50-70%
<i>PTEN</i>	45%
<i>APAF-1</i>	40%
<i>p53</i>	15%

**Tabela 1:** Genes comumente mutados no melanoma (Fonte: adaptado de Flaherty, 2006).

A mutação V600E mimetiza a fosforilação de ativação do segmento do *BRAF* (figura 9), por meio da inserção de um resíduo carregado negativamente, adjacente a um sítio de fosforilação ativado na Ser-599, causando a ruptura de interações hidrofóbicas entre resíduos no local da ligação do ATP, que mantinham a conformação inativa, mantendo o gene *BRAF* ativo constitutivamente (Xing *et al.*, 2005).



**Figura 9:** Esquema representativo da mutação V600E do gene *BRAF* (Fonte: adaptado de Wojciechowska *et al.*, 2006)

### I.6-5 - Implicações clínicas das mutações de *BRAF* em melanoma

A mutação de *BRAF* ocorre mais frequentemente em sítios anatômicos de exposição solar intermitente (por exemplo, o tronco) e em sítios sem dano crônico induzido pelo sol (Curtin *et al.*, 2005). Além disso, em melanomas primários, o estado de *BRAF* mutante tem sido associado com indivíduos jovens (idade menor que 50 anos), subtipo histológico (melanoma extensivo superficial e nodular) e presença de mitoses (Long *et al.*, 2011). Dados recentes em pacientes com doença avançada demonstram que taxas da mutação *BRAF* maiores do que 80% ocorrem naqueles com menos de 40 anos (Menzies *et al.*, 2011). Outros fatores associados à esta mutação incluem poucos marcadores de exposição solar crônica na pele adjacente, altas contagens de nevos corporais, grande exposição solar na infância e melanomas pigmentados (Liu *et al.*, 2007). Pacientes com melanoma metastático e mutação no gene *BRAF* também parecem ter sobrevida menor (Long *et al.*, 2011).

Em um estudo realizado nos Estados Unidos, com 115 espécimes de melanoma, a mutação no gene BRAF foi encontrada em 54% dos indivíduos com exposição solar não crônica, enquanto que apenas 8% foi encontrada em pele com exposição solar crônica, 15% em pele gabra e 10% em melanomas de mucosa, favorecendo a relação entre exposição solar intermitente e a mutação no gene BRAF e a hipótese de que diferentes tipos histológicos e de exposição solar influenciam na via genética de desenvolvimento do melanoma (Maldonado *et al.*, 2003).

Outro estudo também realizado nos EUA, com 24 nevos, 20 melanomas em crescimento radial (estágio inicial), 8 melanomas em crescimento vertical e 13 melanomas metastáticos, observou-se que as frequências de mutação no gene *BRAF* em nevos, melanomas em crescimento vertical e metastáticos variaram de 62 a 71%, enquanto melanomas em crescimento radial apresentaram uma frequência de apenas 10% na análise. Esses dados favorecem a hipótese de que mutações no gene *BRAF* estão envolvidas na progressão do tumor e não na fase de iniciação. Além disso, a alta frequência da mutação nos nevos sugere que essa mutação não contribui para a transformação desses nevos em melanoma (Dong *et al.*, 2003).

Em uma meta-análise, reunindo estudos publicados entre 1989 e 2010 sobre a frequência de mutação no gene *BRAF*, não foi demonstrada associações entre a mutação de *BRAF* e o gênero, mas houve associação entre a presença de tal mutação com o subtipo histológico extensivo superficial e locais anatômicos que não havia exposição solar crônica (Lee *et al.*, 2011).

**Tabela 2:** Revisão dos estudos da literatura que investigaram a mutação V600E do gene *BRAF* em melanomas

Autores/ano	Número total de pacientes estudados/Local do estudo	Frequência da mutação V600E do gene <i>BRAF</i>
Davies <i>et al.</i> ,2002	34/ EUA, Itália, Hong Kong, Inglaterra	55,9%
Gorden <i>et al.</i> ,2003	77/ EUA	40%
Libra <i>et al.</i> , 2005	19/Itália	63%
Goel <i>et al.</i> , 2006	58/ EUA	57%
Lee <i>et al.</i> , 2006	35/EUA	60%
Liu <i>et al.</i> , 2006	251/Austrália	45%
Venesio <i>et al.</i> , 2008	18/Itália	72%
Viros <i>et al.</i> , 2008	302/ EUA, Alemanha, Japão, Coréia do Sul	47%
Casula <i>et al.</i> , 2009	35/Itália	31,4%
Lázár <i>et al.</i> ,2009	74/ Hungria	27%
Narita <i>et al.</i> , 2009	71/ EUA e Austrália	39%
Broekaert <i>et al.</i> ,2010	350/ Alemanha, Austria, EUA	49,7%
Jung <i>et al.</i> , 2010	96/Brasil	36,4%
Scherer <i>et al.</i> ,2010	179/ Itália e Alemanha	17,3%
Rubinstein <i>et al.</i> ,2010	138/ EUA	69%
Hacker <i>et al.</i> ,2010	123/ Austrália	31,5% de mutação V600
Ellerhorst <i>et al.</i> ,2011	223/EUA	42,2%
Janku <i>et al.</i> , 2011	52/ EUA	50%
Long <i>et al.</i> , 2011	197/ Austrália	48% <i>BRAF</i> , sendo 74% V600E
Shibata <i>et al.</i> ,2011	39/Japão	28,2%
Menzies <i>et al.</i> ,2011	312/ Austrália	46% de mutação no gene <i>BRAF</i> , sendo 73% V600E
Ellison <i>et al.</i> ,2012	163/ Grã Bretanha	41,1%
Lovly <i>et al.</i> , 2012	150/ EUA	38% de mutação no <i>BRAF</i> , sendo79 79% V600E

## I.7 - Tratamento do melanoma

Recentemente, o armamento terapêutico do melanoma tem aumentado, incluindo vários agentes promissores. No entanto, uma fração significativa de pacientes com doença avançada permanece sem sucesso com as opções terapêuticas (Davar *et al.*, 2011).

O tratamento cirúrgico para o melanoma cutâneo persiste como o melhor tratamento para a sobrevida à longo prazo, seja em estágios iniciais ou em pacientes com disseminação regional ou à distância. O que mudou foi a forma de se operar, resultando em menor morbidade, permitindo a possibilidade de estadiamento e a identificação de micrometástase, além de aumento na sobrevida (Demierre *et al.*, 2008).

Para pacientes com melanoma primário de 4 mm ou mais (lesões T4), ressecado cirurgicamente, e/ou com metástases para linfonodos regionais, os quais tem risco aumentado de recorrência e morte (estágios IIB ou mais), a única terapia adjuvante aprovada pela *Food and Drugs Administration* (FDA) permanece o interferon –  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ). Em seu trabalho, Davar *et al.* (2011), concluíram que a terapia adjuvante com IFN- $\alpha$ 2b em pacientes de alto risco tem um efeito extremamente benéfico no tempo de sobrevida sem recaída, mas menor impacto na sobrevivência, especialmente em 10 anos.

Até 2011, apenas duas terapias eram aprovadas pelo FDA para o melanoma metastático, a Decarbazina e altas doses de Interleucina 2, sendo que ambas não aumentam a sobrevida média global. A Decarbazina é limitada por uma baixa taxa de resposta (10 a 15%) e uma sobrevida global de oito meses. Já a Interleucina-2 é limitada por uma taxa de resposta ainda mais baixa (6 a 10%) e toxicidade severa, com apenas uma minoria de pacientes alcançando uma resposta duradoura (Finn *et al.*, 2012).

O reconhecimento de mutações moleculares decisivas que conduzem à carcinogênese no melanoma levou ao desenvolvimento de agentes promissores que selecionam o alvo e inibem essas mutações e, em troca, fornecem taxas de resposta melhores e toxicidade decrescente. Secundariamente, avanços no entendimento da imunologia do tumor e escape imune levaram ao surgimento de novos agentes

imunológicos que são menos tóxicos do que a Interleucina-2, mas ainda fornecem benefícios à longo prazo (Finn *et al.*, 2012).

O melanoma cutâneo é considerado uma doença molecularmente heterogênea, com aproximadamente 40 a 70% de mutação no gene *BRAF*, sendo 90% resultante de uma substituição da valina por ácido glutâmico na posição 600 (V600E). Por causa dessa taxa relativamente alta de BRAF mutante, bem como seu potencial oncogênico, tem-se buscado inibi-lo seletivamente (Finn *et al.*, 2012).

Em um estudo fase 1, o primeiro desses inibidores seletivos do gene *BRAF*, o Vemurafenib, demonstrou uma regressão tumoral substancial de 81% nos pacientes com melanoma metastático que possuíam a mutação no *BRAF* (V600E) e receberam a dose recomendada na fase 2. O seguimento do estudo de fase 2 (BRIM2) dos pacientes previamente tratados demonstrou uma taxa de resposta confirmada (RR) de 53% com uma média de 6,7 meses de duração da resposta. Finalmente, um estudo controle randomizado de fase 3 (BRIM3) de pacientes previamente não tratados, comparando o Vemurafenib com Decarbazina, demonstrou melhora na RR (48% contra 5%), sobrevida livre de progressão (5,3 contra 1,6 meses), percentual de pacientes vivos em seis meses (84% contra 64%) e com uma redução de 75% no risco de morte (Lemehc *et al.*, 2012). Esses achados serviram de base para a aprovação do Vemurafenib pelo FDA em Agosto de 2011 (Sullivan *et al.*, 2011). Um segundo inibidor do BRAF, GSK2118436, mostrou eficácia semelhante em um estudo fase1/2 (Finn *et al.*, 2012).

## **II – OBJETIVOS**

### **II.1 - Objetivo geral**

O objetivo desse estudo consistiu em avaliar a frequência da mutação V600E no gene *BRAF*, em pacientes diagnosticados com melanoma em Goiânia.

### **II.2 - Objetivos específicos**

- (1) Investigar a frequência da mutação V600E no gene *BRAF* em pacientes com melanomas cutâneos primários diagnosticados em Goiânia.
- (2) Comparar os dados de frequência da mutação V600E detectados nos pacientes com melanoma de Goiânia com aqueles avaliados em diferentes regiões geográficas.
- (3) Avaliar as possíveis associações observadas entre a presença da mutação V600E no gene *BRAF* e os aspectos clínico-patológicos dos pacientes selecionados (idade, gênero, presença de metástases, localização do melanoma primário, tipo histológico, índice de Breslow, sobrevida, etc.)

### **III –METODOLOGIA**

#### **III.1 - Aspectos éticos da pesquisa**

Este estudo foi avaliado e recomendado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Araújo Jorge (HAJ), conforme Parecer nº 049/2010 (Anexo 1). Somente após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética, foram iniciadas as análises. Tratou-se de um estudo retrospectivo com utilização de dados clínicos obtidos de prontuários e análise de espécimes tumorais fixados em formol e incluídos em parafina. Assim, o estudo não ofereceu risco evidente aos pacientes incluídos na análise.

#### **III.2 - Seleção de casos de melanoma**

Os casos de melanoma foram selecionados a partir dos livros de registro do Setor de Anatomia Patológica (SAP) do HAJ, no período de 2004 a 2006. Os blocos contendo os fragmentos de tumores foram levantados a partir dos arquivos do SAP, montados em lâminas de vidro e corados pela hematoxilina-eosina (HE) para análise microscópica e comprovação do diagnóstico histopatológico. A revisão histopatológica foi feita pelo patologista, Dr. Ailton Cabral, do SAP do HAJ. Os pacientes incluídos no estudo apresentavam diagnóstico histopatológico comprovado de melanoma, blocos de parafina disponíveis no SAP do HAJ e dados clínicos e histopatológicos, incluindo: idade, gênero, localização do tumor, classificação do melanoma, índice de Breslow, índice mitótico, comprometimento metastático de linfonodos regionais e metástase à distância. Foram excluídos pacientes com diagnóstico de melanoma *in situ*, melanoma sem diagnóstico do sítio primário, melanoma ocular ou melanoma sem comprovação histopatológica, cujo bloco não se encontrava no SAP do HAJ, ou que não apresentavam os dados clínicos e histopatológicos descritos anteriormente. Os dados clinicopatológicos foram colhidos a partir dos respectivos prontuários e utilizados para a confecção de um banco de dados. Inicialmente, o banco de dados possuía 286 pacientes,

mas pelos critérios acima descritos foram excluídos 209 pacientes, restando 77 casos. Os espécimes biológicos analisados neste estudo consistiram de fragmentos de melanoma, colhidos por meio de cirurgia, seja biópsia ou exereses total do tumor, antes de qualquer abordagem radioterápica ou quimioterápica.

### **III.3 - Extração de DNA das amostras de melanoma**

A mutação V600E do gene *BRAF* foi analisada de acordo com o procedimento proposto por Cohen *et al*, 2003. Utilizou-se *primers* específicos para o éxon 15 do gene *BRAF* e amplificação gênica, produzindo fragmentos amplificados com 224 pares de bases (pb). Tais fragmentos foram submetidos a digestão com utilização da endonuclease de restrição *TspRI* que não reconhece a mutação T1799A no gene *BRAF*. A enzima de restrição *TspRI* digere o produto de PCR produzindo três bandas principais: uma com 125 pb, uma com 87pb e outra com 12pb, a partir do alelo do tipo selvagem. A mutação T1799A abole um sítio de restrição, resultando em uma banda de 212 pb a partir do alelo mutante e bandas residuais a partir do alelo selvagem. A extração de DNA das amostras de melanoma foi feita com a utilização do kit comercial *Wizard DNA Isolation Kit* (Promega), utilizando o protocolo padronizado no Laboratório de Diversidade Genética da PUC-Goiás, conforme descrição a seguir.

#### **III.3.1 - Preparo das amostras**

Os fragmentos de tumores finamente cortados, medindo de 0,5-2,0  $\mu$ , foram transferidos para microtubos, nos quais eram adicionados 500  $\mu$ l de xileno. Os microtubos foram incubados por 15 minutos à 55°C em banho-maria e, posteriormente, centrifugados a 13.000 rpm por cinco minutos, formando um pellet de tecido. Em seguida, o sobrenadante contendo o xileno foi descartado e a etapa anterior repetida por mais duas vezes, a fim de completar a remoção da parafina. Após a remoção da parafina, 500  $\mu$ l de etanol 100% foram adicionados aos microtubos, que foram então incubados por 15 minutos a 55°C em banho-maria e posteriormente, centrifugados a 13.000 rpm por cinco minutos, formando um pellet. Em seguida, o sobrenadante

contendo o etanol foi descartado e a etapa anterior repetida por mais duas vezes, a fim de completar a remoção do xileno. Essas etapas foram repetidas mais duas vezes para completa remoção do xileno.

### **III.3.2 - Lise celular**

Aproximadamente 200 µl de solução de lise celular foram adicionados a cada microtubo e o fragmento de tecido macerado com uma ponteira. A fim de garantir a lise do tecido, 10 µl de proteinase K (20 mg/ml, Invitrogen) foram adicionados a cada tubo. Os tubos foram homogeneizados 25 vezes por inversão e incubados a 55°C (*overnight*), com inversões periódicas. A completa lise celular foi concluída quando nenhum fragmento de tecido foi observado em cada um dos tubos.

### **III.3.3 - Precipitação de proteínas**

Após a lise celular, as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente. Posteriormente, adicionados 40 µl de solução de precipitação de proteínas e a solução homogeneizada com pipetagens sucessivas. Os microtubos foram então incubados a -20°C, e, em seguida, centrifugados a 13.000 rpm por cinco minutos. As proteínas precipitadas formavam um *pellet* no fundo do tubo e o sobrenadante contendo o DNA transferido para outro microtubo limpo. Caso o *pellet* não fosse visível, o tubo era agitado novamente no vórtex em alta velocidade por 20 segundos e colocado novamente no *freezer* seguindo os passos citados anteriormente.

### **III.3.4 - Precipitação do DNA**

O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro microtubo previamente identificado e acrescido de 200 µl de isopropanol 100% gelado. Os tubos foram homogeneizados 50 vezes por inversão e centrifugados a 13.000 rpm por cinco minutos. Após a precipitação, os sobrenadantes foram descartados e os tubos invertidos sobre papel absorvente. Os *pellets* contendo DNA foram lavados com 200 µl de etanol 70%, homogeneizados 25 vezes por inversão e centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente descartados e os tubos invertidos sobre papel

absorvente. Os *pellets* correspondentes a cada amostra foram então secos à temperatura ambiente.

### III.3.5 - Hidratação do DNA

Os *pellets* correspondentes a cada amostra foram ressuspensos em 20 µl de água milli Q autoclavada. O DNA resultante de cada amostra foi armazenado em *freezer* -20°C até a realização dos ensaios de PCR.

### III.4 - Análise molecular da mutação V600E do gene *BRAF* por meio de PCR e RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição):

Os oligonucleotídeos iniciadores específicos para o exon 15 do gene *BRAF* (Tabela 3) foram usados nos ensaios de amplificação gênica, produzindo amplicons com 224 pares de bases (pb). Todos os reagentes da PCR foram rapidamente centrifugados e homogeneizados no vórtex, sendo previamente descongelados sobre o gelo picado. Um controle negativo da reação contendo todos os componentes, exceto o DNA, foi incluído em todas as amplificações. As reações de PCR foram realizadas num volume final de 25 µl, utilizando um termociclador Veriti (Applied Biosystems), em mistura contendo 15 µl de água milli-Q; 2,5 µl de tampão (10x); 1,0 µl MgCl<sub>2</sub>; 1,0 µl de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 2,5 µl de dNTPs (desoxinucleotídeo-trifosfato-dATP, dCTP, dGTP, e dTTP); 0,5 µl de cada primer de *BRAF*; e 2,0 µl de DNA.

Após a amplificação por PCR, um *amplicon* de 224 pb era visualizado em gel de poliacrilamida a 8%, corado com nitrato de prata. Todos os casos que tiveram a amplificação do fragmento do gene *BRAF* (224 pb) eram submetidos à digestão com a enzima de restrição *TspRI* (10 U/ µl *New England Biolabs, Beverly, MA*). A digestão foi feita num volume de 15 µl, com 10 µl do produto de PCR, 2,5 unidades da enzima *TspRI*; 3,5 µl de água milli-Q autoclavada; 1.0 µl de NE buffer e 0,25 µl de BSA. A digestão foi feita durante 120 minutos, a 65°C e o resultado visualizado em gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata. Amostras de melanoma, contendo a mutação T1796A foram usadas como controle positivo.

**Tabela 3:** Descrição dos *primers* e protocolos de ciclagem usados no ensaio de PCR para amplificação do gene *BRAF* em amostras de melanoma

Fragmento amplificado/ Primers	Condições de ciclagem
(=224 pb)	
Primer P1 (f)	94°C - 3 min
5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGG-3'	94°C - 30 seg
Primer P2 (f)	60°C - 1 min
5'-GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA-3'	72°C - 1 min
	72°C - 10 min
	4°C - Infinito

### III.5 - Análise Estatística

Um banco de dados clínicos e histopatológicos dos pacientes com melanoma foi elaborado, utilizando o Software Microsoft Excel<sup>®</sup> (Microsoft Corp., EUA). Análise estatística descritiva desses dados foi realizada e tabelas de contingência foram preparadas. Os aplicativos estatísticos Prism 5 e InStat 4 foram usados para as análises comparativas das variáveis qualitativas. O teste do Chi-quadrado com correção de Yates, nível de significância de 5%, foi usado para as análises comparativas e o teste exato de Fisher, quando apropriado.

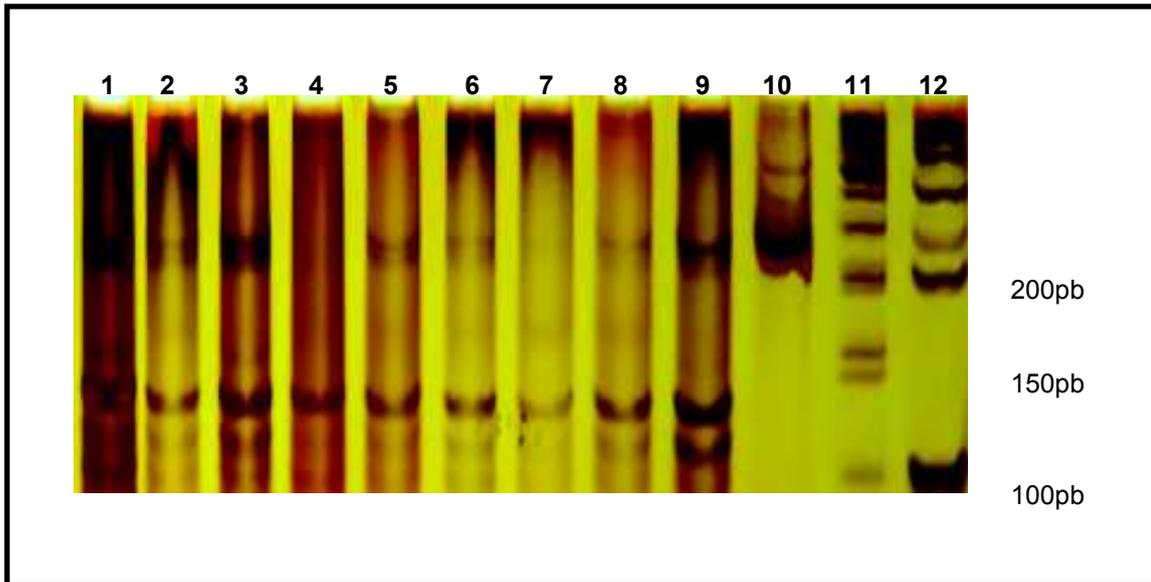
## **IV - RESULTADOS**

### **IV.1 - Grupo de estudo**

Foram avaliados neste estudo 77 pacientes, sendo 49 do sexo feminino (63,6%) e 28 pacientes do sexo masculino (36,4%). Dez pacientes (13,0%) tinham menos do que 45 anos e 67 pacientes (87,0%) tinham 45 anos ou mais. Os melanomas diagnosticados foram divididos de acordo com sua localização em cabeça (correspondendo a 15,6% dos casos), tronco (36,4%), membros (18,2%); pés e mãos (29,9%). Foram considerados como melanomas com exposição intermitente ou rara às radiações UV, aqueles localizados no tronco, membros, pés ou mãos e melanomas com exposição crônica às radiações UV, aqueles localizados na cabeça. Houve uma frequência de 12 (15,6%) pacientes com exposição crônica e 65 (84,4%) com exposição solar intermitente. Os melanomas foram divididos também quanto seu subtipo histológico, sendo classificados em: extensivo superficial (42,7% dos casos), nodular (26,7%), lentigo maligno melanoma (18,7%) e acral ou de mucosa (12,0%). Dois casos de melanomas foram designados como inclassificáveis. Em relação às metástases, 9 (12%) pacientes apresentavam metástase ao diagnóstico e 66 (88%) pacientes eram não metastáticos. Dois pacientes não apresentavam dados quanto a metástases.

### **IV.2 - Análise da mutação V600E do gene *BRAF* nos pacientes portadores de melanoma**

Utilizando os métodos de PCR e RFLP, foi feita a pesquisa da mutação V600E do gene *BRAF* nos 77 espécimes de melanoma e os resultados foram analisados através do gel de poliacrilamida corado a 10% com nitrato de prata (figura 10). A mutação foi encontrada em 54/77 casos, correspondendo a uma frequência de 70,1%.



**Figura 10:** Gel de poliacrilamida a 10% corado com nitrato de prata, mostrando produtos de restrição de um fragmento do gene *BRAF* com 224 pares de bases, contendo ou não a mutação T1799A, cortado com a enzima *TspRI*. A presença da mutação T1799A resulta na formação de quatro fragmentos com 212pb, 125pb, 87pb e 12pb (canaletas 1, 2, 3, 5, 6, 8 e 9), enquanto que o alelo selvagem resulta na formação de três fragmentos contendo 125pb, 87pb e 12pb (canaletas 4 e 7). A canaleta 10 apresenta o fragmento de 224pb não-digerido. As canaletas 11 e 12 apresentam bandas correspondentes ao padrão de peso molecular de DNA com 50pb e 100pb, respectivamente.

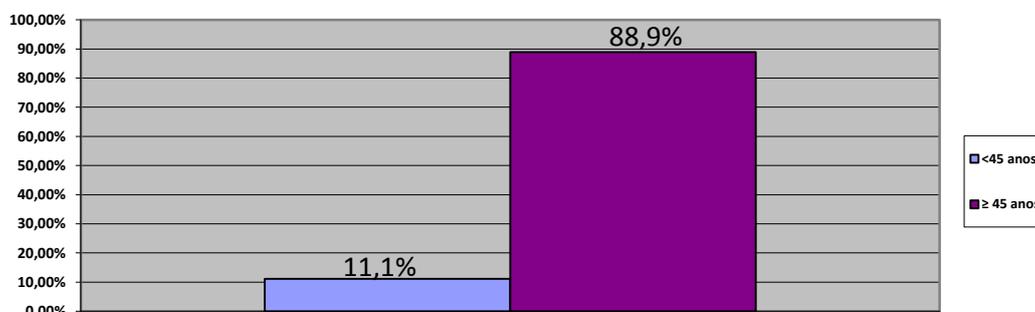
#### **IV.3 – Distribuição dos pacientes que apresentaram a mutação V600E do gene *BRAF* e os aspectos clinicopatológicos dos melanomas.**

Os pacientes portadores de melanoma cutâneo foram divididos de acordo com a presença ou não da mutação do gene *BRAF* e as possíveis associações entre os aspectos clinicopatológicos: idade, gênero, localização anatômica do tumor, subtipo histológico, sinais de regressão, presença de ulceração, presença de infiltração linfocitária, presença de satélites microscópicos, índice de Breslow, presença de metástases e quanto à exposição solar. Os dois grupos foram comparados, porém, nenhuma associação estatisticamente significativa foi detectada em relação aos parâmetros clinicopatológicos avaliados (tabela 4).

**Tabela 4:** Análise univariada investigando as possíveis associações entre os aspectos clínico patológicos do melanoma com a mutação no gene *BRAF*

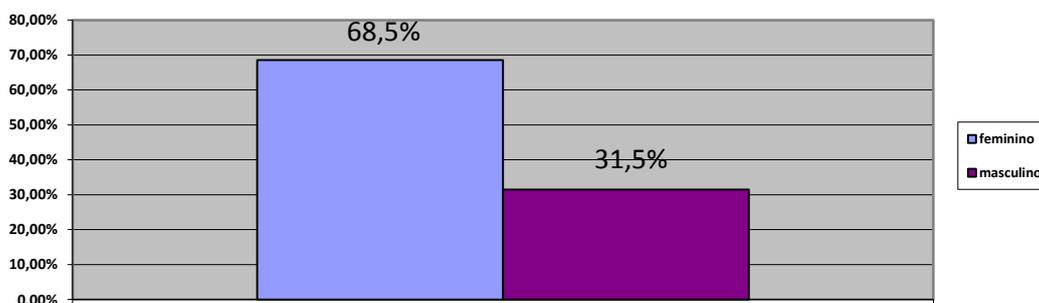
Parâmetro	V600E (+)	V600E (-)	N	P
<b>Gênero</b>				
Masculino	17	11	28	0,2688
Feminino	37	12	49	
<b>Idade</b>				
<45 anos	6	4	10	0,7040
≥45 anos	48	19	67	
<b>Tipo histológico</b>				
Extensivo superficial	20	12	32	0,3097
Nodular	16	4	20	
Lentigo maligno	9	5	14	
Acral/ mucosa	8	1	9	
<b>Localização</b>				
Cabeça	8	4	12	0,9240
Tronco	20	8	28	
Membros	9	5	14	
Pés/mãos	17	6	23	
<b>Sinais de regressão</b>				
Sim	3	3	6	0,5206
Não	48	19	67	
<b>Ulceração</b>				
Sim	22	8	30	0,8766
Não	31	14	45	
<b>Infiltração linfocitária</b>				
Sim	47	22	69	0,3175
Não	5	0	5	
<b>Satélites microscópicos</b>				
Sim	5	2	7	0,7158
Não	47	20	67	
<b>Metástase</b>				
Sim	7	2	9	0,681
Não	47	19	66	
<b>Exposição solar</b>				
Crônica	8	4	12	0,775
Intermitente	46	19	65	
<b>Breslow</b>				
< 1,0 mm	13	8	21	0,4926
>1,0 mm	41	15	56	

Dentre os pacientes positivos para a mutação V600E do gene *BRAF*, 48 (88,9%) tinham idades iguais ou acima de 45 anos, enquanto seis (11,1%) tinham idades abaixo de 45 anos (figura 11).



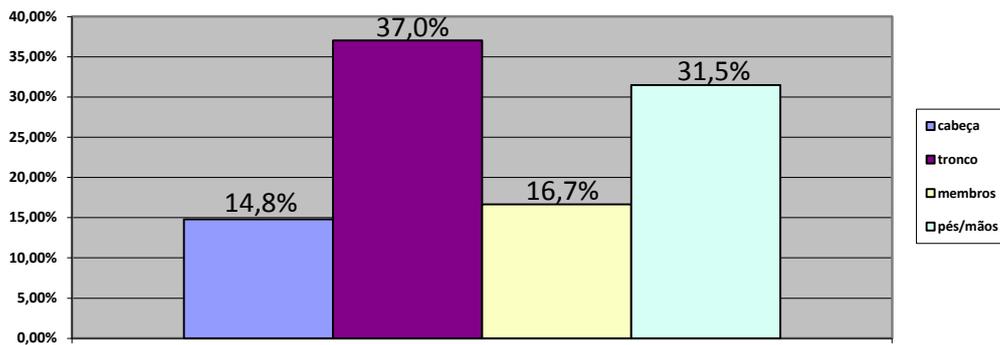
**Figura 11:** Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de *BRAF*) com relação à idade

Quanto ao gênero, 37 (68,5%) dos pacientes com mutação V600E eram do sexo feminino e 17 (31,5%) pacientes eram do sexo masculino (figura 12).



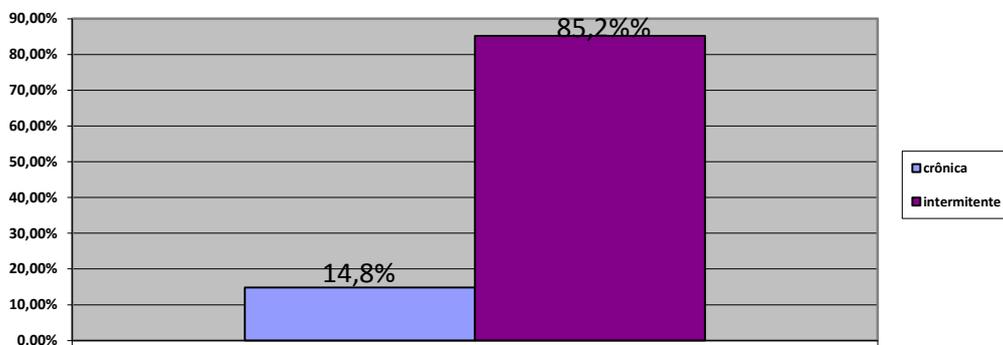
**Figura 12:** Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de *BRAF*) com relação ao gênero

Dentre os pacientes que apresentavam a mutação V600E do gene *BRAF*, oito (14,8%) tinham melanomas localizados na cabeça, 20 (37,0%) no tronco, 9 (16,7%) nos membros e em 17 (31,5%) pacientes nos melanomas em pés ou mãos (figura 13).



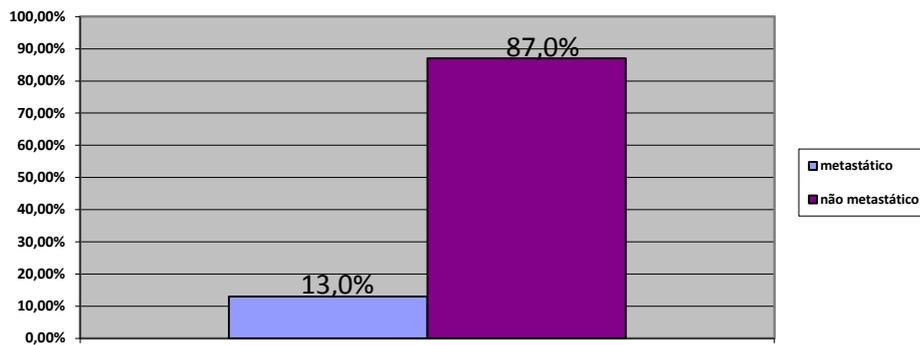
**Figura 13:** Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de *BRAF*) com relação à localização

A partir da localização, foi calculada a frequência da mutação no gene *BRAF* quanto à exposição solar, sendo que a mutação estava presente em 46 (85,2%) casos de melanoma em locais de exposição solar intermitente e em 8 (14,8%) casos de exposição solar crônica (figura 14).



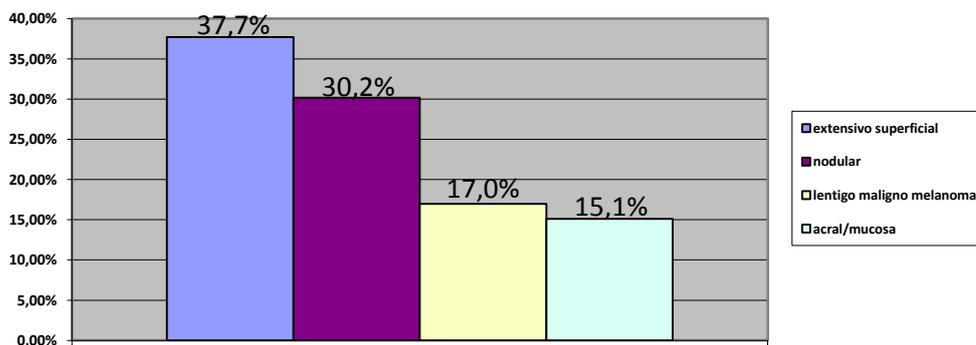
**Figura 14:** Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de *BRAF*) com relação à exposição solar

Já em relação à presença de metástases ao diagnóstico, 47 (87,0%) pacientes com mutação V600E eram não-metastáticos e 7 (13,0%) pacientes apresentavam metástases (figura 15).

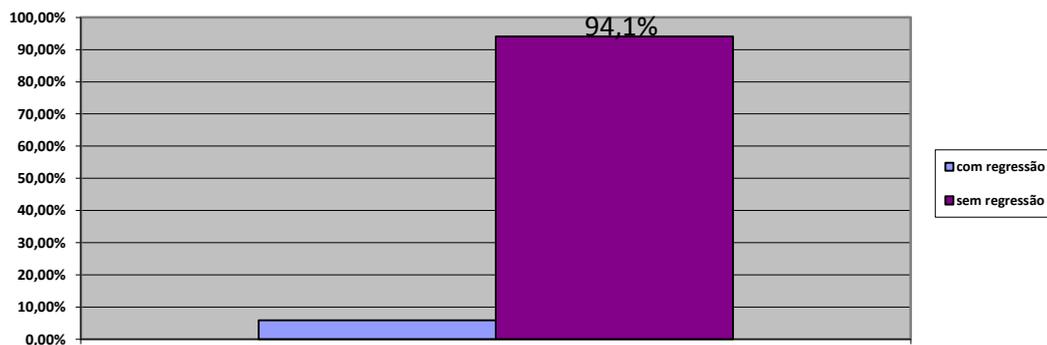


**Figura 15:** Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de *BRAF*) com relação à presença de metástases ao diagnóstico

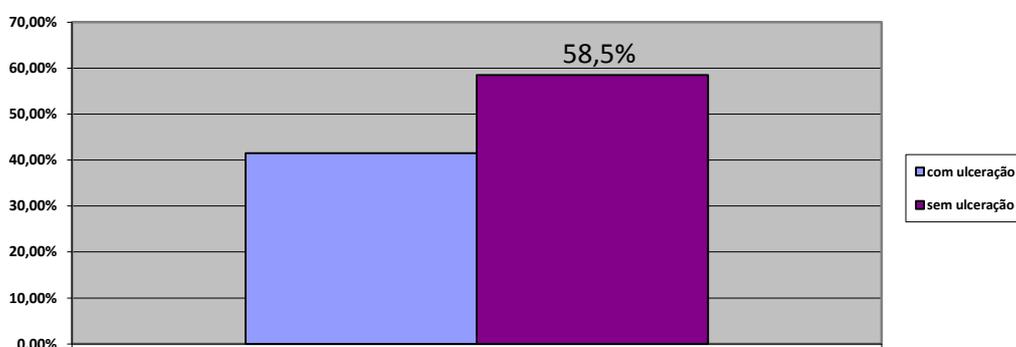
Quanto aos parâmetros histológicos, a mutação no gene *BRAF* foi detectada em 20 (37,7%) dos casos de melanoma extensivo superficial, 16 (30,2%) casos de melanoma nodular, 9 (17,0%) casos de lentigo maligno melanoma e 8 (15,1%) casos de melanoma acral ou de mucosa (figura 16). A mutação V600E estava presente em 48 (94,1%) casos de melanoma com sinais de regressão (figura 17), em 31 (58,5%) dos casos que não possuíam ulceração (figura 18), em 47 (90,4%) dos melanomas com infiltração linfocitária (figura 19), em 47 (90,4%) dos pacientes que não possuíam satélites microscópicos (figura 20) e em 41 (75,9%) dos pacientes com índice de Breslow maior do que 1,0 mm (figura 21).



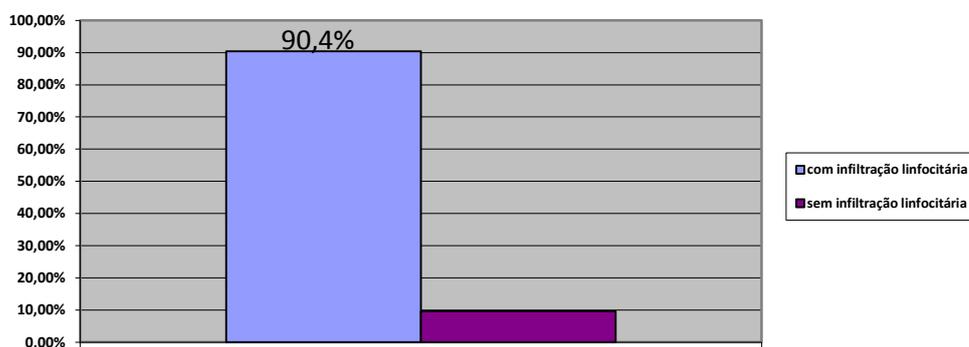
**Figura 16:** Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de *BRAF*) com relação ao subtipo histológico



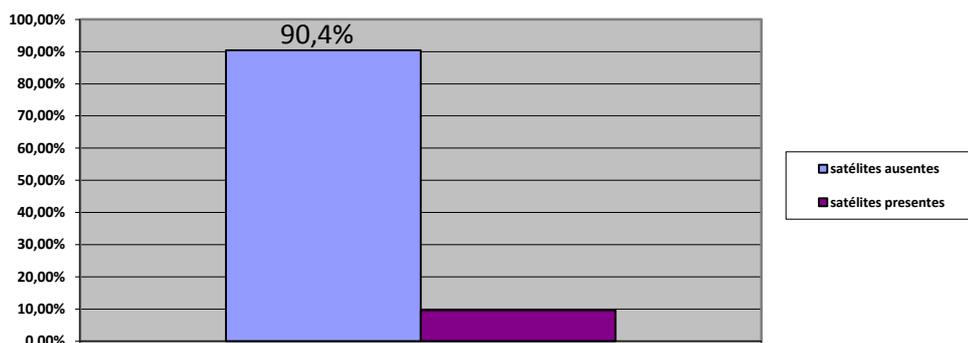
**Figura 17:** Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de *BRAF*) com relação aos sinais de regressão



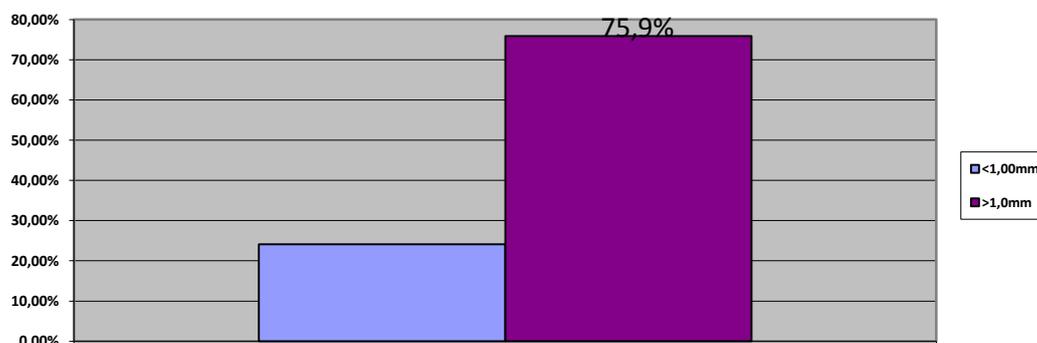
**Figura 18:** Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de *BRAF*) com relação à presença de ulceração



**Figura 19:** Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de *BRAF*) com relação à presença de infiltração linfocitária



**Figura 20:** Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de *BRAF*) com relação à presença de satélites microscópicos



**Figura 21:** Gráfico de distribuição dos casos de melanoma mutados (V600E de *BRAF*) com relação ao índice de Breslow

## V – Discussão

O gene *BRAF* codifica uma quinase que faz parte da via da MAPK, uma cascata de transdução de sinais dirigida por fosforilação e que acopla respostas intracelulares aos fatores de crescimento e seus respectivos receptores de superfície celular. Na célula normal, é uma via importante em vários processos mitogênicos e de sobrevivência celular, incluindo a proliferação celular e proteção contra apoptose. É uma via altamente regulada e que normalmente controla a senescência. Quando ocorre a mutação no gene

*BRAF*, esta via torna-se constitutivamente ativada, dispensando a ativação pelo RAS e ATP, se tornando fundamental para a proliferação e sobrevivência do melanoma, pois a proteína mutante é dez vezes mais ativa do que a proteína selvagem (Sekulic *et al.*, 2008, Vidwans *et al.*, 2011). Além disso, o gene *BRAF* é o gene mutado mais comum no melanoma (Davies *et al.*, 2002), conforme demonstrado na figura 9 (Flaherty, 2006) e por isso o gene *BRAF* é considerado um alvo terapêutico importante no melanoma.

Quimioterapia, agentes biológicos ou a combinação das duas modalidades terapêuticas apresentam pouco impacto na sobrevivência dos pacientes com melanoma metastático (Hersey *et al.*, 2009; Davar *et al.*, 2011). Até 2011, apenas duas drogas eram aprovadas pelo FDA para o tratamento do melanoma metastático: Decarbazina e Interleucina 2, porém nenhuma aumentava a sobrevida média global dos pacientes (Finn *et al.*, 2012). Os avanços no entendimento das mudanças genéticas implicadas no melanoma resultaram no aparecimento de novos agentes que inibem proteínas específicas, regulando as vias sinalizadoras. No tratamento do melanoma tem-se o Sorafenib, um inibidor multiquinase da via MAPK; o Elesclomol (STA-4783) e o Oblimersen (G3139), oligonucleotídeos que bloqueiam a molécula anti-apoptótica Bcl-2; agentes que atuam na proteína MEK (PD0325901, AZD6244), mTOR (Everolimus, Deforolimus, Temsirolimus) e VEGFR (Axitinib) e ainda inibidores dos receptores de tirosina-quinase (Imatinib, Dasatinib, Sunitinib). Todos eles vem sendo testados em estudos para verificar a eficácia no tratamento do melanoma (Hersey *et al.*, 2009). No presente estudo, mais especificamente, destaca-se a importância dos inibidores específicos do *BRAF* mutante (Vemurafenib) (Lemehc *et al.*, 2012).

O principal objetivo deste trabalho foi pesquisar a frequência da mutação V600E no gene *BRAF*, já que medicamentos novos para o melanoma cutâneo estão sendo desenvolvidos, como o Vemurafenib, que atua especificamente na forma mutada de BRAF. Nosso objetivo era prever se muitos pacientes brasileiros seriam beneficiados com este novo medicamento. Isso porque, como mostrado na Tabela 1, de acordo com os trabalhos analisados, a frequência da mutação na população em geral é muito variável.

De acordo com uma meta-análise, realizada por Lee *et al.* (2011), no período de 1989 e 2010, 36 estudos foram desenvolvidos sobre o gene *BRAF*. A frequência de

mutação neste gene variou de 22 a 72% em diferentes países. Um estudo realizado por Jung *et al.* (2010), no Brasil, detectou uma frequência de mutação relativamente baixa na população analisada, ou seja, de 39%. Nosso estudo demonstrou uma frequência de mutação de 70%, valor este considerado alto, mas dentro dos limites apresentados na meta-análise de Lee *et al.* (2011).

Em nosso estudo, o melanoma extensivo superficial foi o subtipo histológico mais frequente, concordando com dados da literatura (Gosh *et al.*, 2009). A localização anatômica mais comum entre os pacientes do estudo foi o tronco (36,4%), assim como descrito por Dal *et al.* (2007). Uma justificativa possível para o maior número de melanomas extensivos superficiais, principalmente no tronco, seria a exposição solar intermitente em atividades recreativas, principalmente na população jovem, sendo o melanoma, o segundo e terceiro tipo de câncer mais comum em homens e mulheres, respectivamente, entre os 20 e 29 anos de idade (Gosh *et al.*, 2009; Dal *et al.*, 2007; Siegel *et al.*, 2012).

De acordo com dados do AJCC, são fatores preditivos de sobrevida em pacientes com melanoma cutâneo estágios I e II: o índice de Breslow, a idade, a presença de ulceração, a localização anatômica e o gênero (Thompson *et al.*, 2011). Nosso trabalho tinha como objetivo também verificar se havia alguma relação entre a presença da mutação V600E e outros parâmetros prognósticos, como índice de Breslow, idade, gênero, presença de ulceração, infiltração linfocitária e metástase à distância. Assim como Qi *et al.* (2011), o estudo não detectou associação estatística significativa entre a presença da mutação V600E e o subtipo histológico, o gênero e a idade dos pacientes.

Apesar de não ter sido encontrada uma relação estatisticamente significativa entre a presença da mutação V600E e o subtipo histológico extensivo superficial, como demonstrado em outros trabalhos (Liu *et al.*, 2006, Lee *et al.*, 2011), houve uma frequência maior da mutação neste subtipo histológico (37,7%) no presente estudo. O resultado pode ser explicado pela menor frequência de melanomas extensivos superficiais (32,7%) presentes na amostra.

No presente estudo, 37 (68,5%) pacientes eram do sexo feminino, porém, este parâmetro não esteve significativamente associado à presença da mutação. Outros

estudos também não relacionam a frequência da mutação com o gênero (Liu *et al.*, 2006; Saldanha *et al.*, 2006; Hacker *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011).

A relação entre faixa etária e a presença de mutação V600E no gene *BRAF* é controversa. Alguns estudos demonstraram que esta mutação prevalece em pacientes mais jovens (Liu *et al.*, 2006; Menzies *et al.*, 2011; Long *et al.*, 2011; Hacker *et al.*, 2010; Goel *et al.*, 2006; Broekaert *et al.*, 2010). Já na meta-análise realizada por Lee *et al.* (2011), esta associação não foi comprovada, bem como neste estudo.

Assim como no trabalho realizado por Jung *et al.* (2010), com 96 pacientes brasileiros, não houve associação significativa entre a presença da mutação V600E e os parâmetros histológicos, como presença de ulceração, sinais de regressão e presença de satélites.

Com relação ao índice de Breslow, o principal aspecto prognóstico dos melanomas, não foi encontrada associação significativa entre os índices de Breslow menores ou maiores do que 1,0 mm e a presença da mutação no gene *BRAF*, corroborando com resultados descritos nos trabalhos realizados por Lang *et al.*, 2005, Hacker *et al.*, 2010 e Saldanha *et al.*, 2006, bem como com a meta-análise realizada por Lee *et al.*, 2011.

Diferentemente de outros estudos (Jung *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2006; Saldanha *et al.*, 2006), não foi encontrada associação significativa entre a presença de mutação V600E em pacientes com exposição solar crônica ou intermitente. Hacker *et al.* (2010) também não identificaram diferença na frequência da mutação entre melanomas de cabeça e pescoço *versus* melanomas de tronco e membros, que são locais com nível de exposição solar diferentes, pois considera-se que a cabeça e o pescoço apresentam uma exposição solar contínua, enquanto que o tronco e membros sofrem uma exposição solar intermitente. Já Qi *et al.*, (2011) também não identificaram relação da mutação com a exposição solar. A relação entre a exposição solar e o gene *BRAF* necessita de mais estudos, pois mesmo aqueles que demonstraram uma associação significativa entre a mutação V600E com a exposição solar intermitente não conseguiram explicar como isso ocorre, quais são os genes alterados e qual seria o papel das radiações ultravioletas no aparecimento da mutação V600E (Jou *et al.*, 2012). As mutações reconhecidas como assinaturas das radiações UV são C>T ou CC>TT ocorrem em sítios dipirimidínicos, e

são diferentes da mutação V600E (Thomas *et al.*, 2006). Além disso, a mutação no gene *BRAF* ocorre em outras neoplasias como carcinoma papilífero de tireoide, demonstrando que existem outros fatores além da exposição solar que poderiam levar a esta mutação.

Assim como no estudo de Gorden *et al.* (2003), não foi detectada uma associação entre a presença de metástases e a mutação V600E no gene *BRAF*. Uma possível explicação seria de que esta mutação ocorre precocemente na transformação melanocítica, contribuindo para a proliferação e sobrevivência do tumor, mas não necessariamente para a disseminação metastática.

O número reduzido de casos foi uma das limitações deste trabalho. Como a coleta de dados foi retrospectiva, houve dificuldade em encontrar pacientes com prontuários que tivessem todos os dados necessários. Além disso, a maioria dos casos não tinha seguimento de cinco anos, o que impossibilitou a avaliação de sobrevida e recorrência. Além disso, a utilização de tecido parafinado como fonte para extração de DNA também pode ter interferido nos resultados, já que dificulta a extração de DNA de qualidade e sua amplificação por PCR. E por não ter sido realizada a técnica de microdissecção, o material colhido também não era homogêneo, contendo tanto células tumorais quanto normais, o que dificultou a análise dos resultados obtidos por RFLP.

Quanto à técnica utilizada para a análise da mutação, apesar do método de RFLP ser altamente específico para mutações com troca de pares de bases, ela apresenta especificidade inferior à técnica de sequenciamento e RT-PCR, por não ser capaz de distinguir amostras heterozigotas para a mutação.

Recomendamos ainda que para os futuros trabalhos sejam coletados dados de forma prospectiva, o que facilitaria a confecção de um banco de dados mais completo e com seguimento adequado dos pacientes.

Assim, concluímos com este trabalho que a presença da mutação V600E no gene *BRAF* não deve interferir no prognóstico do paciente, visto que não foi encontrada relação desta mutação com parâmetros importantes para o prognóstico, como o índice de Breslow, gênero, presença de ulceração, idade e subtipo histológico, concordando com dados da literatura (Jung *et al.*, 2010; Long *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011). Entretanto, somente as análises de sobrevida poderiam definir esta associação de forma

mais precisa. Concluimos também que uma parcela grande dos pacientes apresenta a mutação V600E e que o tratamento direcionado para esta mutação é uma grande esperança para esses pacientes, pois como foi dito anteriormente, ainda não há um tratamento com resposta efetiva para os casos de melanomas metastáticos.

## VI – Conclusões

Com base nos resultados obtidos neste estudo, concluímos que:

- 1 – A frequência da mutação V600E do gene *BRAF* nos pacientes analisados foi de 70,1%, representando assim, um evento molecular comum nos casos estudados.
- 2 – A frequência da mutação V600E do gene *BRAF* obtida neste estudo foi alta, porém, dentro dos limites apresentados por outros estudos em diferentes regiões geográficas.
- 3 - Embora nenhuma associação significativa tenha sido demonstrada entre a presença da mutação V600E e os aspectos clinicopatológicos investigados neste estudo, a detecção desta mutação é relevante em pacientes com melanoma, pois permite seleccionar aqueles candidatos às novas terapias alvo-dirigidas disponíveis.

## VII – Referências bibliográficas

*American Joint Committee on Cancer.* Disponível em <http://www.cancerstaging.org/staging/posters/melanoma8.5x11.pdf>. Acesso em 30/07/2012.

Azzola MF, Shaw HM, Thompson JF, Soong SJ, Scolyer RA, Watson GF, Colman MH, Zhang Y. Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. *Cancer*. 2003 Mar 15;97(6):1488-98.

Baccarini M. Second nature: biological functions of the Raf-1 “kinase”. *FEBS Lett*. 2005 Jun 13;579(15):3271-7.

Balch CM. Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide. *Semin Surg Oncol*. 1992 Nov-Dec;8(6):400-14.

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 20;27(36):6199-206. Epub 2009 Nov 16.

Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A. Prognostic Factors Analysis of 17,600 Melanoma Patients: Validation of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging System. *J Clin Oncol*. 2001 Aug 15;19(16):3622-34

Barth A, Wanek LA, Morton DL. Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. *J Am Coll Surg*. 1995 Sep;181(3):193-201

Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*. 2012. Jul 3;doi10.1002/ijc.27711.

Broekaert SM, Roy R, Okamoto I, van den Oord J, Bauer J, Garbe C, Barnhill RL, Busam KJ, Cochran AJ, Cook MG, Elder DE, McCarthy SW, Mihm MC, Schadendorf D, Scolyer RA, Spatz A, Bastian BC. Genetic and morphologic features for melanoma classification. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010 Dec; 23(6):763-70.

Brzezińska E, Pastuszek-Lewandoska D. A minireview: the role of MAPK/ERK and P13K/Akt pathways in thyroid follicular cell-derived neoplasm. *Front Biosci*. 2011 Jan 1;16:422-39.

Callender GG, Egger ME, Burton AL, Scoggins CR, Ross MI, Stromberg AJ, Hagendoorn L, Martin RC 2<sup>nd</sup>, McMasters KM. Prognostic implications of anatomic location of primary cutaneous melanoma of 1mm or thicker. *Am J Surg*. 2011 Dec;202(6):659-64;discussion 664-5.

*Cancer Research UK (2010) Skin Cancer – UK Incidence Statistics*. Disponível em <<http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/types/skin/incidence/>>. Acesso em 30/07/2012.

Casula M, Muggiano A, Cossu A, Budroni M, Caracò C, Ascierto PA, Pagani E, Stanganelli I, Canzanella S, Sini M, Palomba G; Italian Melanoma Intergroup (IMI), Palmieri G. Role of key-regulator genes in melanoma susceptibility and pathogenesis among patients from South Italy. *BMC Cancer*. 2009 Oct 3;9:352.

Chamberlain A, Ng J. Cutaneous melanoma – atypical variants and presentations. *Aust Fam Physician*. 2009 Jul;38(7):476-82.

Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes Dev*. 2006 Aug 15;20(16):2149-82.

Cho E, Rosner BA, Colditz GA. Risk factors for melanoma by body site. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 May;14(5):1241-4.

Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, Beller U, Westra WH, Ladenson PW, Sidransky D. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Apr 16;95(8):625-7.

Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, Leboit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005 Nov 17;353(20):2135-47.

Dal H, Boldemann C, Lindelöf B. Does relative melanoma distribution by body site 1960-2004 reflect changes in intermittent exposure and intentional tanning in the Swedish population? *Eur J Dermatol*. 2007 Sep-Oct;17(5):428-34. Epub 2007 Aug 2.

Davar D, Tarhini A, Kirkwood JM. Adjuvant therapy: melanoma. *J Skin Cancer*. 2011;2011:274382. Epub 2011 Dec 19.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler

HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun 27;417(6892):949-54. Epub 2002 Jun 9

Davies MA, Stemke-Hale K, Lin E, Tellez C, Deng W, Gopal YN, woodman SE, Calderone TC, Ju Z, Lazar AJ, Prieto VG, Aldape K, Mills GB, Gershenwald JE. Integrated Molecular and Clinical Analysis of AKT Activation in Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res*. 2009 Dec 15;15(24):7538-7546.

Dickson PV, Gershenwald JE. Staging and prognosis of cutaneous melanoma. *Surg Oncol Clin N Am*. 2011 Jan; 20(1):1-17.

Dong J, Phelps RG, Qiao R, Yao S, Benard O, Ronai Z, Aaronson NA. BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation on human melanoma. *Cancer Res*. 2003 Jul 15;63(14):3883-5.

Ellerhorst JÁ, Greene VR, Ekmekcioglu S, Warneke CL, Johnson MM, Cooke CP, Wang LE, Prieto VG, Gershenwald JE, Wei Q, Grimm EA. Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clin Cancer Res*. 2011 Jan 15;17(2):229-35. Epub 2010 Oct 25.

Ellison G, Donald E, McWalter G, Knight L, Fletcher L, Sherwood J, Cantarini M, Orr M, Speake G. A comparison of ARMS and DNA sequencing for mutation analysis in clinical biopsy samples. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010 Oct 6;29:132.

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Disponível em <<http://peebmsp20102.blogspot.com.br>>. Acesso em 30/07/2012.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 vl. 2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase n° 10 [Internet]. Lyon,

France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>. Acesso em 30/07/2012.

Fernandes NC, Calmon R, Maceira JP, Cuzzi T, Silva CSC. Melanoma cutâneo: estudo prospectivo de 65 casos. *An Bras Dermatol*. 2005;80(1):25-34.

Ferrari Junior NM, Muller H, Ribeiro M, Maia M, Sanches Junior JA. Cutaneous melanoma: descriptive epidemiological study. *An Bras Dermatol*. 2011;86(6):1239-41.

Finn L, Markovic SN, Joseph RW. Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. *BMC Med*. 2012 Mar 2;10:23.

Fitzpatrick TB *et al*. *Tratado de Dermatologia*. Rio de Janeiro: Editora REVINTER Ltda, 2005.

Flaherty KT. Chemotherapy and targeted therapy combinations in advanced melanoma. *Clin Cancer Res*. 2006 Apr 1;12(7 Pt 2):2366-2370.

Ford D, Bliss JM, Swerdlow AJ, Armstrong BK, Franceschi S, Green A, Holly EA, Mack T, MacKie RM, Osterlind A, *et al*. Risk of cutaneous melanoma associated with a family history of the disease. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). *Int J Cancer*. 1995 Aug 9;62(4):377-81.

Gershenwald JE, Soong SJ, Balch CM. American Joint Committee on Cancer (AJCC) Melanoma Staging Committee, 2010 TNM staging system for cutaneous melanoma...and beyond. *Ann Surg Oncol*. 2010 Jun;17(6):1475-7.

Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redson MS, Haluska FG. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2006 Jan;126(1):154-60.

Gosh P, Chin L. Genetics and genomics of melanoma. *Expert Rev Dermatol.* 2009 Apr 1;4(2):131.

Göppner D, Leverkus M. Prognostic parameters for the primary care of melanoma patients: what is really risky in melanoma? *J Skin Cancer.* 2011;2011: 521947. Epub 2011 Oct 11.

Gorden A, Osman I, Gai W, He D, Huang W, Davidson A, Houghton AN, Busam K, Polsky D. Analysis of BRAF and N-RAS mutations in metastatic melanoma tissues. *Cancer Res.* 2003 Jul 15;63(14):3955-7.

Hacker E, Hayward NK, Dumenil T, James MR, Whiteman DC. The association between MC1R genotype and BRAF mutation status in cutaneous melanoma: findings from an Australian population. *J Invest Dermatol.* 2010 Jan;130(1):241-8.

Hersey P, Bastholt L, Chiarion-Sileni V, Cinat G, Dummer R, Eggermont AM, Espinosa E, Hauschild A, Quirt I, Robert C, Schadendorf D. Small molecules and targeted therapies in distant metastatic disease. *Ann Oncol.* 2009 Aug;20 Suppl 6:35-40.

Homsy J, Kashani-Sabet M, Messina JL, Daud A. Cutaneous melanoma: prognostic factors. *Cancer Control.* 2005 Oct;12(4):223-9.

Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, Clark WH Jr, Tucker MA, Dracopoli NC. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet.* 1994 Sep;8(1):15-21.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). Disponível em <[www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>. Acesso em:30.07.2012

Janku F, Lee JJ, Tsimberidou AM, Hong DS, Naing A, Falchook GS, Fu S, Luthra R, Garrido-Laguna I, Kurzrock R. PIK3CA mutations frequently coexist with RAS and BRAF mutations in patients with advanced cancers. *PLoS One.* 2011;6(7):e22769. Epub 2011 Jul 29.

Jou PC, Feldman RJ, Tomecki KJ. UV protection and sunscreens: What to tell patients. *Cleve Clin J Med.* 2012 Jun;79(6):427-36.

Jung JE, Falk TM, Bresch M, Matias JEF, Boer AJ. BRAF mutations in cutaneous melanoma: no correlation with histological prognostic factors or overall survival. *J Bras Patol Med Lab.* 2010;46(6):487-493.

Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia básica.* 10 ed. Guanabara Koogan, 2004.

Lang J, MacKie RM. Prevalence of exon 15 BRAF mutations in primary melanoma of the superficial spreading, nodular, acral and lentigo maligna subtypes. *J Invest Dermatol.* 2005 Sep;125(3):575-9.

Lázár V, Ecsedi S, Szöllosi AG, Tóth R, Vizkeleti L, Rákosy Z, Bégány A, Adány R, Balázs M. Characterization of candidate gene copy number alteration in the 11q13

region along with BRAF and NRAS mutations in human melanoma. *Mod Pathol*. 2009 Oct;22(10):1367-78. Epub 2009 Jul 24.

Lee DA, Cohen JA, Twaddell WS, Palacios G, Gill M, Levit E, Halperin AJ, Mones J, Busam KJ, Silvers DN, Celebi JT. Are all melanomas the same? Spitzoid melanoma is a distinct subtype of melanoma. *Cancer*. 2006 Feb 15;106(4):907-13.

Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol*. 2011 Apr;164(4):776-84.

Lemech C, Infante J, Arkenau HT. The potencial for BRAF V600 inhibitors in advanced cutaneous melanoma: rationale and latest evidence. *Ther Adv Med Oncol*. 2012 Mar;4(2):61-73.

Libra M, Malaponte G, Navolanic PM, Gangemi P, Bevelacqua V, Proietti L, Bruni B, Stivala F, Mazzarino MC, Travali S, McCubrey JA. *Cell Cycle*. 2005 Oct;4(10):1382-4.

Liu W, Kelly JW, Trivett M, Murray WK, Dowling JP, Wolfe R, Mason G, Magee J, Angel C, Dobrovic A, McArthur GA. Distinct clinical and pathological features are associated with the BRAF (T1799A(V600E)) mutation in primary melanoma. *J Invest Dermatol*. 2007 Apr;127(4):900-5. Epub 2006 Dec 7.

Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, Hughes TM, Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 1;29(10):1239-46. Epub 2011 Feb 22.

Lovly CM, Dahlman KB, Fohn LE, Su Z, Dias-Santagata D, Hicks DJ, Hucks D, Berry E, Terry C, Duke M, Su Y, Sobolik-Delmaire T, Richmond A, Kelley MC, Vnencak-

Jones CL, Iafrate AJ, Sosman J, Pao W. Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trial. *PLoS One*. 2012;7(4):e35309. Epub 2012 Apr 20.

MacKie RM, Hauschild A, Eggermont AM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol*. 2009 Aug;20 Suppl 6:vii-7.

Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain NA, Busam K, Kageshita T, Ono T, Albertson DG, Pinkel D, Bastian BC. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Dec 17;95(24):1878-90.

Menzies AM, Visintin L, Chatfield MD, Carlino MS, Howle JR, Scolyer RA, *et al*. BRAF mutations by age-decade and body mass index in metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2011 29 (Suppl.): abstract 10523.

Murali R, Hughes MT, Fitzgerald P, Thompson JF, Scolyer RA. Interobserver variation in the histopathologic reporting of key prognostic parameters, particularly clark level, affects pathologic staging of primary cutaneous melanoma. *Ann Surg*. 2009 Apr;249(4):641-7.

Narita N, Tanemura A, Murali R, Scolyer RA, Huang S, Arigami T, Yanagita S, Chong KK, Thompson JF, Morton DL, Hoon DS. Functional RET G691S polymorphism in cutaneous malignant melanoma. *Oncogene*. 2009 Aug 27;28(34):3058-68.

Nasser N. UVB: suscetibilidade no melanoma maligno. *Na Bras Dermatol*. 2010 85(6):843-8.

Nucera C, Lawler J, Hodin R, Parangi S. The BRAF V600E mutation: what is it really orchestrating in thyroid cancer? *Oncotarget*. 2010 Dec 1(8):751-6.

Palmer JS, Duffy DL, Box NF, Aitken JF, Gorman EL, Green AC, Hayward NK, Martin NG, Sturm RA. Melanocortin-1 Receptor Polymorphisms and Risk of Melanoma: Is the Association Explained Solely by Pigmentation Phenotype? *Am J Hum Genet.* 2000 66:176-186.

Palmieri G, Capone M, Ascierto ML, Gentilcore G, Stroncek DF, Casula M, Sini MC, Palla M, Mozzillo N, Ascierto PA. Main roads to melanoma. *J Transl Med.* 2009 Oct 14;7:86.

Piazza C, Sampaio SAP. Remissão de lentigo maligno extenso após tratamento com imiquimod. *An Bras Dermatol.* 2009;84:82-4.

Qi RQ, He L, Zheng S, Hong Y, Ma L, Zhang S, Zhao L, Guo X, Wang Y, Yu JY, Fu L, Zhang C, Chen G, Lin J, Wang C, Zhou L, Mi Q, Weiland M, Chen JZ, McHenga SS, Wang YK, McHepange U, Wang Z, Chen HD, Gao XH. BRAF exon 15 T1799A mutation is common in melanocytic nevi, but less prevalent in cutaneous malignant melanoma, in Chinese Han. *J Invest Dermatol.* 2011 May;131(5):1129-38. Epub 2011 Feb 17.

Rager EL, Bridgeford EP, Ollila DW. Cutaneous melanoma: update on prevention, screening, diagnosis, and treatment. *Am Fam Physician.* 2005;72(2):269-76.

Rubinstein JC, Sznol M, Pavlick AC, Ariyan S, Cheng E, Bacchiocchi A, Kluger HM, Narayan D, Halaban R. Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *J Transl Med.* 2010 Jul 14;8:67.

Rushworth LK, Hindley AD, O'Neill E, Kolch W. Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Mol Cell Biol.* 2006 Mar;26(6):2262-72.

Saldanha G, Potter L, Daformo P, Pringle JH. Cutaneous melanoma subtypes show different BRAF and NRAS mutation frequencies. *Clin Cancer Res.* 2006 Aug 1;12(15):4499-505.

Scherer D, Rachakonda PS, Angelini S, Mehnert F, Sucker A, Egberts F, Hauschild A, Hemminki K, Schadendorf D, Kumar R. Association between the germline MC1R variants and somatic BRAF/NRAS mutations in melanoma tumors. *J Invest Dermatol.* 2010 Dec;130(12):2844-8. Epub 2010 Aug 19.

Schuchter L, Schultz DJ, Synnestvedt M, Trock BJ, Guerry D, Elder DE, Elenitsas R, Clark WH, Halpern AC. A prognostic model for predicting 10-year survival in patients with primary melanoma. The Pigmented Lesion Group. *Ann Intern Med.* 1996 Sep 1;125(5):369-75.

Sekulic A, Haluska P Jr, Miller AJ, Genebriera De Lamo J, Ejadi S, Pulido JS, Salomao DR, Thorland EC, Vile RG, Swanson DL, Pockaj BA, Laman SD, Pittelkow MR, Markovic SN. Melanoma Study Group of Mayo Clinic Cancer Center Malignant melanoma in the 21<sup>st</sup> century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clin Proc.* 2008 Jul;83(7):825-46.

Shibata T, Kobuku A, Miyamoto M, Sasajima Y, Yamazaki N. Mutant IDH1 confers an in vivo growth in melanoma cell line with BRAF mutation. *Am J. Pathol.* 2011 Mar;178(3):1395-402.

Siegel R, Desantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S, Lin C, Leach C, Cannady RS, Cho H, Scoppa S, Harchey M, Kirch R, Jemal A, Ward E. Cancer treatment and survivorship statistics 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012 Jul;62(4):220-41. Epub 2012 Jun 14

Smalley KS. Understanding melanoma signaling networks as the basis for molecular targeted therapy. *J Invest Dermatol.* 2010 Jan;130(1):28-37.

Spatz A, Gimotty PA, Cook MG, Van Den Oord JJ, Desai N, Eggermont AM, Keilholz U, Ruiter DJ, Mihm MC. Protective effect of a brisk tumor infiltrating lymphocyte infiltrate in melanoma: An EORTC melanoma group study Part I. 2007;25(18):8519.

Spatz A, Stock N, Batist G, van Kempen LC. The biology of melanoma prognostic factors. *Discov Med.* 2010 Jul;10(50):87-93.

Sortino-Rachou AM, Curado MP, Latorre MRDO. Melanoma cutâneo: estudo de base populacional em Goiânia, Brasil, de 1988 a 2000. *An Bras. Dermatol.* 2006;81(5):449-55.

Sullivan RJ, Flaherty KT. BRAF in Melanoma: Pathogenesis, Diagnosis, Inhibition, and Resistance. *J Skin Cancer.* 2011;2011:423239. Epub 2011 Nov 17.

Thomas NE, Berwick M, Cordeiro-Stone M. Could BRAF mutations in melanocytic lesions arise from DNA damage induced by ultraviolet radiations? *J Invest Dermatol.* 2006 Aug;126(8):1693-6.

Thompson JF, Soong SJ, Balch CM, Gershenwald JE, Ding S, Coit DG, Flaherty KT, Gimotty PA, Johnson T, Johnson MM, Leong SP, Ross MI, Byrd DR, Cascinelli N, Cochran AJ, Eggermont AM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Sondak VK. Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: na analysis of patients in the multi-institucional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database. *J Clin Oncol.* 2011 Jun 1;29(16):2199-205. Epub 2011 Apr 25.

UCSC Genome. Disponível em <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&hgFind=omimGeneAcc&position=164757>. Acesso em 30/07/2012.

Venesio T, Chiorino G, Balsamo A, Zaccagna A, Scatolini M, Pisacane A, Sarotto I, Picciotto F, Risio M. In melanocytic lesions the fraction of BRAF V600E alleles is associated with sun exposure but unrelated to ERK phosphorylation. *Mod Pathol*. 2008;21:716-26.

Vidwans SJ, Flaherty KT, Fisher DE, Tenenbaum JM, Travers MD, Shrager J. A melanoma molecular disease model. *PloS One*. 2011 Mar 30;6(3):e18257.

Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, Pinkel D, Bastian BC. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med*. 2008 Jun 3;5(6):e120.

de Vries E, Nijsten TE, Visser O, Bastiaannet E, van Hattem S, Janssen-Heijnen ML, Coebergh JW. Superior survival of females among 10,538 Dutch melanoma patients is independent of Breslow thickness, histologic type and tumor site. *Ann Oncol*. 2008 Mar;19(3):583-9. Epub 2007 Oct 31.

Whiteman DC, Green AC. A risk prediction tool for melanoma? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Apr;14(4):761-3.

Whiteman DC, Valery P, McWhirter W, Green AC. Risk factors for childhood melanoma in Queensland, Australia. *Int J Cancer*. 1997 Jan 6;70(1):26-31.

Whiteman DC, Watt P, Purdie DM, Hughes MC, Hayward NK, Green AC. Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Jun 4;95(11):806-12.

Wojciechowska K, Lewinski A. *Braf* mutations in papillary thyroid carcinoma. *Endocr Regul.* 2006 Dec;40(4):129-38.

Xing M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2005 Jun;12(2):245-62.

ANEXO I:

Termo de aprovação do projeto no CEP/ACCG

PROTOCOLO CEP/ACCG Nº 049/2010

Colônia, 02/12/2010

**INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES):** Dra. Vera Aparecida Saddi

**PESQUISADORA PARTICIPANTE:** Dra. Isabela Jobé Wastowski

**TÍTULO:** Mecanismos moleculares envolvidos no escape imunológico de tumores.

**Área Temática:** Grupo I – Genética Humana

**Área de Conhecimento:** Ciências da Saúde/Medicina

**Local de Realização:** Hospital Araújo Jorge/ACCG /Setor de Cabeça e Pescoço, Departamento de Pele e Tórax e Setor de Anatomia Patológica.

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG analisou e aprovou o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e os mesmos foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O Pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/ACCG, relatórios semestrais de andamento da pesquisa, encerramento, conclusão (des), resultados e publicação (des).

O CEP/ACCG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (*Manual Operacional Para Comitês de Ética em pesquisa - Item 11*)

  
Dr. Cícero Paulo Carneiro Filho  
Vice-Coordenador do CEP/ACCG



ASSOCIAÇÃO DE COMITÊS DE ÉTICA EM PESQUISA DO ACRE

(62) 3679-7000 / 3243-7000  
Rua 139, nº 205, St. Universitário  
Colônia - Goiás - Brasil - CEP 74.505-070  
www.accg.org.br