

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO DE FATORES GENÉTICOS ENVOLVIDOS NO MELANOMA
CUTÂNEO**

Autor: Renato Marchiori Bakos

Orientador: Prof. Dr. Roberto Giugliani

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Ashton-Prolla

TESE DE DOUTORADO

2009

O presente trabalho foi resultado de uma cooperação entre o Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e o Departamento de Dermatologia da Universidade Ludwig-Maximilian de Munique, Alemanha. Os estudos foram orientados pelo Prof. Dr. Roberto Giugliani e pela Prof^a. Dr^a. Patrícia Ashton-Prolla no Brasil e pelo Prof. Thomas Ruzicka e pela Prof^a. Carola Berking na Alemanha. A parte experimental foi realizada no Laboratório de Onco-dermatologia do Departamento de Dermatologia da Universidade Ludwig-Maximilian de Munique e foi possibilitada através de uma bolsa de estudos concedida por convênio entre o Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e o *Deutscher Akademischer Austausch Dienst* (DAAD).

À Mariana, com muito carinho.

2. AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Giugliani por aceitar este orientando e pela solicitude, ensinamentos e apoio em todas as etapas do projeto. Agradeço a oportunidade de tê-lo como orientador e pelo exemplo de grande pesquisador.

À Prof^ª. Dr^ª. Patricia Ashton Prolla por ser a maior incentivadora para a realização deste projeto, pela excelência em transmitir seus ensinamentos e pela forma segura e dedicada com que conduz as relações com seus orientandos.

Ao Prof. Dr. Thomas Ruzicka por proporcionar-me a oportunidade de estudar e trabalhar em uma das maiores instituições dermatológicas do mundo e por todos seus ensinamentos.

À Prof^ª. Dr^ª. Carola Berking pelo incansável auxílio durante a adaptação e o trabalho em Munique. Agradeço pelo exemplo de dermatologista e pela empolgação com que exerce suas atividades profissionais.

Ao Prof. Dr. Lucio Bakos pelo carinho e apoio nestes anos de estudo, sempre compartilhando seu vasto conhecimento dermatológico.

Às Dr^ªs. Gabriela Goettems Zoratto, Janaina Mesalira Godinho, Nicolle Gollo Mazzotti por acreditarem no projeto e pela sua doação na seleção e avaliação de pacientes.

Ao biólogo Dr. Robert Besch pelos ensinamentos nas etapas laboratoriais realizadas em Munique.

À coordenadora do Laboratório de Terapia Gênica, Dr^ª. Ursula Matte, e a sua equipe, especialmente, Andressa Almeida e Fernanda Pereira pela excelência de seu trabalho na extração de DNA e ao Sr. Vilmar Moreira pelas coletas de amostras.

À Sra. Claudia Kammerbauer, ao biólogo Tobias Hohenauer, à bióloga Daniela Senft, à Sra. Erika Sander Muller e a Sra. Ursula Naegele pelo auxílio concedido no dia-a-dia de trabalho no Laboratório em Munique.

Ao biólogo Prof. Dr. Richard Sturm pelo fornecimento de anticorpos para o estudo do artigo 2 e por auxiliar na revisão do mesmo.

À Marylin Agranonik, estatística do GPPG-HCPA, e ao grupo de estatísticos da Universidade Ludwig-Maximilian de Munique pelo apoio na análise estatística.

À professora Prof^ª. Dr^ª. Tania Ferreira Cestari e ao Prof. Luiz Fernando Bopp Muller pelos ricos ensinamentos dermatológicos durante toda minha formação.

Às Funcionárias do GPPG-HCPA, Sra. Marta Dotto, Sra. Eliane Reisdorfer e Sra. Indara Saccilotto pelo auxílio no transporte das amostras ao exterior.

À Dr^ª. Nathália Solés Masiero pelo apoio, pela amizade e por aceitar tarefas que viabilizaram minha permanência no exterior.

À Dr^ª. Patricia Koehler Santos e a Juliana Giacomazzi pelo auxílio na formatação de partes da tese.

Às Dr^ªs Marlene Laks Weissbluth, Márcia Salette Zampese, Isabel Cristina Palma Kuhl, Ane Simões Pires, Mirian Pargendler Peres pela fraterna convivência durante minha formação.

Aos residentes e cursistas em Dermatologia e aos contratados do Serviço de Dermatologia do HCPA pelo precioso encaminhamento de pacientes para o projeto.

Aos funcionários dos Serviços de Dermatologia, em especial, a Sra. Bernadete Hahmeyer e a Sra. Regina Júlia da Silveira pelo auxílio em tarefas administrativas.

À minha mãe, Margaret, ao meu irmão, Mauricio, aos queridos Daniela, Felipe, Roberta, Carolina, Marion, Adalberto e demais familiares pela compreensão e carinho em todos os momentos.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela doação pessoal, conhecimentos e incentivo que oferecem nesta difícil e bem cumprida tarefa de formar novos mestres e doutores.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao DAAD (*Deutscher Akademischer Austausch Dienst*) pelo auxílio financeiro sob a forma de bolsa de estudos.

Aos pacientes por consentir em participar do estudo e pelo seu espírito de coletividade em prol do avanço da ciência.

SUMÁRIO

1. DEDICATÓRIA.....	03
2. AGRADECIMENTOS.....	04
3. LISTA DE ABREVIATURAS.....	09
4. LISTA DE FIGURAS.....	13
5. LISTA DE TABELAS.....	15
6. RESUMO.....	16
7. INTRODUÇÃO.....	17
8. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
8.1. Melanoma cutâneo: aspectos gerais.....	20
8.2. Melanoma cutâneo: fatores de risco.....	24
8.3. O gene CDKN2A.....	30
8.4. Polimorfismos do CDKN2A.....	36
8.5. Melanomagênese.....	38
8.6. Melanoma cutâneo e células-tronco tumorais.....	42
9. OBJETIVOS.....	52
9.1. Objetivos principais.....	52
9.2. Objetivos secundários.....	52
10. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	53
11. ARTIGO 1.....	66
12. ARTIGO 2.....	83
13. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	104
14. ANEXOS.....	107
14.1. Anexo A – Protocolo de avaliação dos casos de melanoma e controles no HCPA.....	107

14.2. Anexo B – Termo de consentimento livre e esclarecido dos casos aplicado no HCPA.....	110
14.3. Anexo C – Termo de consentimento livre e esclarecido dos controles aplicado no HCPA.....	112
14.3. Anexo D – Fotografia de eletroforese em gel mostrando diferentes genótipos.....	114
14.3. Anexo E – Protocolo de avaliação das lâminas de imunistoquímica utilizado na Universidade Ludwig-Maximilian de Munique.....	115
14.4. Anexo F – Fotografias das lâminas de imunistoquímica com expressão de nestina, SOX9, SOX10, BRN2 e MITF em melanomas.....	116

3. LISTA DE ABREVIATURAS

α -MSH - α -*Melanocyte Stimulating Hormone* (Hormônio estimulante de melanócitos α)

A - adenina

ABCB5 - *ATP-binding cassette –ABC* (cassete de ligação ao ATP – ABC)

AJCC - *American Joint Committee on Cancer* (Comitê Americano do Câncer)

ALM- *acrolentiginous melanoma* (melanoma acro-lentiginoso)

APAAP - *alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase* (Fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina)

ARF – *alternative reading frame* (matriz de leitura alternativa)

ASIP - *agouti signaling protein* (proteína sinalizadora *agouti*)

bp - *base pairs* (pares de base)

BMI-1 - *B-cell-specific Moloney murine leukaemia virus Integration site 1*

BRN2 – *Brain-2* (cerébro – 2)

C - citosina

CA- Califórnia

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CD20 – *cluster of differentiation 20* (grupamento de diferenciação 20)

CD24– *cluster of differentiation 24* (grupamento de diferenciação 24)

CD44– *cluster of differentiation 44* (grupamento de diferenciação 44)

CD133– *cluster of differentiation 133* (grupamento de diferenciação 133)

CD166– *cluster of differentiation 166* (grupamento de diferenciação 166)

CDKN2A - *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (Inibidor da quinase dependente da ciclina 2A)

CDK4 - *cyclin-dependent kinase 4* (*quinase dependente da ciclina 4*)

CDK6 - *cyclin-dependent kinase 6* (*quinase dependente da ciclina 6*)

CNS – *Central nervous system* (Sistema Nervoso Central)

DAAD – *Deutscher akademischer Austausch Dienst* (Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico)

DNA - *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

dNTP - *deoxynucleoside triphosphates* (desoxirribonucleotídeos fosfatados)

EMT - *epithelial mesenchymal transition* (transição epitélio-mesenquimal)

ERK - *extracellular signal-regulated kinases* (quinases reguladas por sinal extracelular)

EUA – Estados Unidos da América

E2F - *Electro-acoustic 2 Factor* (fator eletro-acústico 2)

FCS/TRIS – *fetal calf serum/ tris (hydroxymetyl) aminometan* (soro fetal de bezerro / tris(hidroximetil)aminometano)

FIPE – Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos

FM – *familial melanoma* (melanoma familiar)

G- guanina

GenoMEL – *Melanoma Genetics Consortium* (Consórcio de Genética do Melanoma)

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HDM2 – *Human Double minute 2* (minuto duplo humano 2)

IC – intervalo de confiança

IgG1 – Imunoglobulina G1

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LMA – Leucemia mielóide aguda

LMM - *lentiginous malignant melanoma* (melanoma lentigo maligno)

MAPK - *Mitogen-activated protein kinase* (proteína-quinase ativada por mitógeno)

MC1R – *melanocortin receptor 1* (receptor de melanocortina 1)

MDM2- *Murine Double minute 2* (minuto duplo murino 2)

MES – melanoma de espalhamento superficial

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MITF – *Microphthalmia-associated transcription factor* (Fator de transcrição associado à microftalmia)

MMis - *in situ malignant melanoma* (melanoma *in situ*)

MPM – *multiple primary melanoma* (melanoma primário múltiplo)

mRNA – messenger ribonucleic acid (ácido ribonucléico mensageiro)

µl - microlitros

µm - micrômetros

µM - micromolar

NEDD9 - neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9

NES - *nestin* (nestina)

NMM - *nodular malignant melanoma* (melanoma nodular)

ns - *non significant* (não significativa)

OR – *odds ratio* (razão de chances)

PCR – *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PI(3)K - *phosphatidylinositol-3 quinase* (quinase de fosfatidilinositol 3)

p14 – proteína 14

p16 – proteína 16

POU – *Pituitary-specific factor, Octamer transcription factor, neural-Unc 86* (fator pituitário específico, fator de transcrição octamérico, Unc 86 neural)

pRB – proteína Retinoblastoma

PTEN - *phosphatase and tensin homolog* (homólogo da fosfatase e tensina)

RAS – *rat sarcoma* (sarcoma de rato)

RR – risco relativo

RUV – radiação ultravioleta

SCF - *Stem Cell Factor* (fator de célula tronco)

siRNA - *small-interfering RNA* (RNA de pequena interferência)

SNC – Sistema nervosa central

SNP – *single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleotídeo único)

SOX – *Sry-box*

SOX9 – *Sry-box 9*

SOX10 – *Sry-box 10*

SSM - *superficial spreading melanoma* (melanoma de espalhamento superficial)

T - timina

USA – *United States of America* (Estados Unidos da América)

UV - ultravioleta

UVA – ultravioleta A

UVB – ultravioleta B

XPC – xeroderma pigmentoso C

XPD – xeroderma pigmentoso D

4. LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 1: Figura 1: O locus CDKN2A e seus produtos.....	32
FIGURA 2: Vias de sinalização que sofrem ação oncogênica no melanoma cutâneo...	41
FIGURA 3: Gene da nestina e o <i>enhancer</i> mostrando sítios de ligação próximas para fatores de transcrição das famílias SOX e POU na região de 258-bp.....	48

ARTIGO 2

FIGURE 1: Immunohistochemical detection (in red) of (A) nestin and (B) BRN2 protein in primary melanoma. Analysis of (C) SOX9 showed an intense nuclear expression in primary melanoma and (D) a cytoplasmatic pattern in melanoma metastasis. (E) SOX10 protein was found perinuclear and cytoplasmatic in primary melanoma as well as (F) in melanoma metastasis. (200x, scale bars: 40µm.....	101
---	-----

FIGURE 2: Immunohistochemical analysis of (A + B) nestin in ulcerated primary melanoma showing stained cells within the ulcerated areas (A, 100x, scale bar: 100µm and B, 200x, scale bar: 40µm).....	102
--	-----

FIGURE 3: Immunohistochemical analysis of (A+B) MITF protein (red staining) in melanoma revealed an association of MITF expression with pigmented areas of the tumor (A, 100x, scale bar: 100µm and B, 200x, scale bar: 40µm).....	103
---	-----

ANEXO D

FIGURA D1: fragmentos de DNA após realização de PCR e digestão com enzima de restrição. Da esquerda para direita: marcador de peso molecular, caso polimórfico homozigoto (479bp), caso polimórfico heterozigoto, caso selvagem (322bp e 157bp) e controle negativo..... 114

ANEXO F

FIGURA F1: Expressão imunoistoquímica da nestina em células tumorais. (no original, x 200, APAAP – *fast red*)..... 116

FIGURA F2: Expressão imunoistoquímica de SOX9 em células tumorais demonstrando o padrão predominantemente nuclear. (no original, x 200, APAAP – *fast red*)..... 117

FIGURA F3: Expressão imunoistoquímica de SOX10 em células tumorais em áreas perinucleares e citoplásmicas. (no original, x 200, APAAP – *fast red*)..... 118

FIGURA F4: Expressão imunoistoquímica de BRN2 em células tumorais em distribuição citoplasmática. (no original, x 200, APAAP – *fast red*)..... 119

FIGURA F5: Expressão imunoistoquímica de MITF associada a células tumorais pigmentadas. (no original, x 200, APAAP – *fast red*) 120

5. LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABLE 1: Distribution of age, gender and skin type in cases and controls..... 80

TABLE 2: Genotypic and allelic frequency of A148T in melanoma cases and controls... 81

TABLE 3: Ancestry of A148T variant melanoma cases..... 82

ARTIGO 2

TABLE 1: Nestin, BRN2, SOX9 and SOX10 protein expression in melanocytic lesions and respective staining intensity (1+, weak; 2+ moderate; 3+ high)..... 98

TABLE 2: Coexpression between nestin and transcription factors BRN2, SOX9 and SOX10 in melanocytic tumors..... 99

TABLE 3: Correlation of nestin, BRN2, SOX9 and SOX10 protein expression in melanoma with clinicopathological parameters. Shown is the calculated immunoreactive score (see Material and Methods)..... 100

6. RESUMO

Diversos fatores de risco ambientais, fenotípicos e genéticos estão associados ao desenvolvimento do melanoma cutâneo. *CDKN2A* é considerado o principal gene de susceptibilidade para esta neoplasia. O polimorfismo *p.A148T* do gene *CDKN2A* parece ser um indicador de risco para o melanoma em determinadas populações. No presente estudo, a frequência de *p.A148T* foi estudada em 127 casos de melanoma e 128 controles por PCR-RFLP. Nos casos, a sua frequência foi significativamente superior do que em controles (0,126 x 0,039, $p=0,009$), demonstrando que esta variante deve ser considerada associada ao desenvolvimento do melanoma cutâneo no nosso meio como fator de risco genético para a doença. Além de identificar indivíduos geneticamente mais predispostos ao melanoma, grandes esforços têm sido empregados para o melhor entendimento dos eventos moleculares envolvidos na sua gênese. Recentemente, a teoria de que uma subpopulação de células seria responsável pela manutenção e proliferação dos tumores tem sido estudada. A presença em subgrupos de células de melanoma de uma série de marcadores, que existem em células multipotentes neurais no período embrionário e que são perdidos durante a diferenciação, seria um indício do retorno desta multipotencialidade. Reconhecer este subgrupo de células fenotipicamente distinto e estudar a sua via de ativação seria de extrema importância para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para casos avançados. A expressão imunohistoquímica da nestina, uma proteína freqüente na embriogênese neural, e de fatores de transcrição da família POU e SOX, envolvidos na sua ativação, foi estudada. Expressões aumentadas das proteínas foram encontradas nos tecidos de melanoma em relação a nevos. Além disso, observou-se coexpressão de nestina com SOX9 e SOX10, mostrando seu papel principal na ativação. A associação da nestina com ulceração e de SOX9 com tumores mais avançados pode indicar que o perfil de expressão destas proteínas seja um biomarcador de valor prognóstico.

7. INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é uma neoplasia potencialmente fatal e que apresenta um aumento sensível de sua incidência nas populações brancas de diversos países do mundo (1). Sua etiologia é heterogênea e complexa, porém estudos recentes vêm tentando contribuir para a compreensão dos principais mecanismos envolvidos na patogênese desta neoplasia e, também, para a composição de grupos de indivíduos que possam apresentar maior risco.

A prevenção primária do melanoma baseia-se em reconhecer os pacientes mais susceptíveis a desenvolvê-lo, tendo as características fenotípicas dos indivíduos como um dos principais aspectos. Além disso, a realização de campanhas educacionais com o intuito de orientar a população quanto aos riscos associados à fotoexposição exagerada, a uma necessidade de fotoproteção nestes momentos e ao diagnóstico precoce do melanoma também fazem parte desta estratégia.

Ainda, sabe-se que uma parcela de pacientes com melanoma pode apresentar mutações em genes que codificam proteínas de importante ação supressora tumoral. O gene *CDKN2A* é o principal deles. Este gene localiza-se no cromossomo 9p21 e é considerado o gene de maior susceptibilidade ao desenvolvimento melanoma cutâneo até hoje descrito (2). Mutações germinativas do *CDKN2A* são detectadas em uma frequência de 5 a 46% das famílias com melanomas hereditários e melanomas primários múltiplos, dependendo do número de afetados na família e da população estudada e, em muito menor frequência, em casos esporádicos (3).

A variante c.442G>A do gene *CDKN2A*, também denominada *p.A148T*, está presente em 1,5 a 2,9% da população geral (4,5). Dados conflitantes são encontrados em

diferentes grupos étnicos quanto a sua implicação em susceptibilidade ao melanoma (4,6-8). No nosso meio, Ashton-Prolla e colaboradores avaliando pacientes com melanoma hereditário, observaram a ocorrência deste polimorfismo em 13% dos pacientes da amostra (9).

Faltam estudos que definam a ocorrência do polimorfismo *p.A148T* em nosso meio, assim como, o risco de melanoma associado a ele, visto que, em casos de melanoma hereditário, sua ocorrência parece ter uma frequência significativa. Cada vez mais, torna-se importante reconhecer o padrão genotípico de uma população para melhor compreender aquelas variantes genéticas que possam representar um determinado risco de neoplasia.

Avaliar a presença de variantes genéticas em genes de alta susceptibilidade na população é de extrema importância para a identificação de subgrupos de indivíduos que possam apresentar um maior risco de desenvolver o melanoma e, conseqüentemente, fortalecer e direcionar medidas de prevenção primária desta neoplasia. Além disso, grandes esforços também têm sido direcionados para o reconhecimento dos diferentes eventos que caracterizam o desenvolvimento biológico do melanoma e, desta forma, colaborar com o surgimento de novas medidas terapêuticas capazes de bloquear a proliferação desta temível neoplasia.

Dados recentes demonstram que uma subpopulação de células tumorais no melanoma é capaz de re-expressar proteínas usualmente expressas em células progenitoras de origem neuronal durante o período embrionário (10). Esta observação poderia significar que este subgrupo de células, também denominadas de células-tronco tumorais, teria um maior poder proliferativo, poderia ser um facilitador do crescimento e migração tumoral através da expressão de proteínas específicas e, conseqüentemente, seria responsável pela resistência tumoral aos tratamentos adjuvantes atuais (11,12).

A nestina é um filamento intermediário usualmente com expressão em células proliferativas de origem neural durante a embriogênese. Após este período, a nestina já foi identificada em diferentes processos patológicos do sistema nervoso central (SNC) (13,14). Em melanomas, sua expressão parece estar associada à proliferação e migração tumoral (15). A sua ativação é controlada por fatores de transcrição, principalmente, da família do domínio POU e da família SOX (10). Enquanto no período embrionário, os fatores de transcrição POU, especialmente, BRN2 parecem ter um papel mais importante na ativação da nestina, estudo recente demonstrou em células de melanoma, *in vitro*, que os fatores SOX9 e SOX10 seriam os principais ativadores nestas células (10,16). Faltam estudos na literatura que avaliem o perfil de expressão *in vivo* da nestina e de seus principais ativadores; e que correlacionem a presença destas proteínas com critérios clínicos de progressão e prognóstico da doença.

8. REVISÃO DA LITERATURA

8.1. Melanoma cutâneo– Aspectos gerais

Definição

O melanoma (CID C43) é definido atualmente como uma neoplasia maligna derivada de melanócitos. Esta transformação é resultante de interações entre fatores genéticos, constitucionais e ambientais (17,18). O melanoma pode ocorrer, primariamente, em diversos tecidos como o trato urinário, o globo ocular, o sistema auditivo, o tubo digestivo, o sistema nervoso central, entre outros, porém o melanoma primário de pele é o mais frequente, sendo responsável pela grande maioria dos casos de tumores primários diagnosticados (19).

Aspectos epidemiológicos e clínicos

As crescentes taxas de incidência do melanoma cutâneo, que vêm ocorrendo em regiões de população branca de todo o mundo, conduziram o melanoma cutâneo a um status de enfermidade de manejo e prevenção prioritários em termos de saúde pública em alguns destes países (1,20-34). Em contraste aos níveis de incidência observados, as taxas de mortalidade têm aumentado de maneira menos dramática (35). Como exemplo, levantamentos realizados na população norte-americana demonstraram que no período de 1975 a 1989 houve um aumento de 1,6% na mortalidade geral por melanoma e, desde então, as taxas de mortalidade mantiveram-se estabilizadas (20,28,36). O diagnóstico precoce associado ao aprimoramento de novas técnicas diagnósticas, como a dermatoscopia, tem papel fundamental neste processo de estabilização (1,37). Estratégias de controle da doença em nível populacional como instalações de sistema de registro compulsório de casos novos e de programas de controle e prevenção da doença

também são fundamentais para um melhor entendimento e manejo do melanoma (36,38-40).

No Brasil, a incidência de melanoma também vem aumentando (41). Entretanto, faltam formas de aferição mais precisas sobre sua taxa real de ocorrência em nosso meio (42). Segundo a estimativa do INCA para 2008, mais de 6000 casos novos de melanoma foram diagnosticados no Brasil naquele ano. A maior taxa de incidência é observada na região sul: 8,52 e 8,59 casos novos /100.000 habitantes/ano no sexo masculino e feminino, respectivamente (43). Em um levantamento de base populacional realizado em Passo Fundo, observou-se uma incidência geral de 5,67 casos novos /100.000 habitantes/ ano (44).

Poucos estudos populacionais abordaram as taxas reais de incidência do melanoma em outros países latinoamericanos. Fatores étnicos contribuem para a aferição de baixas taxas de melanoma nestes países (45). Mesmo assim, alguns relatos apontam um crescimento da incidência em determinadas regiões. Na cidade de Punta Arenas, extremo sul chileno (53°S), observou-se um aumento na incidência de 1,1 para 1,9 casos por 100000 habitantes nas últimas décadas, que foi associado à diminuição da camada de ozônio antártica (27). Um aumento da mortalidade pelo melanoma também ficou evidenciado naquele país (46). Na Argentina, dados da década de 90 mostram uma mortalidade de 0,7 e 0,4/100000 habitantes em homens e mulheres, respectivamente (47).

Dados mais precisos com relação às taxas de incidência e mortalidade do melanoma são observados em países desenvolvidos. Na Austrália, país com a maior incidência de melanoma no mundo, observa-se um aumento da incidência nos sexos masculino e feminino, respectivamente, para 41,4 e 31,3 casos/ 100.000 habitantes. Isto significa um aumento de, respectivamente, 22 % e 12% nas taxas de incidência nos últimos 10 anos (1). Entretanto, dados um pouco mais alentadores foram relatados

recentemente por Whiteman e colaboradores na Oceania. Neste estudo, foram avaliadas as taxas de incidência em dois estados australianos e observou-se que, ao analisar a frequência de novos casos de acordo com faixas etárias, a taxa de incidência em jovens no estado de Queensland parecia estar atingindo uma estabilização, o que poderia significar um efeito positivo das campanhas de prevenção primária realizadas já há algum tempo naquela região. (48) A Nova Zelândia é a segunda maior incidência mundial do melanoma com taxas de incidência de 36,5/100000 e 33,2/100000, respectivamente, para homens e mulheres (29). Nos Estados Unidos, o crescimento da taxa de incidência geral de melanoma é de 2,9%/ano conferindo valores atuais para homens e mulheres, respectivamente, de 24,6 e 15,6 casos novos/100.000 habitantes/ ano (20). Entretanto, a taxa de crescimento na incidência observada de 1975 a 1981 é inferior àquela do período 1981-2005, sugerindo que talvez se esteja no caminho de atingir um platô (28).

Na Europa, diversos trabalhos confirmam o aumento na incidência do melanoma. Um grande levantamento sobre a incidência de câncer na França demonstrou um aumento de 5% ao ano nos casos de melanoma, nos últimos 20 anos (49). Nas últimas 3 décadas, observou-se um aumento progressivo da incidência dos melanomas em todas as faixas etárias no Reino Unido (34). Na Alemanha, um aumento de 3 vezes o número absoluto de casos novos foi identificado no mesmo período (50). A exemplo do que foi detectado em outras populações, diagnósticos mais precoces parecem estar ocorrendo entre os alemães. Um levantamento do Registro Central de Melanomas da Alemanha avaliou 70.000 melanomas diagnosticados desde 1975 e observou que a espessura média de Breslow dos tumores detectados no período decresceu de 2,5 mm para 1,3 mm (40).

Os melanomas cutâneos são classificados em grupos de acordo com características clínicas e histopatológicas. A classificação que é utilizada até hoje foi desenvolvida há aproximadamente 40 anos atrás. Para tanto, diferentes características

tumorais como os crescimentos intraepidérmico e dérmico das células neoplásicas, a presença de alterações epidérmicas (ulceração, atrofia) e de elastose, o nível anatômico de invasão tumoral, a espessura vertical tumoral máxima, a atividade mitótica ou o padrão de resposta imunológica foram analisados, assim como características comuns aos pacientes como os hábitos de exposição solar, a idade, o sexo e o sítio anatômico de apresentação dos tumores. A partir destes dados, importantes índices e classificação para caracterização do melanoma foram descritos. Como exemplos, cita-se o índice ou espessura de Breslow, que mede a espessura tumoral e é considerado o principal índice prognóstico e a seguinte classificação em subtipos clínico-histopatológicos(51):

- Melanoma de espalhamento superficial (MES): é o subtipo mais frequente de melanoma cutâneo em peles claras, sendo responsável por aproximadamente 70% dos casos entre os indivíduos deste tipo (17). O MES pode surgir em qualquer área da superfície corporal, porém a maioria dos casos no sexo masculino ocorre no tronco e, nas mulheres, nos membros inferiores (52). Isto corrobora a idéia de que o MES esteja associado a um padrão sazonal de exposição solar frequentemente associado ao lazer, já que estas são áreas usualmente fotoprotegidas (26). O MES apresenta duas fases de crescimento: o crescimento radiado que costuma durar de 1 a 5 anos e que a lesão aumenta em superfície. Após este período, apresenta uma fase de invasão da derme (crescimento vertical) com maior poder de penetração (17).

- Melanoma nodular: o melanoma nodular não costuma apresentar fase radial de crescimento detectável, podendo esta ser efêmera. De qualquer modo, ocorre invasão dérmica precoce. Desta forma, caracteriza-se por apresentar evolução mais rápida que os outros subtipos. O tronco costuma ser a área de predileção deste subtipo (53). É responsável por, aproximadamente, 15% dos casos de melanomas. Assim como o MES, sua incidência é associada a um padrão intermitente de exposição solar (51).

- Lentigo maligno melanoma (LMM): contrastando com os 2 subtipos anteriores, o LMM está associado a um padrão crônico de exposição solar e, conseqüentemente, ocorre com maior frequência nas áreas cronicamente fotoexpostas, como a face e o pescoço. Seu crescimento é lento e insidioso, podendo permanecer em fase radial de crescimento por 10 a 15 anos (51,54).

- Melanoma acro-lentiginoso: também chamado lentiginoso acral, é o subtipo mais raro de melanoma em caucasianos. Caracteriza-se por surgir em áreas acrais, principalmente, regiões palmares e plantares (55). Sua incidência é baixa na população branca, porém é o subtipo mais comum entre outros grupos étnicos, como os afro-descendentes, os hispânicos e os asiáticos. Sua ocorrência parece não ter associação com a fotoexposição (17).

8.2. Melanoma cutâneo– Fatores de risco

Fatores de risco de origem ambiental e uma série de características fenotípicas ou constitucionais dos indivíduos, que, por vezes, podem estar associados a fatores genéticos, estão implicados em maior risco para o desenvolvimento de melanomas. A seguir, os principais fatores de risco para esta neoplasia serão abordados.

Fatores ambientais

- Radiação ultravioleta: diversos estudos apontam a radiação ultravioleta (RUV) como o principal fator de risco ambiental para o desenvolvimento do melanoma (56). A RUV faz parte do chamado espectro eletromagnético e compreende a faixa de comprimento de onda entre 200 e 400nm (57). A faixa que compreende a UVB, 290 a 320 nm, é considerada a mais danosa e associada à melanomagenese; entretanto, alguns estudos apontam que a UVA também poderia colaborar neste processo (58). Os principais efeitos

agudos da RUV são as queimaduras solares e mudanças imunológicas nos 10 dias que se seguem às exposições em nível local e sistêmico (56,59,60). Estudos em modelos experimentais de nevos irradiados por UVB demonstram que doses desta radiação, compatíveis com aquelas que ocorrem em queimaduras solares, levam a uma série de alterações morfológicas transitórias semelhantes a nevos atípicos e até a melanoma *in situ* (61,62). Justamente, a sucessão de episódios de queimaduras solares ao longo da vida é considerada o principal fator associado com o melanoma.

No nosso meio, estudo caso-controle avaliou 103 casos de melanoma e 206 controles e observou que mais de 30 episódios de queimaduras solares foi o principal fator de risco independente para o melanoma com um OR de 11,4 (63). Um padrão intermitente ou sazonal de exposição solar, em que os episódios de exposição solar ocorrem concentrados em uma determinada época do ano, parece estar mais associado ao desenvolvimento do melanoma (56). Este padrão de exposição solar está mais correlacionado com atividades de lazer ou atividades esportivas ao ar livre (64). Hoje em dia, um incremento no acúmulo de exposição à RUV é proveniente das câmaras de bronzeamento artificial. A utilização deste método também representa um risco associado (65), tendo sido recentemente proibido no nosso meio.

Gandini e colaboradores realizaram uma metanálise avaliando as relações entre radiação ultravioleta e melanoma. Encontraram 52 estudos caso-controle e 5 estudos de coorte passíveis de inclusão. Foram avaliados 38671 casos de melanoma em 22 países. A exposição solar de modo intermitente ou sazonal e as queimaduras solares foram os fatores de maior risco relativo médio associado com o surgimento do melanoma (RR= 1,61 e 2,03, respectivamente), principalmente, em locais de maior latitude. Já a exposição solar ocupacional apresentou uma relação inversa (56).

- Outros fatores: embora a RUV represente o principal fator de risco ambiental para o melanoma, outras situações parecem estar também implicadas no seu risco. Uma

metanálise avaliou estudos de coorte e caso-controle publicados num período de 20 anos que tivessem examinado o risco de melanoma presente em diversos grupos de trabalhadores associado a substâncias que estes usualmente entravam em contato em suas ocupações. Nestes grupos específicos, substâncias como o benzeno, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e policlorinato de bifenilo foram associados ao risco de melanoma em trabalhadores de indústrias petroquímicas, de engenharia automotiva e elétrica e de outras indústrias químicas (66). O uso doméstico e ocupacional de pesticidas também parece implicar em risco de melanoma (67).

Fatores constitucionais

- Presença quantitativa e qualitativa de nevos melanocíticos: uma parcela dos melanomas cutâneos surge em nevos pré-existentes o que caracteriza a sua importância como precursores da neoplasia. Em uma grande revisão de exames histopatológicos de melanoma, restos de nevos foram encontrados em 22% dos casos (68). Tsao e colaboradores estimam que a chance anual de conversão de cada nevo em melanoma é muito pequena (0,0005%) para pessoas com menos de 40 anos, porém aumenta, principalmente após os 60 anos de vida (23). Entretanto, a maioria dos melanomas surge *de novo* na pele. Nestes casos, os nevos melanocíticos são considerados importantes marcadores de risco para a doença. Holly e colaboradores demonstraram que a presença de mais de 50 nevos melanócitos seria o maior fator de risco constitucional para desenvolver o melanoma. Em outra metanálise realizada por Gandini e colaboradores, um risco relativo de 6,89 (IC95% 4,63- 10,25) foi encontrado para pacientes que apresentavam mais de 100 nevos (69).

Os nevos displásicos, também chamados de atípicos ou de Clark, são lesões que apresentam arquitetura celular e características histopatológicas que podem apresentar

difícil diagnóstico diferencial clínico e, até mesmo histológico, com o melanoma. A presença destes nevos específicos também é considerada um importante marcador de risco para o desenvolvimento do melanoma. Na mesma metanálise (69), um risco relativo de 6,36 (IC95% 3,80 – 10,33) foi conferido para aqueles que tinham mais de 5 nevos atípicos (69). Pacientes que apresentam nevos atípicos de caráter familiar, exemplificado na síndrome dos nevos displásicos, possuem também um risco significativo de desenvolver melanomas (70).

- Outras características fenotípicas: o melanoma é mais incidente na população branca. Desta forma, a própria cor da pele ou fototipo, assim como outras características fenotípicas encontradas em indivíduos de pele clara, são também consideradas fatores de risco para melanoma. Em metanálise publicada recentemente e que revisou 60 artigos envolvendo fatores de risco independentes, pacientes com fototipos claros apresentavam um risco relativo de 2,06 em comparação aos fototipos mais escuros para desenvolver o melanoma. Dentre os claros, pacientes com fototipo I apresentavam um risco relativo independente de 2,09 (71). Outros estudos demonstram o maior risco em pacientes com olhos ou cabelos claros (72). Olhos azuis e cabelos ruivos parecem implicar em risco relativo, respectivamente, de 1,47 e 3,64 (71). Uma grande quantidade de efélides significa, em geral, um histórico progressivo de diversas queimaduras solares. Por este motivo, sua presença também é considerada um marcador de risco para o melanoma (71). No nosso meio, Bakos e colaboradores observaram os fototipos claros (I e II) e a presença de efélides como fatores de risco independentes (63). Os mesmos autores observaram que a ancestralidade européia, principalmente alemã e italiana, também representa fator de risco para melanoma em pacientes do sul do país (73). Sinais de fotodano e história progressiva de neoplasias queratinocíticas também foram associados a risco de desenvolver a neoplasia (71).

Fatores genéticos

Pacientes que tiveram familiares de primeira, segunda ou terceira geração com melanoma apresentam um risco maior de desenvolver o tumor. A maior parte dos melanomas surge de forma esporádica, porém tumores de origem familiar representam aproximadamente 10% dos casos. Associados a estes, estão os pacientes que possuem história pessoal pregressa de melanoma. Em uma parcela destes pacientes que apresentam melanoma familiar e/ou melanomas primários múltiplos (MPM), identifica-se uma importante susceptibilidade genética ao desenvolvimento do melanoma e outros tumores que deriva de uma série de mutações germinativas em genes de alta e baixa penetrância (2).

- Mutações em genes de alta penetrância: *CDKN2A* (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) é considerado o gene de maior importância na predisposição genética do melanoma. Estima-se que aproximadamente um terço dos pacientes com melanoma familiar no mundo inteiro apresenta mutações neste gene. *CDK4* (*cyclin-dependent kinase 4*) também é considerado um gene de predisposição de alta penetrância para o melanoma apesar de mutações *CDK4* serem bem mais raras do que em *CDKN2A* (74). Somente duas mutações no gene *CDK4* foram descritas até o momento. Em ambas, ocorre uma conversão de origem autossômica dominante da quinase *CDK4* normal em um proto-oncogene (75). Adiante serão abordados aspectos pertinentes das vias de transcrição, dos produtos, da regulação e dos principais polimorfismos do gene *CDKN2A*.

- Mutações em genes de baixa penetrância: um risco aumentado de melanoma, porém inferior àquele conferido por mutações de *CDKN2A/CDK4*, também é encontrado em associação com uma série de variantes comuns de outros genes, principalmente, associados às vias de sinalização da pigmentação.

MC1R (*melanocortin-1-receptor*) é um dos genes mais importantes na determinação da pigmentação da pele e pêlos. O gene é localizado no cromossomo 16q24.3 e codifica um receptor acoplado à proteína G com afinidade pelo hormônio estimulante de melanócito alfa (α -MSH). A ligação de α -MSH com *MC1R* funcional na superfície dos melanócitos estimula a ação da tirosinase e a produção de eumelanina que determina o pigmento escuro. Enquanto a presença da eumelanina reduz o dano da RUV no DNA das células epidérmicas, a feomelanina parece ter efeito contrário. O gene *MC1R* é bastante polimórfico, sendo que mais de 80 variantes já foram descritas e determinam as diferentes cores da pele e de cabelos. Algumas das variantes levam à perda da ação funcional do receptor e resultam numa mudança de produção de eumelanina para feomelanina. Isto determina o surgimento do fenótipo conhecido como “dos cabelos vermelhos”. Neste fenótipo, os indivíduos possuem pele clara (fototipo I), presença abundante de efélides, cabelos ruivos, olhos claros, fotossensibilidade e pouca tendência a bronzear. Recente metanálise foi realizada considerando as nove variantes mais frequentemente analisadas em estudos com o gene *MC1R*. Duas variantes (p.R160W e p.D294H) foram encontradas em maior associação com risco de melanoma e com fenótipo “dos cabelos vermelhos”, enquanto que outras apresentavam somente risco para melanoma. Isto significaria que as variantes do gene *MC1R* representariam risco para melanoma não somente por vias da pigmentação (2,76,77).

Outros polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) presentes em genes da via da pigmentação como os que codificam a proteína ASIP (*agouti signaling protein*) e a tirosinase também foram implicados na susceptibilidade genética do melanoma. A ASIP

antagoniza a ligação do α -MSH com *MC1R* e estimula a produção da feomelanina. Variantes que acarretem uma maior ação da ASIP agiriam de forma análoga às variantes de *MC1R* que produzem o fenótipo “dos cabelos vermelhos” (75). Uma variante do gene da tirosinase associada à cor dos olhos também apresentou um OR de 1,15 para o desenvolvimento do melanoma em um grande estudo caso-controle com mais de 2000 pacientes e 40.000 controles (78).

Polimorfismos de genes responsáveis pelo reparo do DNA também foram implicados em risco para melanoma. Os genes *XPD* (Xeroderma pigmentoso de grupo D) e *XPC* (Xeroderma pigmentoso de grupo C) são exemplos disto. Em um estudo caso-controle, portadores da variante *AA751AA* do gene *XPD* apresentaram um OR de 2,6 para desenvolver o melanoma (79). Blankenburg e colaboradores identificaram 3 polimorfismos de *XPC* apresentando OR entre 1,82 e 1,87 para a neoplasia (80).

8.3. O GENE *CDKN2A*

Aspectos gerais

CDKN2A localiza-se na região cromossômica 9p21 e é composto por quatro éxons: 1 α , 1 β , 2 e 3. O gene codifica duas proteínas de ação supressiva tumoral e apoptótica que estão envolvidas no controle do ciclo celular. A codificação das proteínas ocorre a partir de duas vias distintas de transcrição e dois promotores diferentes: a transcrição alfa que utiliza o éxon 1 α e partes dos éxons 2 e 3 e a transcrição beta que utiliza o éxon 1 β e partes dos éxons 2 e 3 (3).

A transcrição alfa codifica a proteína p16^{INK4A}, ou simplesmente p16, que é composta por 156 aminoácidos. A p16^{INK4A} liga-se às quinases dependentes de ciclina CDK4 e CDK6 (*cyclin-dependent kinase 6*) inibindo sua ligação com a ciclina D e,

consequentemente, prevenindo a formação dos complexos CDK/Ciclina D. Estes complexos, uma vez formados, fosforilariam a proteína do retinoblastoma (pRB), permitindo que as proteínas ativadoras de transcrição E2F sejam liberadas e façam com que as células tumorais passem da fase G1. Desta forma, p16^{INK4A} desempenha seu papel de supressão tumoral, regulando negativamente o crescimento celular, retendo as células tumorais na fase G1 e impedindo sua progressão para a fase S (2).

O produto alternativo obtido a partir da via de transcrição beta; que compreende os éxons 1 β , 2 e 3; é a proteína p14^{ARF} (*alternative reading frame*). A proteína p14^{ARF} inibe a progressão do ciclo celular pelo seu efeito regulatório na proteína p53, de conhecido efeito apoptótico. No seu processo fisiológico, a p14^{ARF} inibe a ação da proteína HDM2 (*human double minute 2*), análoga da proteína murina MDM2 (*mouse double minute 2*). A proteína HDM2 agiria marcando proteínas com a ubiquitina, processo chamado de ubiquitinação, com o intuito de degradá-las pela ação dos proteossomas. No caso das mutações de CDKN2A, a inibição de HDM2 por p14^{ARF} não ocorre, permitindo a ubiquitinação e conseqüente degradação da proteína p53 pela ação proteossômica (2). A figura 1, adaptada de Fargnoli e colaboradores (2), demonstra o *locus CDKN2A* e resume as vias de transcrição α e β e seus produtos.

Mutações de perda de função em *CDKN2A* podem tornar a proteína incapaz de exercer sua atividade inibitória sobre os complexos CDK/ciclina D, provavelmente, por incapacidade de formar complexos estáveis com as quinases (81). Consequentemente, há uma perda da ação supressiva, permitindo que haja uma proliferação celular anormal e que as células possam progredir para a fase S (82). De fato, experimentos utilizando células de melanoma *in vitro* demonstraram que a maior parte das variantes transfectadas não eram capazes de inibir o crescimento de colônias de células, o que ocorria com aquelas transfectadas com a proteína da variante selvagem (83).

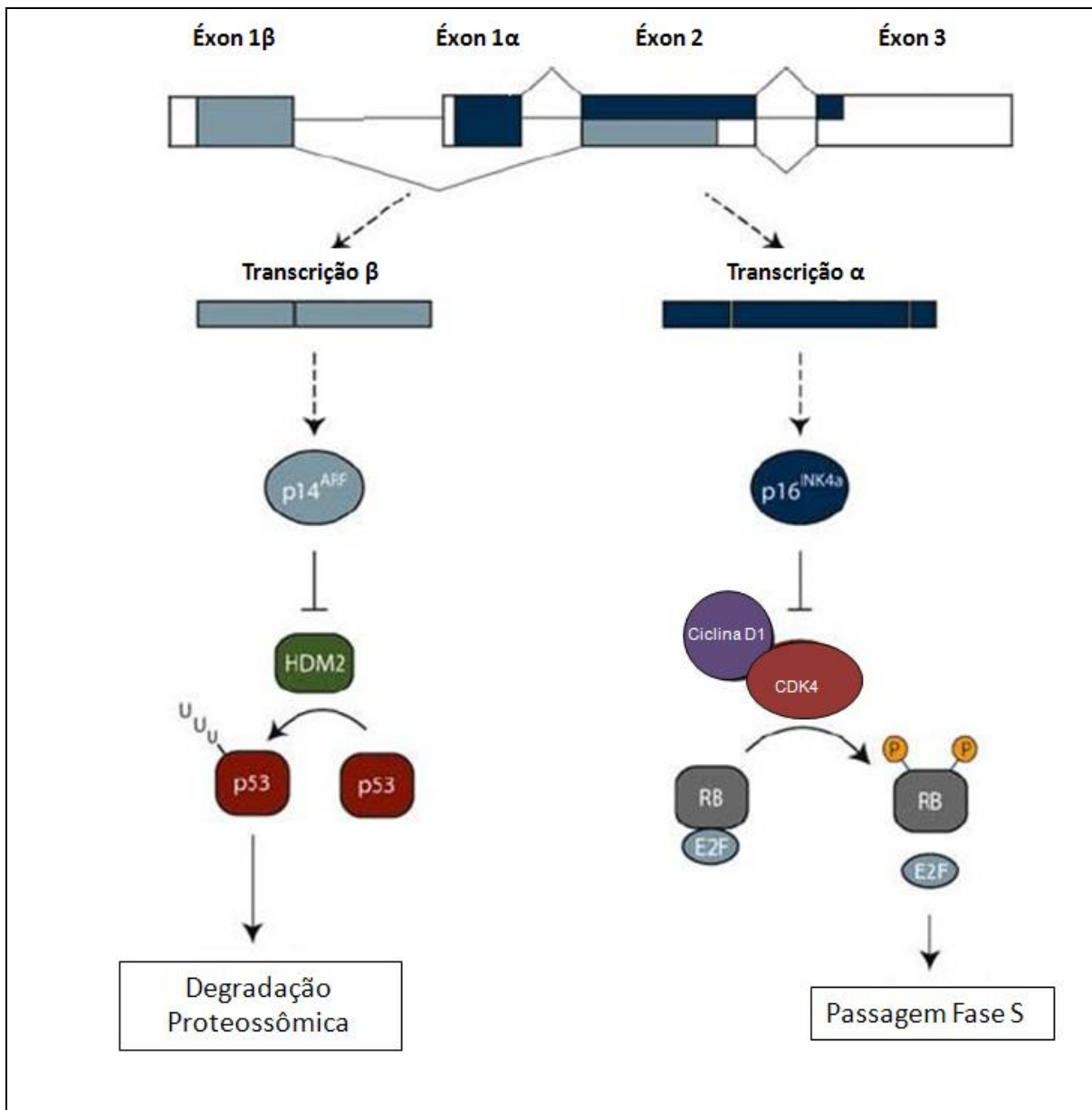


Figura 1: O locus *CDKN2A* e seus produtos.

Além disso, modelos animais também comprovaram o efeito das mutações do gene *CDKN2A* na gênese do melanoma. Camundongos *Cdkn2a-null*, desprovidos de p16^{INK4A} e da equivalente murina para a p14^{ARF} humana, desenvolvem tumores precocemente e são extremamente sensíveis à tumorigênese após o estímulo com carcinógenos (84).

A maior parte das mutações de *CDKN2A* ocorre na via de transcrição alfa, mais especificamente, nos éxons 1 α e 2 e exibe um padrão de herança autossômico dominante (3). As mutações que ocorrem no éxon 1 α afetam a via da proteína p16, enquanto que aquelas existentes no éxon 2 podem afetar tanto p16 como p14. Virtualmente todas as pessoas que carregam mutações germinativas de *CDKN2A* são heterogizotas, conseqüentemente, possuem um gene normal no cromossomo homólogo. Segundo a hipótese de Knudson, este também se perderia durante a progressão do melanoma devido a alguma mutação somática de perda de função (75).

CDKN2A e susceptibilidade para o melanoma cutâneo

Desde os primeiros estudos realizados na década de 90 que sugeriram o papel das mutações do p16 na gênese do melanoma cutâneo, mais de 77 variantes do gene *CDKN2A* já foram descritas em diferentes populações (3,5,85,86). A sua penetrância parece ser maior em indivíduos com melanoma familiar do que em casos esporádicos (87). Além disso, estudos realizados anteriormente demonstram que a presença de mutações aumenta de acordo com o número de pacientes com melanoma em uma mesma família (75). No âmbito do melanoma familiar, mutações germinativas de *CDKN2A* também são mais presentes em indivíduos que tiveram tumores de início mais precoce e MPMs (87,88).

Em um estudo do GenoMEL (*Melanoma Genetics Consortium*), trezentos e vinte pacientes com melanoma de oitenta famílias provenientes da Europa, da Austrália e dos EUA, além de 713 membros não afetados das mesmas famílias, foram avaliados quanto a mutações do *CDKN2A*. A penetrância das mutações foi estimada em 0,30 e 0,67,

respectivamente, aos 50 e 80 anos de vida. Além disso, a penetrância foi maior em regiões onde o melanoma era mais incidente e variou de acordo com o local estudado, sendo estatisticamente superior na Austrália (0,91) do que nos EUA (0,76) e na Europa (0,57). Isto demonstraria que a penetrância das mutações do *CDKN2A* em pacientes com melanoma familiar poderia também se modificar de acordo com variações geográficas e ambientais (89). Begg e colaboradores, em um estudo de base populacional com 3626 pacientes com melanomas de origem familiar e esporádicos, demonstraram a ocorrência de melanoma em portadores de mutações germinativas de *CDKN2A* em uma frequência de 14%, 24% e 28% aos 50, 70 e 80 anos, respectivamente. Esta penetrância foi inferior à encontrada pelo GenoMEL. Segundo os autores, isto se deveu ao fato do estudo ter um delineamento mais amplo, tendo incluído casos com probabilidade menor de ter mutações. Além disso, estes dados se aproximariam mais do que os anteriores para estimar o real risco de melanoma associado às mutações na população em geral (90).

Recentemente, o GenoMEL realizou estudo envolvendo 385 famílias com ≥ 3 pacientes com melanomas e identificou que 39% delas apresentavam mutações do *CDKN2A*. Quando os autores analisaram a frequência de mutações nas famílias pela origem de país observaram que na Austrália somente 20% das famílias apresentavam mutações contra 45% das norte-americanas e 57% das européias. Os autores concluíram que estas diferenças encontradas na Austrália, onde o melanoma é mais incidente, provavelmente se devam a uma série de outros fatores de risco genéticos, ambientais e dos indivíduos que faça com que casos de melanoma se agrupem em uma mesma família, gerando fenocópias que diluem a frequência de famílias com o *CDKN2A* mutado (88).

A presença de variantes do *CDKN2A* em pacientes com MPM, sem história familiar, também já foi comprovada. Monzon e colaboradores avaliaram 33 pacientes com MPM e encontraram mutações em 5 deles (91). Estudos de base populacional

envolvendo 1189 pacientes com MPM e 2424 com melanoma esporádico demonstraram que casos com mutações apresentavam um risco relativo de 4,3 (IC 95%: 2,3-7,7) para desenvolver um melanoma subsequente após controle para outros fatores de risco conhecidos. Além disso, os autores observaram intensidades distintas de risco dependendo do tipo de mutação encontrada, demonstrando que diferentes variantes de *CDKN2A* apresentam diferentes graus de penetrância (92,93).

No nosso meio, Ashton-Prolla e colaboradores realizaram trabalho pioneiro e avaliaram a presença de mutações no gene *CDKN2A* em um grupo de pacientes com melanoma de origem familiar ou com MPM. Trinta pacientes concordaram em participar do estudo. Duas mutações foram encontradas em pacientes de origem européia. Isto comprova que mutações germinativas do gene *CDKN2A* também ocorrem em casos de melanoma com alto risco genético no Brasil e têm, provavelmente, uma origem européia (9). Pouco se sabe sobre a presença de mutações do *CDKN2A* em pacientes com melanoma na América Latina. Um trabalho recente do GenoMEL no Uruguai identificou um número expressivo de pacientes com melanoma familiar afetados por mutações germinativas do *CDKN2A* (83%). Esta frequência alta provavelmente se deveu ao número pequeno de pacientes incluídos (13 pacientes) e a critérios de inclusão fortemente associados à presença de mutações (94).

CDKN2A e susceptibilidade para outros tumores

Pacientes com mutações germinativas de *CDKN2A* reconhecidamente tem um risco aumentado para o desenvolvimento de outros tumores. Dentre eles, o carcinoma de pâncreas parece ser a neoplasia mais associada a mutações deste gene depois do melanoma cutâneo. Ainda, a associação de carcinoma de pâncreas e melanoma cutâneo

em portadores de variantes do *CDKN2A* foram evidenciadas em um dos estudos do GenoMEL, principalmente nos casos provenientes da Europa e América do Norte (88).

Recentemente, um estudo analisou 31 mulheres com carcinoma de mama e melanoma cutâneo e observou que as variantes de *CDKN2A* eram pouco frequentes apesar de sua possível associação com o carcinoma de mama de origem familiar. (95) A associação de melanoma cutâneo com melanoma uveal e tumores de sistema nervoso parece não ocorrer em portadores de mutações (96).

8.4. Polimorfismos do gene *CDKN2A*

Três polimorfismos foram relatados no gene *CDKN2A*. Duas variantes não codificantes ocorrem na região não traduzida 3' (c.500C>G e c.540C>T). A associação destes polimorfismos com o risco de melanoma cutâneo foi avaliada em dois estudos de base populacional. Em ambos, não houve associação estatisticamente significativa entre a sua frequência e a neoplasia (4,97). Outra variante comum situa-se no códon 148 e já foi descrita como um alelo de baixa penetrância para o melanoma (4).

Polimorfismo p.A148T

- Aspectos gerais

A variante codificante c.442G>A é uma substituição de uma guanina por uma adenina na posição 442. Devido a esta substituição, ocorre uma conversão de uma alanina (GCG) por uma treonina (ACG) no códon 148 (*p.A148T*). Esta variante se localiza no éxon 2 (97). Inicialmente, experimentos demonstraram que este polimorfismo não traria nenhum efeito na função fisiológica da proteína p16^{INK4}. Entretanto, Walker e colaboradores fizeram experimentos com células de melanoma sem p16 funcional (MM96L) para avaliar a funcionalidade de uma série de variantes de p16 exógenas

transfectadas. Com relação à *p.A148T*, observaram que o seu padrão de expressão foi diferente daquele observado no tipo selvagem e o número de colônias de células também foi levemente superior (83). Outro experimento demonstrou que a *p.A148T* estaria em desequilíbrio de ligação com um outro polimorfismo na posição P-493, que comprovadamente afeta expressão gênica (98). Estes dados sugerem que a *p.A148T* poderia ter uma participação na susceptibilidade genética do melanoma.

Aitken e colaboradores avaliaram a presença do polimorfismo *p.A148T* na população de Queensland, Austrália e sua associação com o melanoma cutâneo. Para isto avaliaram a sua ocorrência em 514 pacientes com melanoma familiar e 200 controles. Encontraram, respectivamente, uma frequência alélica de 3% e 1,8% do polimorfismo, além de uma tendência de que a frequência aumentasse de acordo com o número de familiares afetados (97). No Reino Unido, outro estudo com 488 pacientes com síndrome do nevo atípico ou melanoma familiar e 599 controles do sexo feminino também avaliou o polimorfismo *p.A148T*. Não houve associação entre a presença do polimorfismo e risco para melanoma, assim como para o número total de nevos. A presença de mais de um nevo atípico foi associada com a ausência do polimorfismo, dado que sugeriria um efeito protetor da variante para a ocorrência deste tipo de nevo. Além disso, houve uma variação significativa da frequência do *p.A148T* entre regiões do Reino Unido o que demonstraria uma heterogeneidade de sua expressão entre diferentes populações (99).

Contrastando com estes resultados, Debniak e colaboradores observaram em um estudo caso-controle de base populacional na Polônia um aumento de risco para melanoma em portadores da variante *p.A148T*. A frequência genotípica de *p.A148T* foi, respectivamente, de 7% e 2,9% em 471 casos e 1210 controles. O risco aumentava em pacientes com diagnóstico antes dos 50 anos de idade (4). Na Letônia, a frequência do *p.A148T* também foi associada ao risco de melanoma cutâneo (6% em casos x 1% em controles) em uma amostra com 125 casos de melanoma (7). Nos dois estudos, os

autores concluíram que *p.A148T* deveria ser considerado uma variante de baixa penetrância para o melanoma.

Dois estudos com MPM e melanoma familiar na Espanha (13,4% x 5,4%, $p=0,05$) e na Itália (15,5% x 6,6%, $p=0,01$) também demonstraram um aumento da frequência de *p.A148T* em casos de melanoma em relação a controles (8,100). Apesar de que, em outro estudo ítalo-francês com casos de melanoma esporádicos, não foi encontrada uma associação (6).

Isto demonstra que a frequência do polimorfismo *p.A148T* sofre variações dependendo da população em estudo e, conseqüentemente, sofre a interferência de fatores étnicos. Pouco se sabe sobre a frequência de *p.A148T* na população brasileira. Ashton-Prolla e colaboradores identificaram *p.A148T* em uma frequência de 13,3% do polimorfismo em pacientes com MPM e melanoma familiar da população sul-riograndense (9). Faltam estudos na literatura que avaliem a frequência da variante *p.A148T* em uma amostra maior de casos de melanoma na região Sul do Brasil, assim como em controles e que, com isso, possa aferir a sua associação com um aumento de susceptibilidade à neoplasia nesta região do país.

8.5. Melanomagênese

Diversos estudos da última década colaboraram no reconhecimento e entendimento das vias de sinalização que estão envolvidos na complexa cascata de eventos que ocorre para que haja transformação maligna de melanócitos em melanomas. O tradicional modelo de progressão de células névicas ou de uma hiperplasia de melanócitos para melanoma traduz-se, histologicamente, na passagem consecutiva pelos estágios de nevos comuns, nevos atípicos, melanoma de crescimento radial, melanoma de

crescimento vertical e metástases (18). O surgimento de neoplasias, como o melanoma, é resultado de um acúmulo de mutações que ocorre em genes reguladores da proliferação, da diferenciação e da morte celular. O somatório destas mutações é o que, provavelmente, define o estágio dentro do modelo de progressão em que determinado tumor se encontra. Experimentos demonstram, por exemplo, que a perda do poder apoptótico por determinadas células de melanoma somente ocorre quando estas estão distantes de queratinócitos, o que demonstraria a importância das mutações de efeito anti-apoptótico na fase vertical de crescimento do melanoma. Além disso, células neoplásicas adquirem capacidade de inicializar e manter genes associados à angiogênese, permitindo com isso, que possam invadir tecidos adjacentes e produzir as metástases (101). A seguir, as principais vias de sinalização onde ocorrem eventos oncogênicos associados à melanomagenese serão abordadas.

Os primeiros eventos da tumorigênese do melanoma são secundários a defeitos moleculares capazes de induzir uma expansão clonal (102). Mutações consideradas fundadoras do melanoma são encontradas no gene *BRAF*. Estudos demonstram que 50-70% dos tumores apresentavam mutações de *BRAF*, sendo a variante oncogênica *BRAF*^{V600E}, uma substituição de ácido glutâmico por valina na posição 600, responsável por 80% destas (103). *BRAF* é um membro chave para a ativação da via da MAP quinase ou MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*). Em circunstâncias fisiológicas, a via da MAPK é responsável por regular o crescimento, sobrevivência e migração celular (104). No caso de tumores, mutações ocorrendo nesta cascata, como *BRAF*^{V600E}, são implicadas na manutenção e progressão tumoral (105,106). Além disso, por ser uma das vias que apresenta alterações genéticas com maior frequência em melanomas, como a variante oncogênica *BRAF*^{V600E}, a via MAPK tem sido alvo importante de tentativas em desenvolver alternativas terapêuticas para casos avançados de melanoma (107). Ainda, a variante *BRAF*^{V600E} também pode ser isolada de tecidos de nevos benignos. Este achado

corroborar com o fato desta mutação ocorrer precocemente na transformação neoplásica, porém também demonstra que ela não é capaz de desencadear a tumorigênese isoladamente (108). Apesar de estarem presentes em somente 15 a 30 % dos melanomas, mutações do *RAS*, gene que também pertence à mesma via de sinalização, são oncogênicas no melanoma cutâneo por serem ativadoras do *BRAF* e, desta forma, também levarem a um controle anormal do ciclo celular (104). Mutações em *RAS* estão associadas ao crescimento e à proliferação celular em tumores (109). O proto-oncogene *c-KIT*, também faz parte da cascata de sinalização da MAP quinase ligando-se ao SCF (*Stem Cell Factor*) e ativando a sequência *RAS/BRAF/MEK/ERK*. Mutações do gene *KIT* são pouco frequentes em melanomas e parecem estar mais associadas a variantes raras, como o melanoma de mucosas e acral (110).

O fator de transcrição associado à microftalmia (*MITF – Microphthalmia-associated transcription factor*) exerce importante papel no desenvolvimento e diferenciação de melanócitos e na pigmentação (111). No melanoma, sua expressão está associada à sobrevivência e à proliferação tumoral. Além de sua ativação depender da via MAPK, estudos recentes também demonstram a importância dos fatores de transcrição da família POU, em especial BRN-2, e da família Sry-box (SOX), especialmente, SOX10 no controle de sua ativação (109,112).

Apesar de não ter recebido tanta atenção como a via *MAPK* nos últimos anos, a via de sinalização *RAS/ phosphatidylinositol-3 quinase* ou *RAS/ PI(3)K* também está ativada durante a melanomagenese (113). Esta via leva à ativação da quinase AKT, que tem poder oncogênico, e é associada à sobrevivência e proliferação tumoral. Mutações de *PI(3)K*, em *AKT* e no gene supressor tumoral *PTEN*, que age também nesta via, são encontradas em células de melanoma (109).

O gene *NEDD9 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9)* foi recentemente implicado na progressão do melanoma. Está amplificado em 36% dos

melanomas metastáticos e estudos que avaliaram sua funcionalidade demonstraram sua importância para o processo de invasão tumoral e formação das metástases. Por este motivo, também é chamado de “gene das metástases” (114). A figura 2, em esquema adaptado de Berger e colaboradores (109), demonstra as principais vias de sinalização que apresentam ação oncogênica na tumorigênese do melanoma cutâneo.

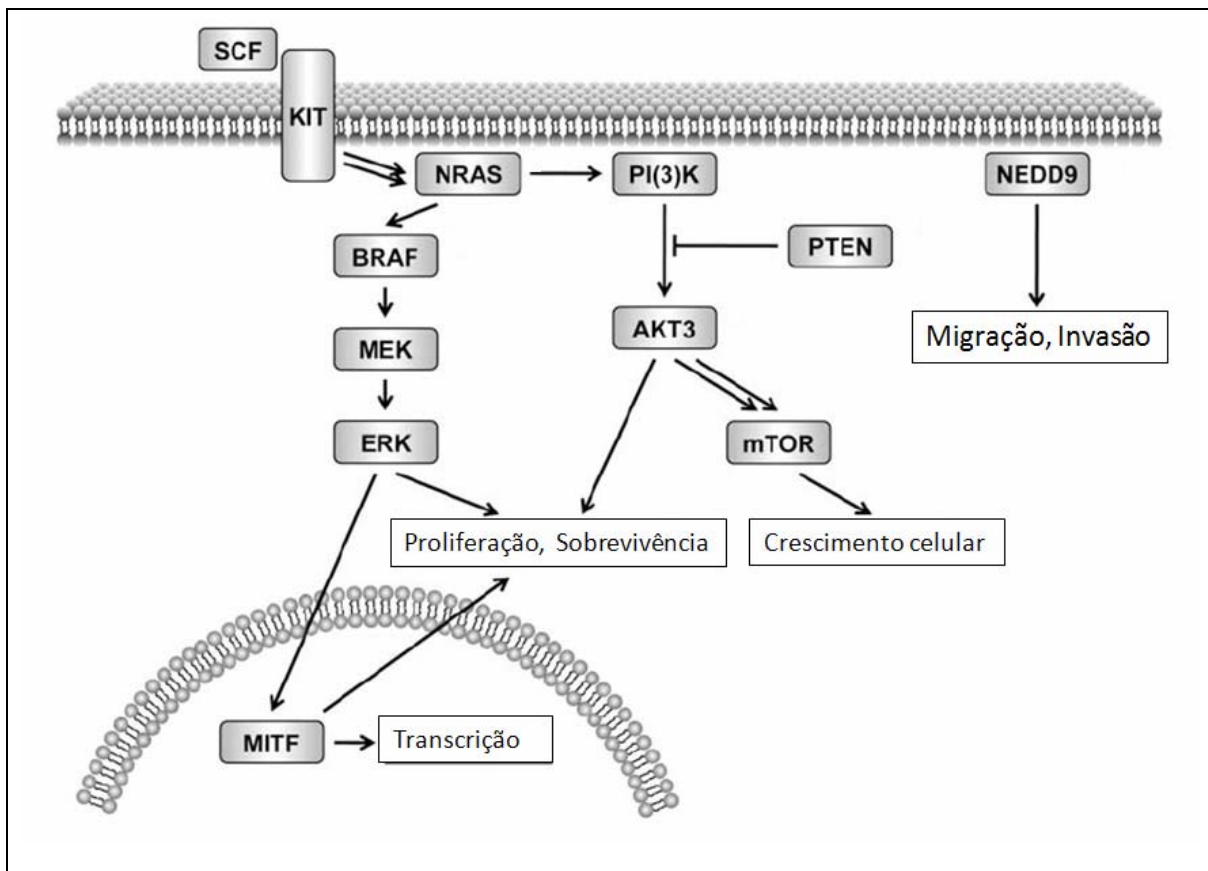


Figura 2: Vias de sinalização que sofrem ação oncogênica no melanoma cutâneo.

Como já foi abordado anteriormente, mutações germinativas do gene supressor tumoral *CDKN2A* e do gene *CDK4* que inibem a ação da proteínas p16 são freqüentes nos melanomas de origem familiar. Além da proteína p16, o *CDKN2A* também codifica a

proteína p14^{ARF}, inibidor do antagonista HDM2 da proteína p53. Desta forma, *CDKN2A* regula a progressão e crescimento celular através de duas vias de ação supressora tumoral. A perda desta regulação permite que as células “escapem” do estado de senescência, usual para lesões melanocíticas benignas. Mutações e deleções do gene *CDKN2A* ocorrem em 70% de linhagens de células de melanoma *in vitro*, apesar de não serem encontradas em grande número em tecidos de melanomas esporádicos. A ausência de expressão imunoistoquímica de p16 foi demonstrada tanto em melanomas primários quanto em metástases, comprovando a perda desta proteína após a transformação maligna (115). Mutações no gene *p53* ocorrem em 10 a 20% dos melanomas, por isso, a sua importância nos eventos iniciais da melanomagenese ainda são tema de debate (116).

8.6. Melanoma e células tronco tumorais

Os experimentos recentes que avaliaram diferentes vias de sinalização responsáveis por regular o desenvolvimento, o crescimento, a proliferação e a migração tumoral do melanoma auxiliaram a compreender melhor esta complexa cascata de eventos genéticos que ocorre na transformação maligna de linhagens melanocíticas. Estudos realizados em células originárias de tecidos melanocíticos benignos (nevos melanocíticos) e de melanomas, demonstraram que algumas mutações apresentadas anteriormente ocorrem em ambos tecidos. Estes achados poderiam indicar que estas mutações poderiam ser consideradas eventos precoces na transformação maligna, além de trazer evidências para sustentar a idéia do modelo de progressão tradicional do melanoma avançado, que se iniciaria a partir de nevos, passando por diferentes estágios de crescimento (radial e vertical) (113). Entretanto, sabe-se que grande parte dos

melanomas cutâneos não se origina de nevos melanocíticos, e sim, *de novo*. Isto sugeriria que a grande parte dos melanomas poderia não seguir este modelo de progressão (117).

No processo de diferenciação celular, melanoblastos originários da crista neural diferenciam-se para melanócitos ou alojam-se em nichos de células germinativas cutâneas localizados próximos aos folículos pilosos sob a forma de células-tronco de diferenciação melanocítica. Contrariando o conceito de origem dos melanomas que permanece por décadas e podendo servir de explicação para este grupo significativo de melanomas que surgem *de novo*, alguns experimentos demonstraram que o melanoma poderia ter estas células germinativas de origem neural como suas células primordiais e não melanócitos diferenciados (117). Corroborando a esta teoria, Grichnik e colaboradores identificaram em células de melanoma estudadas *in vitro* que um subgrupo destas tinha características morfológicas e antigênicas distintas. Além disso, avaliando o seu comportamento biológico, observaram que elas seriam células tumorais provavelmente originadas a partir de uma célula de características primordiais (118).

O pensamento tradicional sobre o comportamento biológico das neoplasias defende que elas sejam formadas por um grupo heterogêneo de células e que todas apresentariam alto poder proliferativo e capacidade de formar novos tumores à distância (11). Evidências recentes demonstram em diversas neoplasias que a capacidade de crescer e se proliferar seriam dependentes de uma subpopulação de células, que seriam denominadas células-tronco tumorais. Assim denominadas por serem um sub-grupo de células com maior tumorigenicidade, com maior capacidade proliferativa e de diferenciação, além de características antigênicas, morfológicas e fenotípicas distintas capazes de coordenar o crescimento neoplásico. Ainda, sua presença poderia justificar a resistência tumoral frente às terapias adjuvantes atuais para o melanoma que visam, na sua grande maioria, eliminar a massa tumoral (11).

A teoria da presença de células-tronco tumorais, que também são chamadas de células iniciadoras de tumores, ganhou força a partir do estudo feito por Bonnet e colaboradores que identificou, pela primeira vez, células-tronco tumorais. Foram realizados estudos de proliferação celular *in vitro* utilizando diferentes células de leucemia mielóide aguda (LMA) e transferindo-as para camundongos imunodeficientes. Surpreendentemente, apenas uma pequena proporção das células (0,1%) com características antigênicas específicas foi capaz de gerar tumores idênticos aos que são formados, enquanto que milhares de células sem as mesmas características fenotípicas não foram capazes de reproduzir tumores após a transferência (119).

Desde então, outros estudos avaliaram a existência de células-tronco tumorais em diferentes tumores sólidos. Al-Hajj e colaboradores foram os primeiros que identificaram a presença desta subpopulação de células associadas à formação tumoral nestes tipos de tumores. Também utilizando técnicas de proliferação celular e xenotransplantes em camundongos imunossuprimidos, observaram que células raras CD44+CD24- (aproximadamente 200) de neoplasia mamária foram capazes de produzir tumores nos animais enquanto que milhares de outras células sem o fenótipo não foram tumorigênicas (120). Outros tumores nos quais experimentos demonstraram a existência de células-tronco são de próstata, de ovário, de cólon e de pâncreas (11).

Conforme mencionado anteriormente, estima-se que as células-tronco tumorais estejam presentes em número bastante reduzido dentro dos tumores, porém isto ainda é tema de debate. Segundo alguns autores, esta subpopulação representaria de $1/10^6$ a 2% das células tumorais (11,121). Entretanto, Kelly e colaboradores questionaram estes achados. Suas críticas baseiam-se na premissa de que estudos com xenotransplantes em camundongos poderiam não representar exatamente o mesmo micro-ambiente que as células neoplásicas encontram em humanos. Desta forma, não se adaptariam ao novo ambiente, o que faria com que o número de células com capacidade de proliferação

estivesse subestimado (122). Também por estas razões, a promissora hipótese de que os tumores possam ser originados e mantidos por uma subpopulação de células ainda precisa ser melhor compreendida por experimentos que cada vez mais reproduzam as condições ambientais que os tumores encontram nos seres humanos.

Experimentos realizados nos últimos anos demonstram que as células-tronco tumorais podem estar presentes também no melanoma. Fang e colaboradores estudaram células de melanoma metastático em meios de cultura específicos para linhagens germinativas e conseguiram identificar um subgrupo de células com aspecto esférico, multipotentes e que apresentavam características distintas das restantes. Em condições apropriadas, elas se diferenciavam em outras linhagens celulares como adipócitos, melanócitos ou condrócitos, mostrando a plasticidade que é característica de células-tronco normais. Além disso, apresentavam-se mais tumorigênicas que as demais e tinham a característica de se autorrenovar (123).

Recentemente, Quintana e colaboradores realizaram trabalho semelhante aos que vinham sendo publicados com xenotransplantes. No estudo, células foram retiradas de metástases e lesões primárias de melanoma, cultivadas e, posteriormente, transferidas para camundongos com um grau de imunossupressão superior ao utilizado em estudos semelhantes. Transplantes utilizando apenas uma única célula tumoral foram efetuados pela primeira vez. Vinte e sete por cento das células formaram tumores, demonstrando que no melanoma, uma subpopulação de células com maior capacidade tumorigênica existe, porém estas células talvez não sejam tão raras (12).

Entretanto, é importante ressaltar que faltam evidências que comprovem se as chamadas células-tronco tumorais no melanoma seriam originárias de células-tronco situadas na derme, diretamente de melanoblastos ou se seriam provenientes de melanócitos diferenciados que sofreram importante processo de de-diferenciação (124).

Marcadores de células-tronco tumorais

A identificação de células com potencial tumorigênico e proliferativo é fundamental para melhor conhecer o seu comportamento biológico. No caso do melanoma, a expressão de determinados antígenos de superfície e marcadores originalmente encontrados em células de origem neural do período embrionário já foi demonstrada em células-tronco tumorais.

Inicialmente, Fang e colaboradores observaram que as células esféricas isoladas em seu estudo apresentavam expressão positiva para CD20 e CD133. CD20 é um antígeno de membrana que costuma estar presente em células de linhagem B e está associado à proliferação rápida. O CD133 ou prominina 1 é uma proteína de membrana identificada em humanos e camundongos principalmente encontrada como um marcador de células progenitoras de origem neural e hematopoiética (123). Outros estudos demonstraram que apesar de o CD133 ser um marcador pouco específico para as células-tronco tumorais de melanomas, estando presente em outras células-tronco tumorais de diversos órgãos, sua expressão está aumentada em subpopulações de células de melanoma com maior poder tumorigênico (117).

Frank e colaboradores identificaram um transportador de membrana denominado ABCB5 (*ATP-binding cassette -ABC*) da família das P-glicoproteínas em 3% de células de melanoma e 13% de células de melanoma resistentes à cisplatina. Além disso, células ABCB5 positivas também expressavam CD133, mostrando que a positividade dos dois marcadores poderia identificar células-tronco tumorais com resistência quimioterápica (125).

Um estudo avaliou a expressão de 3 marcadores de células germinativas (CD166, CD133, nestina) em 226 lesões melanocíticas (71 nevos melanocíticos, 71 melanomas primários e 84 metástases de melanoma). Para os 3 marcadores, frequências de

expressão superiores foram demonstradas em tecidos de melanoma do que em nevos, demonstrando que apresentar fenótipos semelhantes ao encontrado em células primordiais deve estar relacionado à progressão do melanoma. Neste estudo, a expressão de nestina foi a única com diferença estatisticamente significativa entre as metástases e os melanomas primários (15). Outro marcador de células-tronco, BMI-1 (*B-cell-specific Moloney murine leukaemia virus Integration site 1*), também foi encontrado em células de melanoma metastático em associação com a nestina (126). Estes experimentos demonstram que a expressão positiva da nestina poderia significar um importante marcador de progressão tumoral em melanomas, possivelmente associado a células-tronco tumorais.

Nestina em tecidos de origem neural

A nestina é um filamento intermediário encontrado em células progenitoras e células-tronco de origem neuro-ectodérmica e indica multipotencialidade, capacidade regenerativa e migratória nestes tecidos (13). Durante o processo de diferenciação celular, a nestina é inibida e substituída por proteínas específicas dos tecidos diferenciados, como a vimentina (127).

A expressão do gene da nestina durante o período embrionário é regulado por um *enhancer* localizado no segundo íntron (128). Tanaka e colaboradores demonstraram que a ativação do *enhancer* do gene da nestina em células progenitoras de origem neural é dependente dos fatores de transcrição de classe III da família POU, principalmente, BRN2. Os autores conseguiram demonstrar a presença de um sítio de ligação para BRN2 no *enhancer* neural da nestina. Além disso, foi observado que os fatores de transcrição da família SOX, especialmente, SOX2 seriam co-fatores e agiriam juntamente com o BRN2 na ativação do gene da nestina (10). A figura 3, adaptada de Tanaka e colaboradores (10)

demonstra o gene da nestina e a porção com os sítios de ligação dos fatores de transcrição SOX e POU.

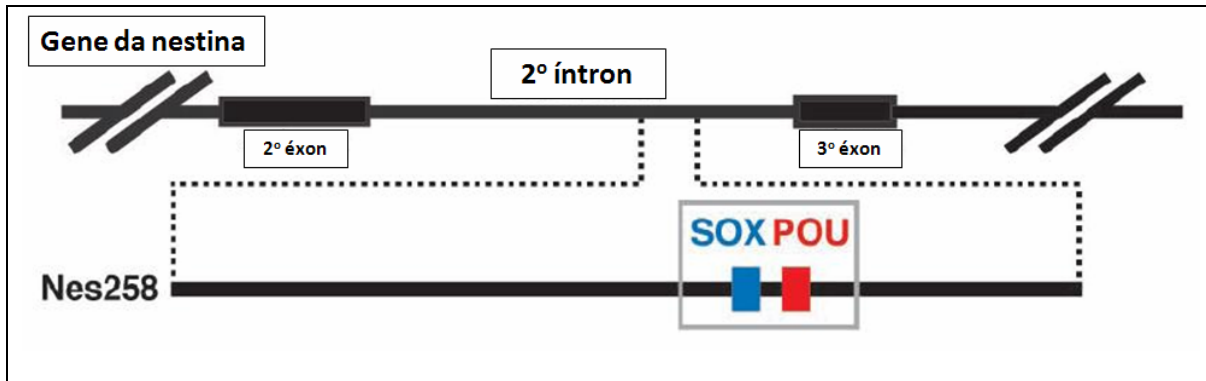


Figura 3: Gene da nestina e o *enhancer* mostrando sítios de ligação próximos para fatores de transcrição das famílias SOX e POU na região de 258-bp.

Apesar da nestina ser detectada após a diferenciação somente na zona subventricular cerebral, diversos estudos demonstraram que a sua re-expressão pode ser observada em situações específicas do sistema nervoso central que envolvam processos proliferativos de células gliais como doenças inflamatórias ou traumáticas (129,130). A expressão da nestina foi também avaliada em peças cirúrgicas de pacientes submetidos à cirurgia do lobo temporal por epilepsia intratável. Os autores encontraram expressões de nestina aumentadas e associadas a maior tempo e frequência de crises (14). Em tumores do sistema nervoso central, a expressão da nestina também se mostrou positiva (13,131).

Alguns trabalhos também relataram a expressão da nestina em tecidos de linhagens melanocíticas. Experimentos com células de melanoma *in vitro* isoladas de metástases de melanoma identificaram um subgrupo de células com características morfológicas distintas das demais, com maior capacidade proliferativa e com expressão positiva para nestina (118). Florenes e colaboradores analisaram, através de *Northern*

blotting, a presença do mRNA da nestina em 34 metástases de melanoma e em 5 nevos. Observaram a presença em 24 das metástases e em apenas 1 nevo. No mesmo estudo, a expressão imunistoquímica da nestina foi testada no mesmo número de metástases e nevos além de 15 melanomas primários. Nestes tecidos, a expressão da proteína ocorre em maior intensidade em metástases de melanoma do que em nevos e melanomas primários. Além disso, foi observado que melanócitos fora das lesões não expressaram mRNA e proteína da nestina. Os autores concluíram que a nestina está presente em formações melanocíticas, porém não em melanócitos fora de área lesional. Além disso, sugeriram que a nestina poderia ter um papel na progressão do melanoma pelo seu reconhecido efeito proliferativo e migratório no período embrionário e pela sua presença maior com os casos metastáticos (132).

Outro estudo semelhante (15) encontrou expressão imunistoquímica progressivamente aumentada em metástases em relação a melanomas primários e nevos. As conclusões do estudo foram de que a nestina está envolvida na progressão da doença e de que a sua presença poderia comprovar o papel de células-tronco tumorais na gênese do melanoma.

Brychtova e colaboradores também avaliaram a expressão da nestina através de imunistoquímica e observaram que era maior em metástases e melanomas nodulares em comparação com nevos e MES. Além disso, os casos positivos para nestina apresentavam significância estatística com tumores em estadiamento mais avançado e com tumores de espessura superior a 1mm o que colocaria a nestina como um marcador de pior prognóstico (127).

A presença da nestina em melanomas e a sua associação em diferentes estudos com casos mais avançados sugerem que ela possa ter implicações na melanomagênese e, conseqüentemente, a sua via de ativação poderia ser um alvo a ser considerado para o desenvolvimento de novas terapias. Como já foi mencionado, sabe-se que o fator de

transcrição BRN2 é o principal ativador do gene da nestina em células progenitoras neurais, tendo alguns membros da família SOX como co-fatores desta ativação através de sítios de ligação localizados no segundo íntron do gene da nestina.

O BRN2 é um fator de transcrição de classe III da família POU que está relacionado com o desenvolvimento de linhagens de células neurais e gliais. Pode estar presente em uma série de tecidos neoplásicos como glioblastomas e neuroblastomas. Sua expressão, por *Western blot*, foi observada em níveis semelhantes em melanoblastos e células de melanoma de linhagem MM96L, porém em níveis inferiores em melanócitos, o que demonstra sua importância no processo de diferenciação de melanócitos e no melanoma (133). Ainda, a sua inibição *in vitro* em células de melanoma produz diminuição de tumorigenicidade e diminuição de capacidade proliferativa (134).

Os fatores de transcrição da família SOX (*Sry-box*) podem agir em diferentes tecidos de maneira coordenada com os fatores de transcrição POU. Dentro da família SOX, os membros SOX9 e SOX10 parecem ter uma relação maior com linhagens melanocíticas, pois sua co-expressão foi detectada em melanoblastos. Sua atividade principal ocorre durante a embriogênese onde participam de vias de sinalização associadas ao desenvolvimento e diferenciação celular, sendo expressos em células progenitoras de diferentes linhagens celulares (135). Um estudo demonstrou a importância das SOX9 e SOX10 para a diferenciação de melanócitos, sendo as suas expressões quatro vezes maiores em melanoblastos do que em melanócitos diferenciados. Além disso, sua expressão em células de melanoma cultivadas mostrou-se elevada (136).

Apesar dos experimentos que descreveram a via de ativação da nestina em células progenitoras neurais, pouco se sabe sobre a sua ativação em células de melanoma. Com ineditismo, Flammiger e colaboradores avaliaram em linhagens de células de melanoma cultivadas os efeitos dos fatores de transcrição BRN2, SOX9 e

SOX10 na ativação da nestina. Os autores observaram expressões de mRNA BRN2 e nestina na maioria das células porém sem níveis de correlação. Quando realizaram inibição de BRN2 nas células através de siRNA (*small-interfering RNA*), observaram que a expressão de nestina não diminuiu. Com isso, concluiu-se que em células de melanoma *in vitro*, a expressão da nestina não parece ser regulada por BRN2, o que ocorre em células progenitoras neurais. Surpreendentemente, quando o mesmo experimento foi realizado com SOX10, as expressões de nestina e BRN2 diminuíram. Ainda, quando ambas, SOX9 e SOX10, foram inibidas por siRNA, a expressão da nestina reduziu ainda mais. A partir destes experimentos, os autores concluíram que SOX9 e SOX10 são os principais agentes de ativação da nestina em células de melanoma cultivadas (16).

Frente à possível ação da nestina na progressão tumoral e ao recente achado de que a ativação da nestina em células de melanoma cultivadas é realizada principalmente por membros da família SOX, seria de grande interesse avaliar as suas expressões em tecidos de linhagens melanocíticas *in vivo*. Faltam estudos na literatura que descrevam estas expressões imunohistoquímicas e a sua associação com critérios clínico-patológicos de melanomas.

9. OBJETIVOS

9.1. Objetivos principais:

9.1.1. Avaliar as frequências alélicas e genóticas do polimorfismo *p.A148T* do gene *CDKN2A* em pacientes com melanoma e controles no Rio Grande do Sul e o risco associado ao desenvolvimento da neoplasia.

9.1.2. Avaliar a expressão imunohistoquímica das proteínas nestina, SOX9, SOX10 e BRN2 em melanomas primários, metástases de melanoma e nevos melanocíticos.

9.2. Objetivos secundários:

9.2.1. Correlacionar a presença do polimorfismo *p.A148T* com características fenotípicas dos pacientes e com critérios clínico-patológicos dos melanomas.

9.2.2. Avaliar a origem étnica declarada dos pacientes com melanoma que apresentam o polimorfismo *p.A148T*.

9.2.3. Avaliar a coexpressão da nestina com as demais proteínas nos tecidos melanocíticos.

9.2.4. Correlacionar a expressão imunohistoquímica das proteínas avaliadas com critérios clínico-patológicos do melanoma.

10. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005;365:687-701.
2. Fagnoli MC, Argenziano G, Zalaudek I, Peris K. High- and low-penetrance cutaneous melanoma susceptibility genes. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006;6(5):657-70.
3. Piepkorn M. Melanoma Genetics: An update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressors. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42(5):705-22.
4. Debniak T, Scott RJ, Huzarski T, Byrski T, *et al.* CDKN2A common variants and their association with melanoma risk: a population-based study. *Cancer Res* 2005; 65(3):835-9.
5. Hussussian CJ, Struwing JP, Goldstein AM, Higgins PA, *et al.* germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 1994; 8:15-21.
6. Spica T, Portela M, Gérard B, Formicone F, Descamps V, Crickx B, *et al.* The A148T variant of the CDKN2A gene is not associated with melanoma risk in the French and Italian populations. *J Invest Dermatol* 2006;126:1657-60.
7. Pjanova D, Engele L, Randerson-Moor JA, Harland M, Bishop DT, Newton Bishop JA, *et al* (2007). CDKN2A and CDK4 variants in Latvian melanoma patients: analysis of a clinic-based population. *Melanoma Res* 17:185-191.
8. Puig S, Malveyh J, Badenas C, Ruiz A, Jimenez D, Cuellar F, *et al.* Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. *J Clin Oncol* 2005;23:3043–3051.
9. Ashton-Prolla P, Bakos L, Junqueira Jr G, Azevedo S, Giugliani R. Clinical and molecular characterization of patients at risk for hereditary melanoma in Southern Brazil. *J Invest Dermatol* 2008;128:421–425.

10. Tanaka S, Kamachi Y, Tanouchi A, Hamada H, Jing N, Kondoh H. Interplay of SOX and POU factors in regulation of the Nestin gene in neural primordial cells. *Mol Cell Biol* 2004;24:8834-46.
11. Huang EH, Heidt DG, Li CW, Simeone DM. Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor progression and therapeutic resistance. *Surgery* 2007;141:415-9.
12. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 2008;456:593-8.
13. Dahlstrand J, Collins VP, Lendahl U. Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res* 1992;52:5334-41.
14. Wang L, Wang X, Yuan J, Xi Z, Xue T, Li Y, Xiao Z. Nestin in the Temporal Neocortex of the Intractable Epilepsy Patients. *Neurochem Res* 2009;34:574-580.
15. Klein WM, Wu BP, Zhao S, Wu H, Klein-Szanto AJ, Tahan SR. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod Pathol* 2007;20:102-7.
16. Flammiger A, Besch R, Cook AL, Maier T, Sturm RA, Berking C. SOX9 and SOX10 but not BRN2 are required for nestin expression in human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2009;129:945-53.
17. Almeida FA, Almeida GOO. Melanoma Cutâneo. In: Ramos e Silva M, Castro MCR, editors. Fundamentos de Dermatologia. 1st ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2009. p. 1737-43.
18. Belfort FA. Etiopatogenia – Melanócito ao Melanoma. Belfort FA, Wainstein AJA, editors. In: Melanoma: Diagnóstico e tratamento. 1st ed. São Paulo: Lemar; 2009. p. 37-45.
19. Langley RGB, Fitzpatrick TB, Sober AJ. Clinical characteristics. In Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong S (editors) Cutaneous Melanoma. 3rd edition. St. Louis, EUA: Quality Medical Publishing Inc; 1998: pg. 81-103.
20. Tucker MA. Melanoma epidemiology. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23:383-95.
21. Rokuhara S, Saida T, Oguchi M, Matsumoto K, Murase S, Oguchi S. Number of acquired melanocytic nevi in patients with melanoma and control subjects in Japan: Nevus

count is a significant risk factor for nonacral melanoma but not for acral melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2004;50(5):695-700.

22. Carli P, Biggeri A, Giannotti B. Malignant melanoma in Italy: risks associated with common and clinically atypical melanocytic nevi. *J Am Acad Dermatol* 1995;32:734-9.

23. Tsao H, Bevona C, Goggins W, Quinn T. The transformation rate of moles (melanocytic nevi) into cutaneous melanoma: a population-based estimate. *Arch Dermatol* 2003;139(3):282-8.

24. Ruiz Lascano A, Kuznitzky R, Cuestas E, Mainardi C, Albertini R, Borello A, *et al*. Risk factors for cutaneous melanoma: case-control study in Cordoba, Argentina. *Medicina* 2004;64(6):504-8.

25. Garbe C, Buttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Kruger S, *et al*. Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 1994;102(5):695-9.

26. Katsambas A, Nicolaidou E. Cutaneous malignant melanoma and sun exposure. Recent developments in epidemiology. *Arch Dermatol* 1996;132(4):444-50.

27. Abarca JF, Casiccia CC. Skin cancer and ultraviolet-B radiation under the Antarctic ozone hole: southern Chile, 1987-2000. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2002;18(6):294-302.

28. Hall HI, Miller DR, Rogers JD, Bewerse B. Update on the incidence and mortality from melanoma in the United States. *J Am Acad Dermatol* 1999;40(1):35-42.

29. Martin RC, Robinson E. Cutaneous melanoma in Caucasian New Zealanders: 1995-1999. *ANZ J Surg* 2004;74(4):233-7.

30. Tyler I, Rivers JK, Shoveller JA, Blum A. Melanoma detection in British Columbia, Canada. *J Am Acad Dermatol* 2005;52(1):48-54.

31. Levi F, Te VC, Randimbison L, La Vecchia C. Trends in incidence of various

morphologies of malignant melanoma in Vaud and Neuchatel, Switzerland. *Melanoma Res* 2005;15(1):73-5.

32. Tabenkin H, Tamir A, Sperber AD, Shapira M, Shvartzman P. A case-control study of malignant melanoma in Israeli kibbutzim. *Isr Med Assoc J* 1999;1(3):154-7.

33. Balzi D, Carli P, Giannotti B, Paci E, Buiatti E. Cutaneous melanoma in the Florentine area, Italy: incidence, survival and mortality between 1985 and 1994. *Eur J Cancer Prev* 2003;12(1):43-8.

34. Diffey BL. The future incidence of cutaneous melanoma within the UK. *Br J Dermatol* 2004;151(4):868-72.

35. Berwick M, Erdei E. Melanoma Epidemiology and Public Health. *Dermatol Clin* 2009;27:205–214.

36. Marks R. Epidemiology of melanoma. *Clin Exp Dermatol* 2000;25(6):459-63.

37. Holly EA, Kelly JW, Shpall SN, Chiu SH. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1987;17(3):459-68

38. Hall HI, Jamison P, Fulton JP, Clutter G, Roffers S, Parrish P. Reporting cutaneous melanoma to cancer registries in the United States. *J Am Acad Dermatol* 2003;49(4):624-30.

39. Benvenuto-Andrade C, Zen B, Fonseca G, De Villa D, Cestari T. Sun exposure and sun protection habits among high-school adolescents in Porto Alegre, Brazil. *Photochem Photobiol* 2005;81(3):630-5.

40. Garbe C, Eigentler TK. Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006. *Melanoma Res* 2007;17:117–127.

41. Criado PR, Vasconcellos C, Sittart JA, Valente NY, Moura BP, Barbosa GL, *et al.* Primary cutaneous malignant melanoma: retrospective study from 1963 to 1997 at Hospital do Servidor Publico Estadual de Sao Paulo. *Rev Assoc Med Bras* 1999;45(2):157-62.

42. Fernandes NC, Calmon R, Maceira JP, Cuzzi T, Silva CSC. Cutaneous melanoma:

- prospective study of 65 cases. *An Bras Dermatol* 2005;80(1):25-34.
43. INCA. Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2007.
44. Borges SZ, Bakos L, Cartell A, Wagner M, Agostini A, Lersch E. Distribution of clinical-pathological types of cutaneous melanomas and mortality rate in the region of Passo Fundo, RS, Brazil. *Int J Dermatol* 2007;46:679-686.
45. Zemelman V, Roa J, Tagle SR, Valenzuela CY. Malignant melanoma in Chile: an unusual distribution of primary sites in men from low socioeconomic strata. *Clin Exp Dermatol* 2006;31:335-8.
46. Zemelman V, Garmendia ML, Kirschbaum A. Malignant melanoma mortality rates in Chile (1988-98). *Int J Dermatol* 2002;41(2):99-103.
47. Loria D, Matos E. Risk factors for cutaneous melanoma: a case-control study in Argentina. *Int J Dermatol* 2001; 40:108-14.
48. Whiteman DC, Bray CA, Siskind V, Green AC, Hole DJ, MacKie RM. Changes in the incidence of cutaneous melanoma in the west of Scotland and Queensland, Australia: hope for health promotion? *Eur J Cancer Prev* 2008;17:243-250.
49. Remontet L, Esteve J, Bouvier AM, Grosclaude P, Launoy G, Menegoz F, *et al.* Cancer incidence and mortality in France over the period 1978-2000. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2003;51(1 Pt 1):3-30.
50. Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol* 2009;27:3-9.
51. Duncan LM. The classification of cutaneous melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23:501-13.
52. Pereira FBC. Melanoma Disseminativo Superficial. Belfort FA, Wainstein AJA, editors. In: Melanoma: Diagnóstico e tratamento. 1st ed. São Paulo:Lemar; 2009. p. 117-22.
53. Bakos L, Bakos RM. Melanoma Nodular. Belfort FA, Wainstein AJA, editors. In: Melanoma: Diagnóstico e tratamento. 1st ed. São Paulo:Lemar; 2009. p. 122-7.
54. Maia M. Melanoma Lentigo Maligno. Belfort FA, Wainstein AJA, editors. In: Melanoma:

- Diagnóstico e tratamento. 1st ed. São Paulo:Lemar; 2009. p. 139-45.
55. Hirata S, Bilemjian APJ. Melanoma Lentiginoso Acral. Belfort FA, Wainstein AJA, editors. In: Melanoma: Diagnóstico e tratamento. 1st ed. São Paulo:Lemar; 2009. p. 129-38.
56. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* 2005;41:45-60.
57. Runger TM. Ultraviolet light. In Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology*. 1st edition. London:Mosby;2003. P.1353-64
58. Godar DE, Landry RJ, Lucas AD. Increased UVA exposures and decreased cutaneous Vitamin D(3) levels may be responsible for the increasing incidence of melanoma. *Med Hypothesis* 2009;72:434-43.
59. Yarosh DB. DNA repair, immunosuppression, and skin cancer. *Cutis* 2004;74:10-3.
60. Cestari TF, Kripke ML, Baptista PL, Bakos L, Bucana CD. Ultraviolet radiation decreases the granulomatous response to lepromin in humans. *J Invest Dermatol* 1995;105:8-13.
61. Mariante JC. Alterações clínicas, dermatoscópicas, histopatológicas e imuno-histoquímicas de nevos melanocíticos irradiados com raios ultravioleta B [dissertação]. Porto Alegre(RS):UFRGS;2003.
62. Bakos RM, Bakos L, Edelweiss MIA, Cartell A, Mariante JC, Masiero NCMS. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in melanocytic nevi is altered by ultraviolet B. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2007; 23: 250–254
63. Bakos L, Wagner M, Bakos RM, Leite CSM, Sperhacke CL, Dzekaniak KS, *et al.* Sunburn, sunscreens, and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in southern Brazil. *Int J Dermatol* 2002;41:557–562.
64. Moehrle M. Outdoor sports and skin cancer. *Clin Dermatol* 2008;26:12–15.

65. International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet (UV) light and skin cancer. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer* 2007;120:1116-22.
66. Fortes C, de Vries E. Nonsolar occupational risk factors for cutaneous melanoma. *Int J Dermatol* 2008;47: 319–328.
67. Fortes C, Mastroenia S, Melchib F, Pilla MA, Alotto M, Antonelli G, *et al.* The association between residential pesticide use and cutaneous melanoma. *Eur J Cancer* 2007;43:1066–1075.
68. Kaddu S, Smolle J, Zenhahlik P, Hofmann-Wellenhof R, Kerl H. Melanoma with benign melanocytic naevus components: reappraisal of clinicopathological features and prognosis. *Melanoma Res* 2002;12:271-8.
69. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer* 2005;41:28-44.
70. Bauer J, Garbe C. Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiologic data. *Pigm Cell Res* 2003;16:297-306.
71. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer* 2005; 41:2040–2059.
72. Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, *et al.* Malignant Melanoma in the 21st Century, Part 1: Epidemiology, Risk Factors, Screening, Prevention, and Diagnosis. *Mayo Clin Proc* 2007;82:364-380.
73. Bakos L, Masiero NC, Bakos RM, Burttet RM, Wagner MB, Benzano D. European ancestry and cutaneous melanoma in Southern Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009;23:304-7.

74. MacKie RM, Hauschild A, Eggermont AMM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol* 2009;20: vi1–vi7.
75. Meyle KD, Guldberg P. Genetic risk factors for melanoma. *Hum Genet* 2009. DOI10.1007. epub ahead of print
76. Bishop DT, Demenais F, Iles MM, Harland M, Taylor JC, Corda E, *et al.* Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. *Nat Genet* 2009;41:920-8.
77. Raimondi S, Sera F, Gandini S, Iodice S, Caini S, Maisonneuve P, *et al.* MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: A meta-analysis. *Int J Cancer* 2008;122:2753–2760.
78. Gudbjartsson DF, Sulem P, Stacey SN, Goldstein AM, Rafnar T, Sigurgeirsson B, *et al.* ASIP and TYR pigmentation variants associate with cutaneous melanoma and basal cell carcinoma. *Nat Genet* 2008;40:886-91.
79. Baccarelli A, Calista D, Minghetti P, Marinelli B, Albetti B, Tseng T, *et al.* XPD gene polymorphism and host characteristics in the association with cutaneous malignant melanoma risk. *Br J Cancer* 2004;90:497 – 502.
80. Blankenburg S, Konig IR, Moessner R, Laspe P, Thoms K, Krueger U, *et al.* Assessment of 3 xeroderma pigmentosum group C gene polymorphisms and risk of cutaneous melanoma: a case--control study. *Carcinogenesis* 2005; 26:1085-1090.
81. Ranade K, Hussussian C, Sikorski RS, Varmus HE, Goldstein AM, Tucker MA, *et al.* Mutations associated with familial melanoma impair p16^{INK4} function. *Nat Genet* 1995;10:114-6.
82. Castellano M, Pollock PM, Walters MK, Sparrow LE, *et al.* CDKN2A/p16 is inactivated in most melanoma cells. *Cancer Res* 1997; 57:4868-75.
83. Walker JG, Gabrielli BG, Castellano M, Hayward NK. Functional reassessment of p16 variants using a transfection-based assay. *Int J Cancer* 1999;82:305–312.

84. Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 1996;85:27-37.
85. Kamb A, Gruis N, Weaver-Feldhaus J, *et al.* A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994;264:436.
86. Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, *et al.* Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet* 1994; 8:23-6.
87. Nelson AA, Tsao H. Melanoma and genetics. *Clin Dermatol* 2009;27:46–52.
88. Goldstein AM, Chan M, Harland M, Hayward NK, Demenais F, Bishop DT, *et al.* Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet* 2007;44:99-106.
89. Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, Bergman W, Newton-Bishop J, Bressac-de Paillerets B, *et al.* Geographical Variation in the Penetrance of CDKN2A Mutations for Melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:894-903.
90. Begg CB, Orlow I, Hummer AJ, Armstrong BK, Kricker A, Marrett LD, *et al.* Lifetime Risk of Melanoma in CDKN2A Mutation Carriers in a Population-Based Sample. *J Nat Cancer Inst* 2005; 97:1507-15.
91. Monzon J, Liu L, Brill H, Goldstein AM, Tucker MA, From L, *et al.* CDKN2A mutations in multiple melanomas. *NEJM* 1998;338:879-87.
92. Berwick M, Orlow I, Hummer AJ, Armstrong BK, Kricker A, Marrett LD, *et al.* The Prevalence of CDKN2A Germ-Line Mutations and Relative Risk for Cutaneous Malignant Melanoma: An International Population-Based Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:1520-5.
93. Orlow I, Begg CB, Gotignola J, Roy P, Hummer AJ, Clas BA, *et al.* CDKN2A germline mutations in individuals with cutaneous malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 2007;127:1234-43.

94. Borges AL, Cuellar F, Puig-Butille JA, Scarone M, Delgado L, Badenas C, *et al.* CDKN2A mutations in melanoma families from Uruguay. *Br J Dermatol* 2009;161:536-41.
95. Nagore E, Montoro A, Garcia-Casado Z, Botella-Estrada R, Insa A, Lluch A, *et al.* Germline mutations in CDKN2A are infrequent in female patients with melanoma and breast cancer. *Melanoma Res* 2009;19:211-214.
96. Goldstein AM, Chan M, Harland M, Gillanders EM, Hayward NK, Avril MF, *et al.* High-risk Melanoma Susceptibility Genes and Pancreatic Cancer, Neural System Tumors, and Uveal Melanoma across GenoMEL. *Cancer Res* 2006; 66:9818-28.
97. Aitken J, Welch J, Duffy D, Milligan A, Green A, Martin N, *et al.* CDKN2A Variants in a Population-Based Sample of Queensland Families With Melanoma. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:446-52.
98. Harland M, Holland EA, Ghiorzo P, *et al.* Mutation screening of the CDKN2A promoter in melanoma families. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;28:45-7.
99. Bertram CG, Gaut RM, Barrett JH, Pinney E, Whitaker L, Turner F, *et al.* An Assessment of the CDKN2A Variant Ala148Thr as a Nevus/Melanoma Susceptibility Allele. *J Invest Dermatol* 2002;119:961-965.
100. Pastorino L, Bonelli L, Ghiorzo P, Queirolo P, Battistuzzi L, Balleari E, *et al.* CDKN2A mutations and MC1R variants in Italian patients with single or multiple primary melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008;21:700-709.
101. Chudnovsky Y, Khavari PA, Adams AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. *J Clin Invest* 2005;115:813-824.
102. Bennett DC. How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Mel Res* 2008;21:27-38.
103. Davies H, Bignell GR, Cox C, *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417:949-954.
104. Fecher LA, Amaravadi RK, Flaherty KT. The MAPK pathway in melanoma. *Curr Opin*

Oncol 2008;20:183–189.

105. Dhomen N, Marais R. BRAF Signaling and targeted therapies in melanoma. *Hematol Oncol Clin N Am* 2009;23:529–545.

106. Dhomen N, Reis-Filho JS, Dias SR, Hayward R, Savage K, *et al.* Oncogenic Braf Induces Melanocyte Senescence and Melanoma in Mice. *Cancer Cell* 2009;15:294–303.

107. Sharma A, Tran MA, Liang S, *et al.* Targeting mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in the mutant (V600E) B-Raf signaling cascade effectively inhibits melanoma lung metastases. *Cancer Res* 2006;66:8200–9.

108. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, *et al.* High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003;33:19–20.

109. Berger MF, Garraway LA. Applications of genomics in melanoma oncogene discovery. *Hematol Oncol Clin N Am* 2009;23:397–414.

110. Smalley KSM, Sondak VK, Weber JS. c-KIT signaling as the driving oncogenic event in sub-groups of melanomas *Histol Histopathol* 2009;24:643-650.

111. Vance KW, Goding CR. The transcription network regulating melanocyte development and melanoma. *Pigm Cell Res* 2004;17:318-25.

112. Cook AL, Sturm RA. POU domain transcription factors: BRN2 as a regulator of melanocytic growth and tumorigenesis. *Pigm Cell Mel Res* 2008;21:611–626.

113. Singh M, Lin J, Hocker TL, Tsa H. Genetics of melanoma tumorigenesis. *Br J Dermatol* 2008; 158:15–21.

114. Kim M, Gans JD, Nogueira C, *et al.* Comparative oncogenomics identifies NEDD9 as a melanoma metastasis gene. *Cell* 2006;125:1269–81.

115. de Sá BC, Fugimori ML, Ribeiro Kde C, Duprat neto JP, Neves RI, Landman G. Proteins involved in pRb and p53 pathways are differentially expressed in thin and thick superficial spreading melanomas. *Melanoma Res* 2009;19:135:41.

116. Li W, Sanki A, Karim RZ, Thompson JF, Lee CS, Zhuang L, *et al.* The role of cell

cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology* 2006;38:287–301.

117. Zabierowski SE, Herlyn M. Melanoma stem cells: the dark seed of melanoma. *J Clin Oncol* 2008;26:2890-4.

118. Grichnik JM, Burch JA, Schulteis RD, Shan S, Liu J, Darrow TL, *et al.* Melanoma, a Tumor Based on a Mutant Stem Cell? *J Invest Dermatol* 2006;126:142–153.

119. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3:730-7.

120. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:3983-8

121. Kennedy JA, Barabé F, Poepl AG, Wang JCY, Dick JE. Comment on “Tumor Growth Need Not Be Driven by Rare Cancer Stem Cells”. *Science* 2007;318:1722c.

122. Kelly PN, Dakic A, Adams JM, Nutt SL, Strasser A. Tumor Growth Need Not Be Driven by Rare Cancer Stem Cells. *Science* 2007;317:337.

123. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, *et al.* A Tumorigenic Subpopulation with Stem Cell Properties in Melanomas. *Cancer Res* 2005;65:9328-37.

124. Kuphal S, Bosserhoff A. Recent progress in understanding the pathology of malignant melanoma. *J Pathology* 2009. DOI: 10.1002 epub ahead of print

125. Frank NY, Margaryan A, Huang Y, Schatton T, Waaga-Gasser AM, Gasser M, *et al.* ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res* 2005;65:4320–4333.

126. Mihic-Probst D, Kuster A, Kilgus S, Bode-Lesniewska B, Ingold-Heppner B, Leung C, *et al.* Consistent expression of the stem cell renewal factor BMI-1 in primary and metastatic melanoma. *Int J Cancer* 2007;121:1764–1770.

127. Brychtova S, Fiuraskova M, Hlobilkova A, Brychta T, Hirnak J. Nestin expression in cutaneous melanomas and melanocytic nevi. *J Cutan Pathol* 2007; 34: 370–375.

128. Josephson R, Müller T, Pickel J, Okabe S, Reynolds K, Turner PA, *et al.* POU transcription factors control expression of CNS stem cell-specific genes. *Development* 1998;125:3087-3100.
129. Jin JK, Jeong BH, Na YJ, *et al.* Increased expression of the embryonic intermediate filament, nestin, in the brains of scrapie-infected mice. *Neurosci Lett* 2004; 367: 254.
130. Sunabori T, Tokunaga A, Nagai T, *et al.* Cell-cycle-specific nestin expression coordinates with morphological changes in embryonic cortical neural progenitors. *J Cell Sci* 2008;121:1204–1212.
131. Ehrmann J, Kolařík Z, Mokry J. Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumours. *J Clin Pathol* 2005;58:222–223.
132. Florenes V, Holm R, Myldeboost O, Lendahl U, Fodstad O. Expression of the Neuroectodermal Intermediate Filament Nestin in Human Melanomas. *Cancer Res* 1994;54:354-356.
133. Cook AL, Boyle GM, Leonard JH, Parsons PG, Sturm RA. BRN2 in melanocytic cell development, differentiation and transformation. In: Hearing VJ, Leong SPL (editors) *From Melanocytes to melanoma: the progression to malignancy*. 1st ed. Totowa USA: Humana Press Inc;2005. p.149-67.
134. Thomson J A F, Murphy K, Baker E, Sutherland G R, Parsons P G, Sturm R A. The brn-2 gene regulates the melanocytic phenotype and tumorigenic potential of human melanoma cells. *Oncogene* 1995; 11: 691–700.
135. Mollaaghababa R, Pavan WJ. The importance of having your SOX on: role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia. *Oncogene* 2003;22:3024–3034.
136. Cook AL, Smith AG, Smit DJ, Leonard JH, Sturm RA. Co-expression of SOX9 and SOX10 during melanocytic differentiation in vitro. *Exp Cell Res* 2005;308:222 – 235.

11. ARTIGO 1

Title: The *CDKN2A p.A148T* variant is associated with cutaneous melanoma in Southern Brazil

Authors:

Renato Marchiori Bakos,¹ Gabriela Goettems Zoratto,¹ Janaína Mesalira Godinho,¹ Nicolle Gollo Mazzotti,¹ Robert Besch,² Carola Berking,² Thomas Ruzicka,² Lucio Bakos,¹ Patricia Ashton-Prolla,^{3,4} Roberto Giugliani³

Affiliations:

1. Serviço de Dermatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil
2. Department of Dermatology, Ludwig Maximilian University of Munich, Germany
3. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil
4. Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

This work was done in Munich, Germany and in Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence Author

Patricia Ashton-Prolla

Address: Rua Ramiro Barcellos, 2350 CEP 90035-903 Porto Alegre, RS Brazil

Tel/Fax: + 55 51 33598011/8010 Email: pprolla@hcpa.ufrgs.br

Abstract

A proportion of melanoma patients present mutations in high-penetrance susceptibility genes. The *p.A148T* variant is a single nucleotide polymorphism that occurs in *CDKN2A*, the major melanoma susceptibility gene. Its association with melanoma risk is reported to be associated with certain ethnic groups. In this case-control study, we evaluated 127 melanoma cases and 128 controls from Southern Brazil, the region of the country that presents the highest melanoma incidence. Using PCR-RFLP, we could demonstrate that *p.A148T* was encountered more frequently in melanoma patients (12.6%) than in controls (3.9%). We did not identify an association of the variant with tumor thickness, site of the primary tumor, melanoma subtype, age at diagnosis, quantitative and qualitative number of nevi. All *p.A148T*-positive melanoma cases showed European ancestry, especially German. Our results suggest that *p.A148T* represents a low-penetrance melanoma susceptibility allele in Southern Brazil and it is particularly common in patients with European ancestry.

Keywords: melanoma, *p.A148T*, polymorphism, *CDKN2A*, Brazil

INTRODUCTION

Melanoma incidence is increasing worldwide among white populations (Thompson *et al*, 2005). This trend is also observed in Southern Brazil, the region with the greatest melanoma incidence in the country (Bakos *et al*, 2009). UV exposure is the most important environmental risk factor for melanoma (Gandini *et al*, 2005a) and also plays a major role in melanoma development in this part of the world (Bakos *et al*, 2002). The higher rates of melanoma in Southern Brazil in comparison to other parts of the country are also explained by the immigration movements of the 19th century from Europe to this region, especially from Italy and Germany. Bakos *et al* have recently reported that a German and an Italian ancestry would confer, respectively, a 3.5- and 9.7-fold risk for melanoma in Southern Brazilian kindreds (Bakos *et al*, 2009).

Constitutional phenotypic features like a large number of melanocytic nevi and more than 5 atypical nevi are also considered important risk factors for melanoma (Gandini *et al*, 2005b). Moreover, individuals with a previous or a familial history of melanoma are also associated with increased risk of developing this malignancy (Tucker, 2009).

CDKN2A, the cyclin-dependent kinase inhibitor type 2A, encodes two protein products involved in tumor suppression and is considered the most important melanoma susceptibility gene already described (Berwick *et al*, 2006). It is located on human chromosome 9p21 and the majority of mutations in this gene occurs within exon 1 α and 2 (Orlow *et al*, 2007). Mutations in *CDKN2A* gene are found in 20 to 40% of familial melanoma (FM) patients (Goldstein *et al*, 2006; Newton-Bishop *et al*, 1999) and from 3 to 48% of multiple primary melanoma (MPM) cases (Berwick *et al*, 2006; Majore *et al*, 2008).

A common variant of *CDKN2A*, an alanine to threonine substitution at codon 148 (A148T), was initially thought to be a common polymorphism, which seemed to have no major effect on p16 function (Ranade *et al*, 1995; Lilischkis *et al*, 1996). However, several reports have implicated *p.A148T* as a melanoma susceptibility variant among MPM patients (Puig *et al*, 2006; Pastorino *et al*, 2008). Moreover, Ashton-Prolla *et al* (2008) evaluated a group of FM and MPM patients in Southern Brazil and found the *p.A148T* allele in 13,3% of the sample studied. This could suggest that this variant might be associated with melanoma risk in Southern Brazil, although this association has never been investigated neither among sporadic melanoma patients nor among healthy controls in this population. In Poland, *p.A148T* was associated with melanoma risk, but, in other populations, this association was not established (Debniak *et al*, 2005; Spica *et al*, 2006). Because of the conflicting results found in papers that analyzed the *p.A148T* variant in different populations, it seems that its association to an increased risk of developing melanoma may vary according to different ethnic background. The Southern Brazil population is characterized by significant miscigenation with contributions from native Americans, Europeans and African gene pools. To evaluate the frequency of *CDKN2A* variants and their association with melanoma risk in different populations is of great interest to identify subgroups of patients with an increased risk of developing the disease. To date, no studies have investigated the risk of the *p.A148T* variant for the development of cutaneous melanoma in Brazil, especially in the Southern region, where melanoma is highly incident. In this case-control study, we analyzed the allelic and genotypic frequencies of *p.A148T* variant frequency among 127 melanoma patients (28 MPM/ FM and 99 sporadic) and 129 controls from Southern Brazil and correlate the presence of this variant with melanoma prognostic factors and clinical data.

MATERIAL AND METHODS

Patients. The case group consisted of melanoma patients that were prospectively recruited from the Department of Dermatology of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil between September 2007 and November 2008. It comprised 28 FM/MPM patients and 99 sporadic melanoma patients. Patients with a positive familiar history of cutaneous melanoma in first-, second-, and third-degree relatives were described as having a positive family history, similarly to other studies (Ashton-Prolla et al, 2008). Patients with more than one primary lesion were considered MPM cases. The mean age at recruitment of the melanoma patients was 56.2 years. Forty eight were males and 79 females. All diagnoses were confirmed by pathology reports. The control group was recruited among patients that presented at the same Department for an initial consultation or for regular follow-up, for diseases other than skin cancer. Patients of the control group had no personal or familiar history of melanoma. Forty nine and seventy nine of them were, respectively, males and females with a mean age at recruitment of 57.8 years. Written informed consent from all the patients was obtained prior to inclusion in the study, according to an Institutional Review Board- approved protocol. All patients willing to participate in the study were clinically examined. Variables recorded during clinical evaluation were skin phototype, and quantitative/qualitative presence of nevi. Data from primary lesions of cutaneous melanoma patients were also recorded.

Materials. DNA samples were obtained from peripheral blood of individuals according to the “salting out” method of Miller. (Miller *et al*, 1988) The *p.A148T* variant was analyzed by PCR, using the following methods: 16.25 µl distilled water, 5.0 µl 5x manufacturer’s PCR buffer, 1.0 µl 25 mM MgCl₂, 0.625 µl forward primer (10 mM stock), 0.625 µl reverse primer (10 mM stock), 0.25 µl deoxynucleoside triphosphates (dNTPs mix) (25 mM each dNTP), 0.25 µl of Herculase II fusion DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) were added for every sample into a master mixture. The primers that were used, 5’-

CTTCCTGGACACGCTGGT- 3' and 5'- AGTCTTCATTGCTCCGCAGT -3', were designed at our lab. Twenty four microliters of the master mix were added to 1.0 μ l DNA template for each sample and amplified in a thermal cycler (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). During method establishment, a 479 bp PCR-amplified product was sequenced to confirm that the *p.A148T* variant region was amplified. PCR products were digested with the *SacII* enzyme and separated in 2% to 3% agarose gels.

Statistics. Two-sided Fischer's exact test was used to analyzed its frequency between cases and controls. Odds ratio and confidence intervals for allelic frequencies were also calculated. The Chi square test or Fischer's exact test, as appropriate, was used to test for statistical significance of proportions when evaluating clinical and prognostic data from melanoma patients. Data were analyzed using the SPSS statistical package version 12.0. The statistical significance was considered at $p < 0,05$.

RESULTS

Genotype frequency in melanoma and control groups were in Hardy-Weinberg equilibrium. (data not shown) The frequency of the *p.A148T* variant was assessed in 127 melanoma patients and in 128 controls. Table 1 demonstrates the characteristics of the groups. No differences regarding skin type, age and sex were found between the groups.

In the melanoma group, the allelic frequency of the *p.A148T* variant was significantly higher than that observed in the control group (Table 2). Analyzing the frequency in the melanoma group, we observed that 21.4% (6/28) ($p = 0.006$) of FM/MPM patients presented a mutant *p.A148T* allele while 10.1% (10/99) of the sporadic melanoma patients also presented the allele. In accordance with previous reports in other populations (Ruiz *et al*, 1999; Pastorino *et al*, 2008), we observed that the *p.A148T* variant is likely associated to an increased melanoma risk for FM/MPM patients.

To determine melanoma risk among different age groups, melanoma patients were divided in two groups based on the age of diagnosis (≤ 50 years and > 50 years). Although previous reports indicate that *p.A148T* could be associated with an increased risk for early-onset melanoma (Debniak *et al*, 2005), we could not find an association with any age group in our patients. Moreover, in order to evaluate an association of *p.A148T* with clinical and prognostic features of melanoma, we looked for correlations with the following clinico-pathological parameters: tumor location, tumor thickness, melanoma subtypes. No statistically significant correlation was found. (data not shown)

As previously mentioned, Southern Brazil is characterized by a great miscigenation of distinct ethnic groups. Therefore, it would be of great interest to evaluate from which ethnic groups of our population the *p.A148T* variant presenting patients would come from. Self-denominated ethnic background of *p.A148T*-positive melanoma cases was analyzed and all reported European ancestry. From the group reporting exclusively European ancestry, eight patients presented German ancestry and 1 patient presented Italian ancestry. Two patients presented Portuguese and Brazilian ancestry. The other 5 patients presented, respectively, mixed German and Italian ancestry, German and Spanish, German and Polish, German and Uruguayan, and Romanian and Russian.

DISCUSSION

Conflicting data on the association of the *p.A148T* variant with melanoma risk have been published in different populations in previous studies (Spica *et al*, 2006; Debniak *et al*, 2005; Puig *et al*, 2005; Pastorino *et al*, 2008). It seems that ethnic factors might account for such variations. Here we have demonstrated for the first time that the *p.A148T* variant is associated with cutaneous melanoma among Southern Brazilian patients. We speculate that this variant derived in our patients from their European ancestry, especially German.

The c.442G>A is a coding variant that converts an alanine (GCG) to a threonine (ACG) residue at codon 148 (A148T) that has been detected in the *CDKN2A* gene and has initially been reported as a common polymorphism. Previous functional assays demonstrated that *p.A148T* presented different patterns of expression and would be less effective than the wild type protein in inhibiting cell proliferation suggesting that this variant would not be totally benign as first thought (Walker *et al*, 1999). Linkage *desequilibrium* of *p.A148T* variant allele with 493A>T *CDKN2A* promoter variant, known to affect gene expression, may also suggest its role in melanoma susceptibility. (Harland *et al*, 2000)

We found a significantly increased frequency ($p=0.009$) of the *p.A148T* variant among our melanoma patients (12.6%) in comparison with the control group (3.9%). Other studies are in line with our results and have considered the *p.A148T* variant as a low-penetrance risk gene for melanoma (Debniak *et al*, 2005; Pjanova *et al*, 2007). A Polish population-based study (Debniak *et al*, 2005) demonstrated that the A148T variant was associated with an increased melanoma risk, especially in patients diagnosed under the age of 50 years. We did not find an increased number of early-onset melanomas among the *p.A148T*-positive patients in the sample studied. Patients with MPM and/or FM are more frequently carriers of germline high penetrance *CDKN2A* mutations and, possibly also, the *p.A148T* variant. It has been published elsewhere that 14% Spanish MPM patients carried the variant (Ruiz *et al*, 1999). Moreover, an increased frequency of *p.A148T* was observed among MPM patients in comparison to controls (Puig *et al*, 2005; 13,5% x 5,4% and Pastorino *et al*, 2008; 15,9% x 6,6%). Our group has previously reported that 13.3% of the FM patients presented the *p.A148T* variant in Southern Brazil (Ashton-Prolla *et al*, 2008). In the present study, we evaluated FM/MPM patients and we observed an even higher frequency of the *p.A148T* variant (21.4%) in this group, significantly higher than in controls.

We tried to correlate the presence of *p.A148T* variant with several clinical-pathologic features of melanoma. We could not find any statistical significant association with

melanoma subtype, thickness level or site of the primary tumor. This may demonstrate that patients from Southern Brazil presenting the variant do not have a worse prognosis. Furthermore, it seems that carriers do not show specific melanoma subtypes or any site of predilection for primary lesions. We have also tried to correlate the *p.A148T* variant with the presence of nevi and atypical nevi, but we did not find any statistically significant association. Bertram *et al* (2002) have investigated the role of *p.A148T* variant as a nevus susceptibility gene. In population-based patients they could also not find an association between the variant and the presence of atypical nevi or a large number of common nevi, although it played a protective role for the number of atypical nevi in a sample of adults recruited from families of patients with the atypical nevus phenotype and/or a family history of melanoma.

The formation of the population of Southern Brazil suffered influence of distinct ethnic groups, therefore, we wanted to investigate which ancestries would be found among *p.A148T* variant-presenting melanoma cases. We could observe that the majority of them reported exclusively European ancestry (13/16). A population-based study in Europe (Poland) has demonstrated that the *p.A148T* variant is present in 2.9% of the population (Debniak *et al*, 2005), similar to data from Australia (1.8%)(Aitken *et al*, 1999). In Latin countries, previous studies suggested that *p.A148T* variant may play a major role in MPM (Ruiz *et al*, 1999; Pastorino *et al*, 2008) but not in sporadic melanomas (Spica *et al*, 2006; Pastorino *et al*, 2008). Although, in homogeneous populations of Poland (Debniak *et al*, 2005) and Latvia (Pjanova *et al*, 2007) it was demonstrated to be a melanoma low-penetrance susceptibility gene, in England (Bertram *et al*, 2002) it was not observed. The high frequency of German ancestry in association with *p.A148T* variant in the present sample may suggest that these individuals may be at increased risk for developing cutaneous melanoma. Lukowsky *et al* (2008), in a clinic-based study showed that German MPM and FM patients have, respectively, *p.A148T* frequency of 15% (6/40) and 13.3%

(2/15) showing that the variant is present in German melanoma patients, although further correlations establishing the risk were not performed. Further studies evaluating the frequency of the *p.A148T* variant in the German population would be of great interest to better determine its relevance as a genetic risk factor for cutaneous melanoma in this population and to corroborate our data.

In conclusion, the results from this study show that the *p.A148T* variant frequency is higher among melanoma patients than among controls in Southern Brazil indicating that it should be considered as a low-penetrance susceptibility gene in this population. Furthermore, almost all mutated *p.A148T* melanoma patients reported European ancestry, mainly German. These results indicate that an European background in patients who carry the *p.A148T* allele is an increased risk for the development of cutaneous melanoma and that special care should be taken about existing risks associated to excessive UV exposure in a tropical country.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Marylin Agranonik for assistance with statistical analysis, to Dr. Ursula Matte, Fernanda Pereira and Andressa Almeida for DNA extraction at Centro de Terapia

Gênica/ HCPA and Claudia Kammerbauer and Erika Müller-Sander for their excellent technical assistance at the Oncodermatology Lab of the Department of Dermatology from Ludwig-Maximilian University. This study was supported by grants from FINEP/HCPA, Brazil and the German Research Foundation. Renato M. Bakos received a scholarship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)/ DAAD (Deutscher Akademischer Austausch Dienst). This study was conducted in Serviço de Dermatologia/HCPA, Laboratório de Medicina Genômica and Centro de Pesquisa Experimental/HCPA, Porto Alegre/Brazil and in the Oncodermatology Lab of the Department of Dermatology, Ludwig-Maximilian University, Munich/Germany.

REFERENCES

Aitken J, Welch J, Duffy D, Milligan A, Green A, Martin N, et al (1999). CDKN2A variants in a population-based sample of Queensland families with melanoma. *J Nat Cancer Inst* 91:446-452.

Ashton-Prolla P, Bakos L, Junqueira Jr G, Giugliani R, Azevedo SJ and Hogg D (2008) Clinical and Molecular Characterization of Patients at Risk for Hereditary Melanoma in Southern Brazil. *J Invest Dermatol* 128:421-25.

Bakos L, Wagner M, Bakos RM, Leite CS, Sperhackle CL, Dzekaniak KS *et al* (2002) Sunburn, sunscreens, and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in southern Brazil. *Int J Dermatol* 41:557-62.

Bakos L, Masiero NC, Bakos RM, Burtet RM, Wagner MB, Benzano D (2009) European ancestry and cutaneous melanoma in Southern Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 23:304-7.

Bertram CG, Gaut RM, Barrett JH, Pinney E, Whitaker L, Turner F, *et al* (2002). An Assessment of the CDKN2A Variant Ala148Thr as a Nevus/Melanoma Susceptibility Allele. *J Invest Dermatol* 119:961-965.

Berwick M, Orlow I, Hummer AJ, Armstrong BK, Krickler A, Marrett LD, *et al* (2006). The Prevalence of CDKN2A Germ-Line Mutations and Relative Risk for Cutaneous Malignant Melanoma: An International Population-Based Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15:1520-5.

Debniak T, Scott RJ, Huzarski T, Byrski T, Rozmiarek A, Debniak B, *et al* (2005). CDKN2A Common Variants and Their Association with Melanoma Risk: A Population-Based Study. *Cancer Res* 65: 835-839.

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, *et al* (2005a) Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* 41:45-60.

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, *et al* (2005b) Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer* 41:28-44.

Goldstein AM, Chan M, Harland M, Gillanders EM, Hayward NK, Avril MF, *et al* (2006). High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer Res* 66: 9818-28.

Harland M, Holland EA, Ghiorzo P, Mantelli M, Bianchi-Scarra G, Goldstein AM, *et al* (2000). Mutation screening of the CDKN2A promoter in melanoma families. *Genes Chrom Cancer* 28:45-57.

Lilischkis R, Sarcevic B, Kennedy C, Warlters A, Sutherland RL (1996). Cancer-associated mis-sense and deletion mutations impair p16INK4 CDK inhibitory activity. *Int J Cancer* 66:249-54.

Lukowsky A, Schaefer-Hesterberg G, Sterry W, Voit C (2008). Germline CDKN2A/p16 mutations are rare in multiple primary and familial malignant melanoma in German patients. *J Dermatol Sci* 49:163-165.

Majore S, De Simone P, Crisi A, Eibenschutz L, Binni F, Antigoni I, *et al* (2008). CDKN2A/CDK4 molecular study on 155 Italian subjects with familial and/or primary multiple melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 21:209-11.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.

Newton Bishop JA, Harland M, Bennett DC, Bataille V, Goldstein AM, Tucker MA, *et al* (1999). Mutation testing in melanoma families: INK4A, CDK4 and INK4D. *Br J Cancer* 80: 295–300.

Orlow I, Begg CB, Cotignola J, Roy P, Hummer AJ, Clas BA, *et al* (2007). CDKN2A germline mutations in individuals with cutaneous malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 127:1234-43.

Pastorino L, Bonelli L, Ghiorzo P, Queirolo P, Battistuzzi L, Balleari E, *et al* (2008). CDKN2A mutations and MC1R variants in Italian patients with single or multiple primary melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 21:700–709.

Pjanova D, Engele L, Randerson-Moor JA, Harland M, Bishop DT, Newton Bishop JA, *et al* (2007). CDKN2A and CDK4 variants in Latvian melanoma patients: analysis of a clinic-based population. *Melanoma Res* 17:185-191.

Puig S, Malvehy J, Badenas C, Ruiz A, Jimenez D, Cuellar F, *et al* (2005). Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. *J Clin Oncol* 23:3043–3051.

Ranade K, Hussussian CJ, Sikorski RS, Varmus HE, Goldstein AM, Tucker MA, *et al* (1995). Mutations associated with familial melanoma impair p16INK4 function. *Nat Genet* 10:114–6.

Ruiz A, Puig S, Malvehy J, Lázaro C, Lynch M, Gimenez-Arnau AM, *et al* (1999). CDKN2A mutations in Spanish cutaneous malignant melanoma families and patients with multiple melanomas and other neoplasia. *J Med Genet* 36:490-3.

Spica T, Portela M, Gérard B, Formicone F, Descamps V, Crickx B, *et al* (2006). The A148T variant of the CDKN2A gene is not associated with melanoma risk in the French and Italian populations. *J Invest Dermatol* 126:1657-60.

Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF (2005). Cutaneous melanoma. *Lancet* 365:687-701.

Tucker MA (2009). Melanoma epidemiology. *Hematol Oncol Clin North Am* 23:383-95.

Walker GJ, Gabrielli BG, Castellano M, Hayward NK (1999). Functional reassessment of P16 variants using a transfection-based assay. *Int J Cancer* 82:305-12.

Table 1. Distribution of age, gender and skin type in cases and controls			
	Melanoma Group N= 127	Control Group N= 128	<i>p</i>
Age (years)			<i>ns</i>

Mean	56.2	57.8	
Gender (%)			<i>ns</i>
Male	48 (37.8)	49 (38.3)	
Female	79 (62.2)	79 (61.7)	
Skin Type (%)			<i>ns</i>
I	7 (5.5)	2 (1.6)	
II	70 (55.1)	66 (51.6)	
III	44 (34.6)	55 (42.9)	
IV	4 (3.2)	3 (2.3)	
V	2 (1.6)	2 (1.6)	

Table 2. Genotypic and allelic frequency of *p.A148T* in melanoma cases and controls

	Genotype			A148T allele frequency		N	<i>p</i>	OR (95% CI)
	AA (%)	AG (%)	GG (%)	A (%)	G (%)			
Melanoma group	2 (1.6)	14 (11.0)	111 (87.4)	7.10	92.90	127	0.009	3.8(1.4-10.5)
Control group	0 (0.0)	5 (3.9)	123 (96.1)	2.00	98.00	128		

Table3. Reported ethnic background of *p.A148T-positive* melanoma cases

Subjects	Gender	Age	Genotype	Ancestry
1	female	58	GA	German/Spanish
2	female	78	GA	Russian/Romenian
3	female	63	GA	German/Italian
4	male	56	GA	exclusively German Portuguese/ Brazilian
5	female	77	AA	Brazilian
6	female	60	GA	exclusively Italian
7	female	40	GA	exclusively German German/ Uruguayan
8	female	42	GA	Uruguayan
9	female	81	GA	German/Polish
10	male	54	AA	exclusively German
11	female	62	GA	Portuguese/Brazilian
12	male	78	GA	exclusively German
13	female	40	GA	exclusively German
14	male	54	GA	exclusively German
15	female	42	GA	exclusively German
16	female	52	GA	exclusively German

12. ARTIGO 2

Nestin and SOX9 and SOX10 transcription factors are coexpressed in melanoma

Authors:

Renato M Bakos¹, Tanja Maier¹, Robert Besch¹, Dominik S Mestel¹, Thomas Ruzicka¹,
Richard A Sturm², Carola Berking¹

1. Department of Dermatology, Ludwig-Maximilian University of Munich, Munich, Germany
2. Institute for Molecular Bioscience, University of Queensland, Brisbane, Australia

Corresponding author:
Carola Berking, MD
Department of Dermatology
Ludwig-Maximilian University
Frauenlobstr. 9-11
80337 Munich
Germany

Phone: +49 89 5160 6324
Fax: +49 89 5160 6322

Email: Carola.Berking@med.uni-muenchen.de

Word count : 2562

Tables : 3

Figures : 3

No conflicts of interest

Summary:

Nestin is an intermediate filament expressed in proliferating neural progenitor cells and has been considered as a stem cell marker. Nestin is also found in melanoma and we recently demonstrated that its expression in melanoma cell lines is regulated by the transcription factors SOX9 and SOX10, but not BRN2. In this study, the expression levels of nestin, BRN2, SOX9 and SOX10 were analyzed in tissues of melanoma (n=78) and melanocytic nevi (n=26) by immunohistochemistry. All proteins were highly expressed in primary and metastatic melanomas and, apart from BRN2, showed much lower levels in melanocytic nevi. Significant coexpression of nestin with SOX9 and SOX10 was found in primary melanoma confirming our *in vitro* data. Correlation analysis with clinicopathological data revealed that nestin was significantly associated with presence of ulceration in primary tumors and SOX9 with more advanced stage of disease. Our data reveal that SOX9 and SOX10 are highly expressed in melanoma and seem to have a regulatory role in nestin expression. The association with ulceration and advanced-stage tumors, respectively, suggests that nestin and SOX9 may be negative prognostic markers in melanoma.

Keywords: melanoma, melanocytic nevus, nestin, SOX, transcription factors

Introduction:

Melanocytes are cells of neuroectodermal origin which migrate to the epidermis and other pigment-producing tissues. They originate from proliferating neural progenitor cells which express a variety of intermediate filaments and transcription factors that are essential for the differentiation of melanocytes during the embryogenic process. Melanocytic nevi are common benign lesions that derive from melanocytes. Their presence is considered a relevant risk factor for the development of cutaneous malignant melanoma. (1) Melanoma is the most worrisome cancer of the skin due to its high mortality and increasing incidence rates. (2) The signalling events that constitute the malignant transformation of melanocytes into melanoma cells are not completely understood. (3) Recent data demonstrate that several tumor cells, including melanoma cells, are able to re-express proteins of progenitor cells suggesting that they may behave like stem cells and that the proteins may facilitate tumor proliferation, growth and migration. (4,5) The concept of a small subset of melanoma stem cells that seed new tumor has recently been brought into question, (6) however the induction of stem cell markers may be a notable property of epithelial-mesenchymal transitions that may occur in melanoma initiation and progression. (7)

Nestin (NES) is an intermediate filament expressed in proliferating neural progenitor cells. Nestin re-expression after embryogenesis has been reported in several pathological states of the central nervous system (CNS), like epilepsy, inflammation and trauma. (8-10) In CNS neoplasms and melanoma, nestin has been associated with tumor proliferation and migration. (11,12)

The Class III POU domain transcription factor BRN2 was thought to be involved in the activation of nestin. It has been reported previously that the nestin gene possesses an enhancer dependent on binding sequences for SOX2 and BRN2. (13) BRN2 expression is more intensively observed in melanoblasts than in melanocytes showing that it plays an important role during normal development. (14-16) Moreover, inhibition of BRN2 in

melanoma cells leads to changes in morphology, loss of the melanocytic phenotype and inability to form tumors in mice, demonstrating that BRN2 is also important for melanoma growth. (17) POU and SOX protein family members may coexist during their transcriptional activities in a given tissue in a coordinated manner. We have recently demonstrated that SOX9 and SOX10 play an important role in nestin activation in melanoma cell lines, rather than BRN2. (18) SOX family transcription factors have also been shown to influence survival and migration of oligodendrocyte precursors (19) and SOX10 seems to be important for the regulation of melanocyte differentiation. (20) During embryogenesis, SOX10 regulates the expression of MITF (Microphthalmia-associated Transcription Factor) through target binding sites in the MITF upstream activator region. (21) It also activates the tyrosinase enhancer, contributing directly to tyrosinase gene regulation in melanocytes. (22)

Another SOX family protein, SOX9, is known to have an important role in sexual determination and chondrogenesis. Recently, it has been reported to interact with SOX10 and BRN2 in melanocytic differentiation and to be highly expressed in pigmented cultured melanoma cells. (16)

MITF has been implicated to participate in melanocyte development, differentiation and pigmentation (23) and to control melanoma survival, proliferation, and migration. (24) Transcription factors from the SOX family are involved in MITF activation and, recently, it has been demonstrated that BRN2 directly represses MITF. (25,26)

In this paper, we aimed to investigate the protein expression of transcription factors SOX9, SOX10 and BRN2, as well as their coexpression with nestin and MITF in different melanocytic tumors in situ. A correlation of expression results with clinicopathological data revealed an association of nestin and SOX9 with negative prognostic parameters.

Material and Methods:

Tissue samples

Paraffin-embedded tissue sections were collected at the Department of Dermatology at the Ludwig-Maximilian University in Munich between 1993 and 2004. Fifty-seven tissue sections of histopathologically confirmed primary melanoma were analyzed including 21 superficial spreading melanomas (SSM), 20 nodular malignant melanomas (NMM), 4 acrolentiginous melanomas (ALM), 2 lentiginous malignant melanomas (LMM), 5 melanomas in situ (MMis) and 5 melanomas of unknown classification. Additionally, 21 histopathologically proven cutaneous and subcutaneous melanoma metastases were included. Furthermore, 26 melanocytic nevi from different subtypes were analyzed including 10 dysplastic nevi.

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded sections (5µm) were deparaffinized in xylene and rehydrated in a graded series of isopropanol. Antigen retrieval was achieved by microwave in citrate buffer, pH 6.0 (Chemicon ICH Select, Temecula, Canada). Blocking of unspecific binding was performed with FCS/ TRIS 20%. Primary antibodies used were a polyclonal rabbit anti-human BRN2, (27) a monoclonal mouse anti-human NES IgG1 (sc-23927, Santa Cruz Inc., Heidelberg), a polyclonal rabbit anti-human SOX9 (ab36748, Abcam plc, Cambridge, United Kingdom), a polyclonal rabbit anti-human SOX10 (ab25978, Abcam plc) and a monoclonal mouse anti-human MITF (MS-772-P1, Neomarkers, Fremont, CA, United States). Secondary antibodies were mouse anti-rabbit antibody (M0737, DAKO, Glostrup, Denmark), rabbit anti-mouse antibody (Z0259, DAKO, Glostrup, Denmark) and alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase (APAAP) method (D0651, DAKO). Fast red (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was used as substrate and Mayer's hematoxylin as

counterstaining. The sections were mounted in Kaiser's glycerol gelatine. Tissue sections were inspected by three investigators (R.M.B., T.M., C.B.) using a microscope (Axioscop, Zeiss, Munich). The lesions were classified as positive when at least 1-2 % of the tumor area showed red staining. Staining intensity (reactivity) was graded as weak (+), moderate (++) and high (+++).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the statistical package SPSS version 16.0 (Superior Performance Software System, Munich, Germany). For the better analysis of protein coexpression and association of protein expression with clinicopathological parameters, percentages of positive cells and staining intensity were merged in an immunoreactive score. The percent staining was multiplied by the staining intensity and divided by 10. Statistical significance for coexpression was assessed by the Spearman's correlation coefficient and for association with clinicopathological parameters with the Kruskal-Wallis test. A p value of < 0.05 was regarded as significant.

Results:**Nestin, BRN2, SOX9 and SOX10 expression in melanomas**

A total of 57 different primary melanomas were evaluated for protein expression of nestin, SOX9, SOX10 and BRN2 by immunohistochemistry (Table 1). In 56% of the primary melanomas, nestin was detected with varying staining intensity and with less than 50% of positive cells within each tumor in the majority of cases (Figure 1A). Nestin was localized almost exclusively to the cytoplasm of cells and was commonly found in the periphery of the tumor (Figure 1A). BRN2 protein expression was detected in 78.4% of primary melanomas, mostly in the cytoplasm of the cells (Figure 1B). Most of the cases showed a moderate expression with varying percentages of BRN2-positive cells. SOX9 was detected in 76% of primary melanomas with a moderate to high expression pattern (Figure 1C). SOX9 was localized exclusively in the nuclei, but in a few cases also in a perinuclear pattern. SOX10 was detected in 43% of primary melanomas with varying staining intensity and percentages of positive cells (Figure 1E). SOX10 expression was distributed in the cytoplasm and perinuclear area.

The coexpression of transcription factors with nestin within the tumors was also evaluated. In nestin-positive cases, SOX9, SOX10 and BRN2 were distributed throughout the tumors. Coexpression of nestin with SOX9 and SOX10 showed statistical significance at $p=0.009$ and $p=0.006$ (Table 2).

Nestin, BRN2, SOX9 and SOX10 expression in melanoma metastases

Nestin, BRN2, SOX9 and SOX10 expression was analyzed in a total of 21 melanoma metastases (Table 1). Nestin was found in 57% of melanoma metastases with a weak expression pattern in scattered cells in the majority of the cases. BRN2 was detected in 53% of melanoma metastases with a weak staining intensity and expressed by less than 50% of cells in each tumor. SOX9 was expressed in most of melanoma metastases

showing weak to moderate staining intensity in the majority of the cells (Figure 1D). SOX10 expression was weak in all positive cases and observed in half of melanoma metastases (Figure 1F). The staining pattern of the proteins in metastatic melanoma cells was similar to that found in primary melanomas. Nestin and BRN2 were almost exclusively detected in the cytoplasm, SOX9 expression was present in the nuclei and perinuclear area and SOX10 showed a perinuclear and cytoplasmatic pattern. No statistical significance for protein coexpression was found in melanoma metastases.

Nestin, BRN2, SOX9 and SOX10 expression in melanocytic nevi

In melanocytic nevi, expression of nestin was detected in 27% of the cases, of BRN2 and SOX9 in 73% and of SOX10 in 31% (Table 1). The staining intensity in nevi was generally weak for all tested proteins except for one case which showed moderate expression of SOX9. The amount of nestin-positive nevus cells per tumor ranged from 1-9% and showed varying percentages for BRN2, SOX9 and SOX10. In melanocytic nevi, coexpression of the analyzed proteins reached no statistical significance (Table 2).

Association of nestin, BRN2, SOX9 and SOX10 in melanoma with clinicopathological parameters

The data of nestin, SOX9 and SOX10 expression were correlated with tumor-associated clinical and pathological data. The records of 51 melanoma patients could be reviewed and the following parameters were investigated: tumor thickness, presence of ulceration and different tumor stages according to the AJCC (American Joint Committee on Cancer) TNM staging system (Table 3). SOX10 protein expression was associated with thinner melanomas (< 1mm) at $p=0.047$. Nestin expression was associated with the presence of ulceration in primary melanoma lesions at $p=0.008$ (Figure 2). SOX9 protein expression was statistically associated with advanced stage of disease (AJCC III+IV) at $p=0.048$.

MITF expression in melanocytic tumors

Since MITF plays an important role in melanomagenesis and SOX and POU-domain proteins are involved in its signaling pathway, we have further investigated MITF protein expression in the same melanocytic tumors. Fifteen of 49 (31%) primary melanomas and 8 of 20 (40%) melanoma metastases showed MITF expression, while it was detectable in only 19% (5/26) of melanocytic nevi (data not shown).

In primary melanomas, reactivity was weak in 8 cases, moderate in 6 cases and high in one case. Metastases and melanocytic nevi showed mostly a weak MITF expression. The amount of MITF-expressing cells within primary melanomas and metastases was 10-49% in about half of the positive cases and 1-9% in the remaining cases. In melanocytic nevi, MITF was only expressed by 1-9% of all nevus cells. MITF expression was mostly localized to the cytoplasm of cells and more abundant in areas with obvious melanin deposition (Figure 3). Coexpression of MITF and other investigated proteins was not found nor an association with clinicopathological parameters.

Discussion

Nestin expression in melanocytic tumors has been reported previously. (12,28-30) It supports the theory that stem cells or expression of stem cell markers could play a role in melanoma development. (12) Varying levels of expression were found in primary and metastatic melanoma, which we could also confirm in contrast to melanocytic nevi, which showed no or only weak nestin expression in single cells, similar to the observations by Brychtova et al. (30) Klein *et al.* have hypothesized that this difference in expression resulted from a self-limited event occurring in common nevi whereas in melanomas additional mutations might lead to the evolution of malignant stem cells. (12)

Nestin activation has been shown previously to be dependent on BRN2 and transcription factors of the SOX family in neuronal primordial cells. (13) Recently, we have demonstrated that downregulation of BRN2 in melanoma cells in culture did not alter nestin expression. Instead, we observed that SOX9 and SOX10 inhibition in these cells, decreased both BRN2 and nestin levels. (18) Therefore, we investigated the protein expression of these two members of the SOX family and of BRN2 in melanocytic lesions in situ and compared it to nestin expression.

We observed that BRN2 was expressed in nevi, primary and metastatic melanoma. It was least expressed in metastatic melanoma with a significant higher expression in nevi and primaries. Moreover, BRN2 reactivity was stronger in primary melanomas. It has been shown previously that BRN2 mRNA is highly upregulated in melanoma cell lines compared to melanocytes. (14) On the other hand, our results indicate that BRN2 is present in benign lesions and may be important for melanocyte proliferation leading to melanoma formation.

As expected, MITF expression was high in primary and metastatic melanoma, while it was never diffuse, but always restricted to a subpopulation of cells, as reported by Goodall *et*

al. (25) In addition, MITF expression was mainly confined to areas of pigmentation, which is in line with the central role of MITF in the regulation of melanin production. (31)

We also demonstrated that SOX9 and SOX10 are expressed in different melanocytic tumors. Primary and metastatic melanomas showed higher levels of expression in comparison to nevi, especially regarding SOX10 protein. Moreover, melanomas clearly showed stronger reactivity for SOX9 and SOX10 than melanocytic nevi. In agreement with our data, Cook *et al.* (16) have previously reported that SOX9 and SOX10 are important melanogenic transcriptional regulators being highly expressed in melanocyte precursors, but down-regulated upon differentiation. It was also demonstrated that cultured melanoma cells had 9.5-fold more amounts of SOX10 than melanocytes. Passeron *et al.* detected SOX9 mRNA expression in melanocytes by tissue *in situ* hybridization. (32)

SOX family transcription factors exert their main activities by binding to DNA. We observed that SOX9 was expressed mainly in the nucleus, while SOX10 was distributed in the perinuclear and cytoplasmatic region. In this scenario, cytoplasmatic staining found for SOX9, SOX10, BRN2 and MITF may mean that they are also present outside the nucleus, but probably not in an activated state.

In primary melanomas, we found a statistically significant coexpression of nestin with SOX9 and SOX10. This is in line with our *in vitro* data suggesting that SOX9 and SOX10 play a key role in nestin activation in melanoma cells. (17) Nestin has already been associated with depth of invasion and an aggressive histopathologic melanoma subtype (nodular melanoma). (30) Although an association between nestin and these clinical features could not be observed in our cases, the increased nestin expression in ulcerated lesions confirms nestin to be associated with tumor aggressiveness and worse prognosis. Our data suggest also that SOX9 may represent a negative prognostic marker as it was associated with advanced stage of disease, although statistical significance was not strong ($p=0.048$). We demonstrated that SOX10 was associated with thin primary melanomas.

This may indicate that SOX10 plays a major role in initial events of melanoma development.

Alonso et al. have reported that proteins characteristic for epithelial mesenchymal transition (EMT) are expressed in melanomas and correlate with metastasis development.

(33) As EMT may also occur in stem cells (7), further studies assessing the association of EMT-related proteins and nestin, SOX- and POU-family transcription factors in melanoma tissues would be of great interest.

In conclusion, we have observed that the intermediate filament nestin and the transcription factors SOX9, SOX10 and BRN2 are expressed in melanoma tissues. We confirmed our previous in vitro data that SOX9 and SOX10 seem to play a key role in nestin activation. Nestin and SOX9 expression are increased, respectively, in ulcerated melanomas and advanced-stage melanoma and may be markers of tumor aggressiveness.

Acknowledgement

This work was supported by the Curd-Bohnewand-Fonds (to TM) of the Ludwig-Maximilian University of Munich, by the German Research Foundation (DFG, BE 2189/2-3 to CB and GK 1202 to CB and RB) and the Hiege Foundation against skin cancer (to CB). RMB received a scholarship from the German Council for Research (DAAD) and the Brazilian Council of Research (CAPES). RAS is a Senior Research Fellow of the Australian NHMRC and supported by the Cancer Council Queensland. We thank Ursula Nägele for her excellent technical assistance.

References

1. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer* 2005;41: 28-44.
2. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous Melanoma. *Lancet* 2005;365: 687-701.
3. Nambiar S, Mirmohammadsadegh A, Hassan M, Hegemann JH, Hengge UR. Transcriptional regulation of ASK/Dbf4 in cutaneous melanoma is dependent on E2F1. *Exp Dermatol* 2008;17:986-91.
4. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res* 2005;65:9328-37.
5. Huang EH, Heidt DG, Li CW, Simeone DM. Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor progression and therapeutic resistance. *Surgery* 2007;141:415-9.
6. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 2008;456:593-8.
7. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133:704-15.
8. Jin JK, Jeong BH, Na YJ, Kim YS, Carp RI, Wie MB, Moon C, Shin T. Increased expression of the embryonic intermediate filament, nestin, in the brains of scrapie-infected mice. *Neurosci Lett* 2004;367:254.
9. Sunabori T, Tokunaga A, Nagai T, Sawamoto K, Okabe M, Miyawaki A, Matsuzaki Y, Miyata T, Okano H. Cell-cycle-specific nestin expression coordinates with morphological changes in embryonic cortical neural progenitors. *J Cell Sci* 2008;121:1204-12.
10. Wang L, Wang X, Yuan J, Xi Z, Xue T, Li Y, Xiao Z. Nestin in the Temporal Neocortex of the Intractable Epilepsy Patients. *Neurochem Res* 2009;34:574-580.
11. Dahlstrand J, Collins VP, Lendahl U. Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res* 1992;52:5334-41.
12. Klein WM, Wu BP, Zhao S, Wu H, Klein-Szanto AJ, Tahan SR. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod Pathol* 2007;20:102-7.
13. Tanaka S, Kamachi Y, Tanouchi A, Hamada H, Jing N, Kondoh H. Interplay of SOX and POU factors in regulation of the Nestin gene in neural primordial cells. *Mol Cell Biol* 2004;24:8834-46.

14. Cook AL, Donatien PD, Smith AG, Murphy M, Jones MK, Herlyn M, Bennett DC, Leonard JH, Sturm RA. Human melanoblasts in culture: expression of BRN2 and synergistic regulation by fibroblast growth factor-2, stem cell factor, and endothelin-3. *J Invest Dermatol* 2003;121:1150-9.
15. Goodall J, Wellbrock C, Dexter TJ, Roberts K, Marais R, Goding CR. The Brn-2 transcription factor links activated BRAF to melanoma proliferation. *Mol Cell Biol* (2004a);24:2923-31.
16. Cook AL, Smith AG, Smit DJ, Leonard JH, Sturm RA. Co-expression of SOX9 and SOX10 during melanocytic differentiation in vitro. *Exp Cell Res* 2005;308:222-35.
17. Thomson JAF, Murphy K, Baker E, Sutherland GR, Parsons PG, Sturm RA. The brn-2 gene regulates the melanocytic phenotype and tumorigenic potential of human melanoma cells. *Oncogene* 1995;11:691-700.
18. Flammiger A, Besch R, Cook AL, Maier T, Sturm RA, Berking C. SOX9 and SOX10 but not BRN2 are required for nestin expression in human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2008:EPub ahead of print.
19. Finzsch M, Claus Stolt C, Lommes P, Wegner M. Sox9 and Sox10 influence survival and migration of oligodendrocyte precursors in the spinal cord by regulating PDGF receptor alpha expression. *Development* 2008;135:637-646.
20. Mollaaghababa R, Pavan WJ. The importance of having your SOX on: role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia. *Oncogene* 2003;22:3024-34.
21. Verastegui C, Bille K, Ortonne JP, Ballotti R. Regulation of the microphthalmia-associated transcription factor gene by the Waardenburg syndrome type 4 gene, SOX10. *J Biol Chem* 2000;275:30757-60.
22. Murisier F, Guichard S, Beermann F. The tyrosinase enhancer is activated by Sox10 and Mitf in mouse melanocytes. *Pigment Cell Res* 2007;20:173-84.
23. Widlund HR, Horstmann MA, Price ER, Cui J, Lessnick SL, Wu M, He X, Fisher DE. Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. *J Cell Biol* 2002;158:1079-87.
24. Vance KW, Goding CR. The transcription network regulating melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Res* 2004;17:318-25.
25. Goodall J, Carreira S, Denat L, Kobi D, Davidson I, Nuciforo P, Sturm RA, Larue L, Goding CR. Brn-2 represses microphthalmia-associated transcription factor expression and marks a distinct subpopulation of microphthalmia-associated transcription factor-negative melanoma cells. *Cancer Res* 2008;68:7788-94.
26. Cook AL, Sturm RA. POU domain transcription factors: BRN2 as a regulator of melanocytic growth and tumourigenesis. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008; 21:611-26.

27. Smith AG, Brightwell G, Smit SE, Parsons PG, Sturm RA. Redox regulation of Brn-2/N-Oct-3 POU domain DNA binding activity and proteolytic formation of N-Oct-5 during melanoma cell nuclear extraction. *Melanoma Research* 1998;8: 2-10.
28. Flørenes VA, Holm R, Myklebost O, Lendahl U, Fodstad O. Expression of the neuroectodermal intermediate filament nestin in human melanomas. *Cancer Res* 1994;54:354-6.
29. Ehrmann J, Kolár Z, Mokry J. Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumours. *J Clin Pathol* 2005;58:222-3.
30. Brychtova S, Fiuraskova M, Hlobilková A, Brychta T, Hirnak J. Nestin expression in cutaneous melanomas and melanocytic nevi. *J Cutan Pathol* 2007; 34:370-5.
31. Fisher DE. Microphthalmia: a signal responsive transcriptional regulator in development. *Pigment Cell Res* 2000;13:145-9.
32. Passeron T, Valencia JC, Bertolotto C, Hoashi T, Le Pape E, Takahashi K, Ballotti R, Hearing VJ. SOX9 is a key player in ultraviolet B-induced melanocyte differentiation and pigmentation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:13984-9.
33. Alonso SR, Tracey L, Ortiz P, Perez-Gomez B, Palacios J, Pollan M, *et al.* A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis. *Cancer Res* 2007;67:3450-60.

Table 1: Nestin, BRN2, SOX9 and SOX10 protein expression in melanocytic lesions and respective staining intensity (1+, weak; 2+ moderate; 3+ high).

	Nestin (%)				BRN2 (%)				SOX9 (%)				SOX10 (%)							
	<i>pos</i>			<i>Neg</i>	<i>pos</i>			<i>neg</i>	<i>pos</i>			<i>neg</i>	<i>pos</i>			<i>neg</i>				
	1+	2+	3+	total	1+	2+	3+	total	1+	2+	3+	total	1+	2+	3+	total				
Melanoma	23	9	0	32(56)	25(44)	29	11	0	40(78)	11(22)	12	12	13	37(76)	12(24)	15	5	1	21(43)	28(57)
Metastasis	10	2	0	12(57)	9(43)	9	0	0	9(53)	8(47)	9	7	0	16(80)	4(20)	10	0	0	10(50)	10(50)
Nevi	6	0	0	6(27)	20(73)	16	0	0	16(73)	6(27)	18	1	0	19(73)	7(27)	8	0	0	8(31)	18(69)

Table 1: Nestin, BRN2, SOX9 and SOX10 protein expression in melanocytic lesions and respective staining intensity (1+, weak; 2+ moderate; 3+ high).

Table 2: Coexpression between nestin and transcription factors BRN2, SOX9 and SOX10 in melanocytic tumors.

Primary melanomas						
	<i>BRN2 (rs)</i>	<i>p</i>	<i>SOX9 (rs)</i>	<i>p</i>	<i>SOX10 (rs)</i>	<i>p</i>
Nestin	0.16	<i>ns</i>	0.37	0.009	0.38	0.006
Melanoma metastasis						
	<i>BRN2 (rs)</i>	<i>p</i>	<i>SOX9 (rs)</i>	<i>p</i>	<i>SOX10 (rs)</i>	<i>p</i>
Nestin	0.41	<i>ns</i>	0.11	<i>ns</i>	0.01	<i>ns</i>
Melanocytic nevi						
	<i>BRN2 (rs)</i>	<i>p</i>	<i>SOX9 (rs)</i>	<i>p</i>	<i>SOX10 (rs)</i>	<i>p</i>
Nestin	0.23	<i>ns</i>	0.12	<i>ns</i>	0.01	<i>ns</i>

Table 2: Correlation matrix using Spearman's coefficient (rs) to evaluate the association of nestin and the

transcription factors SOX9, SOX10 and BRN2 stratified by melanocytic lesions

Table 3: Correlation of nestin, BRN2, SOX9 and SOX10 protein expression in melanoma with clinicopathological parameters. Shown is the calculated immunoreactive score (see Material and Methods).

	Nestin		BRN2		SOX9		SOX10	
	md (min to max)	<i>p</i>	md (min to max)	<i>p</i>	md (min to max)	<i>p</i>	md (min to max)	<i>p</i>
Tumor thickness								
< 1mm	0 (0 to 8)		3.5 (0 to 14)		9 (0 to 30)		5 (0 to 18)	
> 1mm	0.1 (0 to 18)	<i>ns</i>	2 (0 to 16)	<i>ns</i>	12 (0 to 27)	<i>ns</i>	0 (0 to 10)	<i>0.047</i>
Tumor thickness								
< 2mm	0.1 (0 to 10)		3.5 (0 to 14)		8 (0 to 30)		2 (0 to 18)	
> 2mm	0.2 (0 to 18)	<i>ns</i>	2 (0 to 16)	<i>ns</i>	16 (0 to 27)	<i>ns</i>	0 (0 to 10)	<i>ns</i>
Ulceration								
Absent	0 (0 to 8)		3.5 (0 to 16)		16 (0.3 to 21)		0 (0 to 18)	
Present	0.5 (0 to 12)	<i>0.008</i>	2 (0 to 16)	<i>ns</i>	8 (0 to 30)	<i>ns</i>	1 (0 to 9)	<i>ns</i>
TNM AJCC staging								
I + II	0.1 (0 to 10)		4 (0 to 16)		6 (0 to 24)		0 (0 to 12)	
III + IV	0.1 (0 to 18)	<i>ns</i>	2 (0 to 16)	<i>ns</i>	18 (0 to 30)	<i>0.048</i>	0 (0 to 18)	<i>ns</i>

Table 3: Correlation of nestin, BRN2, SOX9, and SOX10 protein expression in melanoma with clinicopathological parameters. Shown is the median of calculated immunoreactive score (md), minimal and maximal value (min, max). (see Material and Methods) P: statistical significance using Kruskal-Wallis.

Figure 1: Immunohistochemical detection (in red) of (A) nestin and (B) BRN2 protein in primary melanoma. Analysis of (C) SOX9 showed an intense nuclear expression in primary melanoma and (D) a cytoplasmatic pattern in melanoma metastasis. (E) SOX10 protein was found perinuclear and cytoplasmatic in primary melanoma as well as (F) in melanoma metastasis. (200x, scale bars: 40µm).

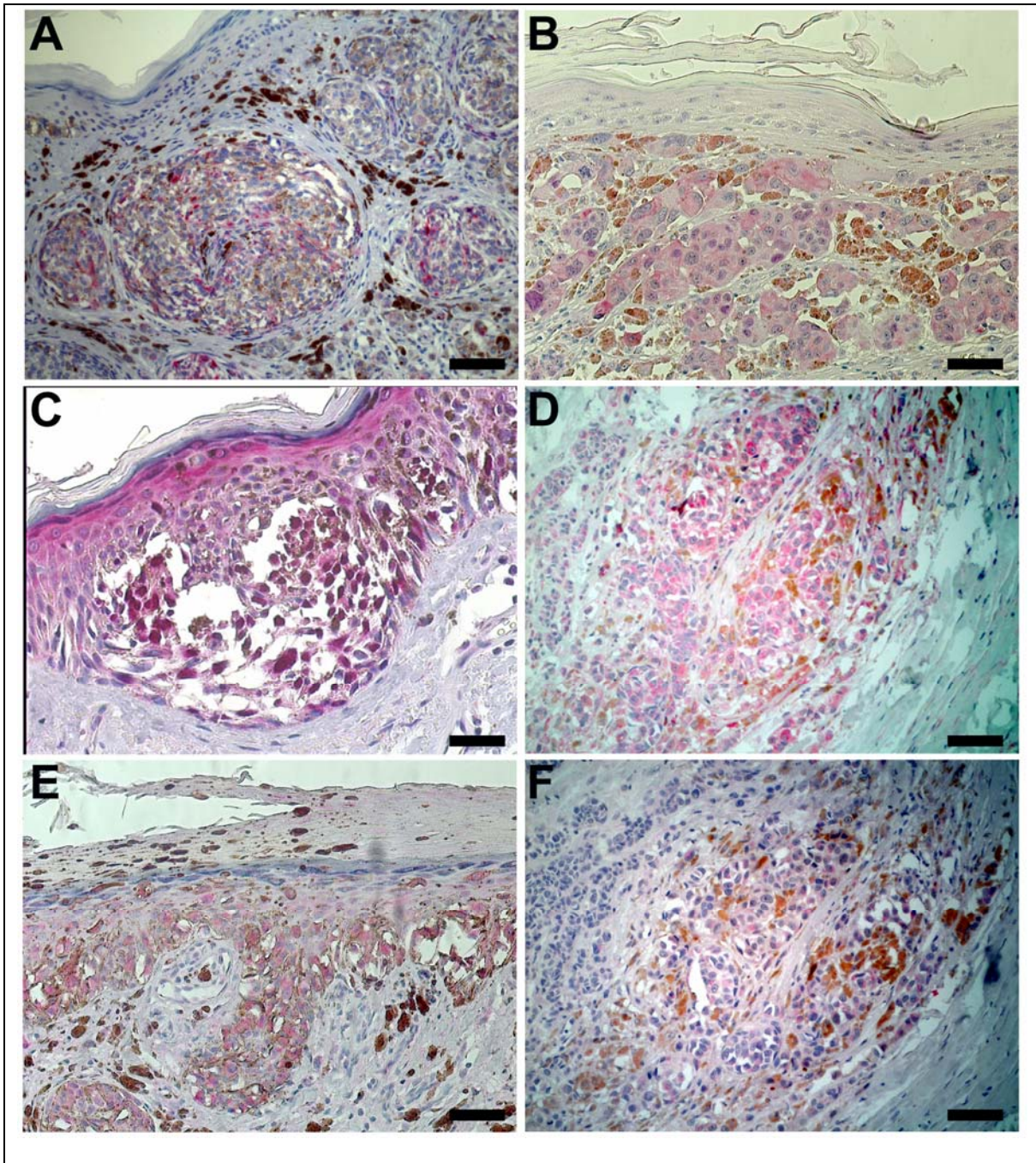


Figure 2: Immunohistochemical analysis of (A + B) nestin in ulcerated primary melanoma showing stained cells within the ulcerated areas (A, 100x, scale bar: 100 μ m and B, 200x, scale bar: 40 μ m).

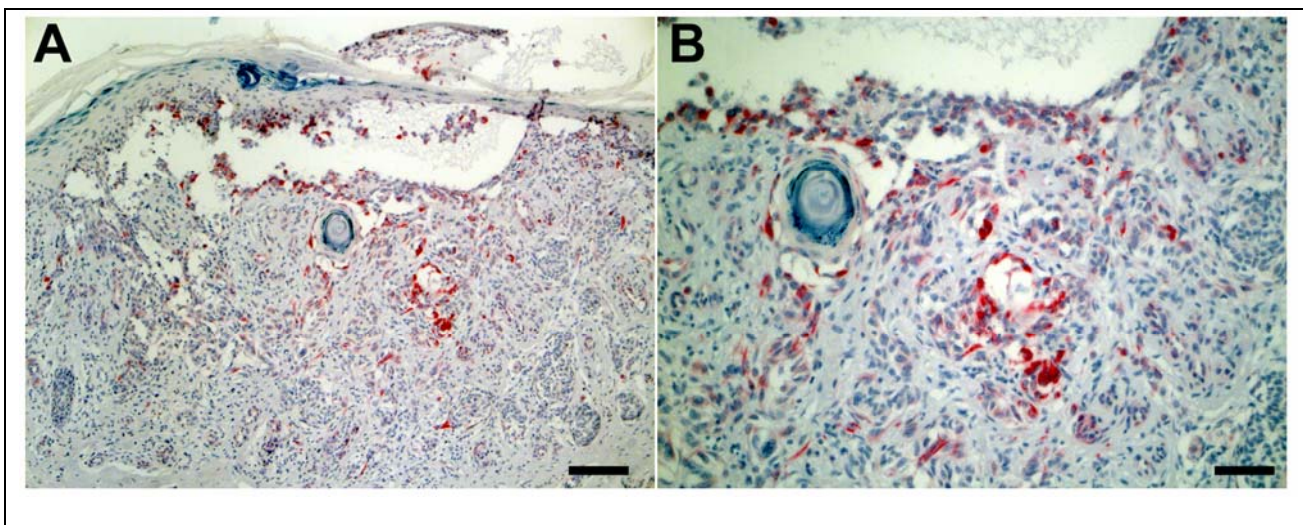
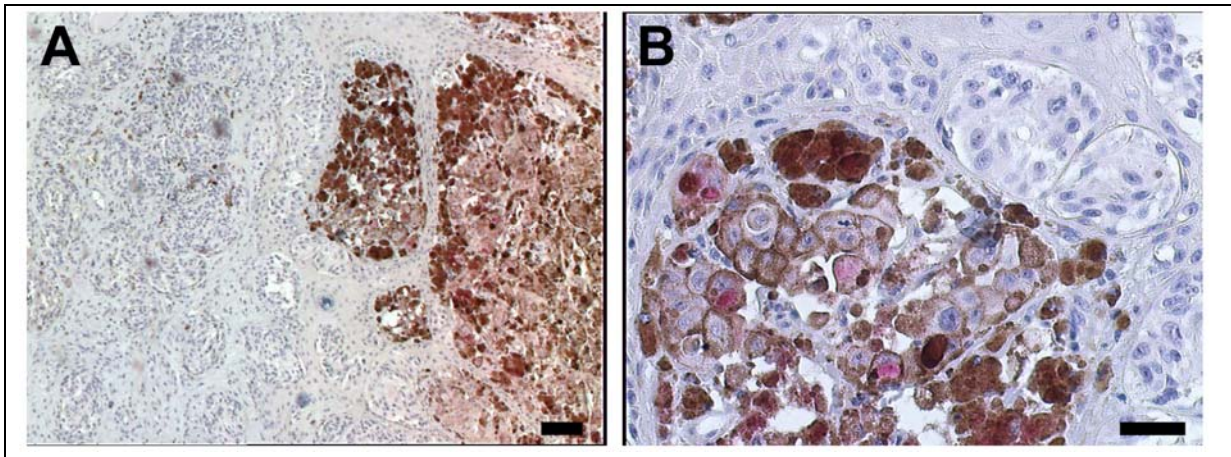


Figure 3: Immunohistochemical analysis of (A+B) MITF protein (red staining) in melanoma revealed an association of MITF expression with pigmented areas of the tumor (A, 100x, scale bar: 100 μ m and B, 200x, scale bar: 40 μ m).



13. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dois artigos apresentados analisaram aspectos importantes envolvidos na gênese do melanoma. Estes estudos oferecem contribuições importantes para o reconhecimento de pacientes que apresentam maior susceptibilidade genética ao melanoma no nosso meio e

para a caracterização de expressões de marcadores de células primordiais *in vivo*. As principais conclusões referentes aos objetivos da tese são apresentadas a seguir:

“Avaliar as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo p.A148T do gene CDKN2A em pacientes com melanoma e controles no Rio Grande do Sul e o risco associado ao desenvolvimento da neoplasia.”

O estudo molecular de 127 casos de melanoma cutâneo e de 128 controles demonstrou uma diferença estatisticamente significativa na frequência do polimorfismo *p.A148T* nos casos (12,6%) em relação aos controles (3,9%). O OR para esta diferença foi de 3,8 confirmando que a presença do polimorfismo é um indicador de risco para o desenvolvimento do melanoma na população em estudo. Assim como em outras populações, o *p.A148T* deve ser considerado um gene de susceptibilidade para o melanoma no Rio Grande do Sul.

“Correlacionar a presença do polimorfismo p.A148T com características fenotípicas dos pacientes e com critérios clínico-patológicos dos melanomas.”

p.A148T foi encontrado em maior frequência em casos apresentando melanoma familiar ou melanomas primários múltiplos. Por outro lado, uma associação entre a presença do polimorfismo e a existência quantitativa e qualitativa de nevos não foi encontrada. Além disso, dados clínico-patológicos dos tumores como espessura tumoral, tipo histológico, local da lesão primária também não se mostraram associados ao polimorfismo. Estes dados demonstram que pacientes com alto risco familiar têm maior probabilidade de apresentar *p.A148T*, porém, que o polimorfismo não está correlacionado com algum tipo específico de melanoma ou progressão da doença.

“Avaliar a origem étnica declarada dos pacientes com melanoma que apresentam o polimorfismo p.A148T.”

Todos os pacientes apresentaram ancestralidade europeia, sendo que muitos deles de maneira exclusiva. Isto poderia sugerir que o polimorfismo p.A148T na nossa população tenha uma provável origem em países europeus.

“Avaliar a expressão imunoistoquímica das proteínas nestina, SOX9, SOX10 e BRN2 em melanomas primários, metástases de melanoma e nevos melanocíticos.”

Os resultados demonstram que as proteínas nestina, SOX9, SOX10 e BRN2 são expressas em diferentes tipos de tumores melanocíticos. Os dados referentes à expressão da nestina confirmam o que já foi observado em estudos semelhantes. As expressões imunoistoquímicas de SOX9 e SOX10 em associação com a nestina foram descritas com ineditismo. Por serem maiores em tecidos de melanoma do que em nevos, tendo como base suas características funcionais, conclui-se que estas proteínas devem desenvolver um papel importante na sua gênese.

“ Avaliar a coexpressão da nestina com as demais proteínas nos tecidos melanocíticos.”

A coexpressão da nestina com SOX9 e SOX10 em melanomas primários encontrada no presente estudo caracteriza *in vivo* os achados descritos recentemente na literatura que apontam estes fatores de transcrição como os principais responsáveis pela ativação da nestina em melanomas.

“Correlacionar a expressão imunoistoquímica das proteínas avaliadas com critérios clínico-patológicos do melanoma.”

A correlação da expressão da nestina com a presença de ulceração e da expressão de SOX9 com tumores em estágios mais avançados significa que estas expressões poderiam ser marcadores com significado prognóstico. Por outro lado, a associação da expressão de SOX10 com tumores de espessura inferior a 1mm significaria que esta proteína poderia ter sua ação principal em fases iniciais de progressão tumoral.

14. ANEXOS

14.1. ANEXO A: Protocolo de avaliação dos casos de melanoma e controles no HCPA.

Protocolo de avaliação:

1. Dados de identificação do paciente

- 1.1 Paciente nº ____
- 1.2 Nome Completo: _____
- 1.3 Prontuário: _____
- 1.4 Idade: ____ (se menor de 18 anos, autorização dos pais)
- 1.5 Data de nascimento: ____/____/____
- 1.6 Endereço: _____
- 1.7 Telefone para contato: _____
- 1.8 Naturalidade: _____ 1.9 Nacionalidade: _____
- 1.10 Procedência: _____
- 1.11 () Caso-1 () Controle-2
- 1.12 Sexo: () masculino-1 () feminino-2

2. Dados do melanoma (casos)

- 2.3 Idade de diagnóstico: _____
- 2.4 Localização: _____
- 2.5 Índice de Clark: _____
- 2.6 Índice de Breslow: _____
- 2.7 Tipo clínico-histológico: () *in situ*-1 () acral-2 () Espalhamento superficial-3
() nodular-4 () Lentigo Maligno-5

3. História médica pregressa e familiar

- 3.1 Histórico prévio de melanoma:
() Sim-1. Quantos? _____
() Não-2
- 3.2 Histórico prévio de neoplasias malignas viscerais (pâncreas, feocromocitoma, mama):
() Sim-1. Qual? _____
() Não-2
- 3.3 Histórico familiar de melanoma:
() Sim-1. Grau de parentesco: _____
() Não-2

3.4 Histórico familiar de neoplasias malignas viscerais(pâncreas, feocromocitoma, mama):

- () Sim-1. Qual? _____ Grau de parentesco: _____
() Não-2

4. Histórico de fotoexposição

4.1 Você já teve queimaduras de sol com bolhas?

- () Sim-1. Quantas: _____
() Não-2

4.2 Quanto tempo você costuma se expor ao sol por ano?

- () 1. Inferior à 1 mês
() 2. Entre 1- 3 meses: Quantos: _____
() 3. Mais de 3 meses. Quantos: _____
() 4. Nunca me exponho ao sol.

4.3 Por quantos anos: _____

4.4 Utilização de filtros solares durante o ano antes dos 25 anos:

- () 1. nunca
() 2. somente no verão
() 3. quase sempre
() 4. durante todo o ano

4.5 Utilização de filtros solares durante o ano nos últimos 10 anos:

- () 1. nunca
() 2. somente no verão
() 3. quase sempre
() 4. todo o ano

5. Exame dermatológico

5.1 Número total de nevos melanocíticos: _____

5.2 Número de nevos displásicos: _____

5.3 Fototipo

- () 1. I
() 2. II
() 3. III
() 4. IV
() 5. V
() 6. VI

5.4 Cor de cabelos (aos 20 anos de idade):

() 1. louros () 2. ruivos () 3. pretos () 4. castanhos escuros () 5. castanhos claros

5.5 Cor dos olhos (sem lentes):

() 1. azuis () 2. verdes () 3. negros () 4. castanhos () 5. outros

6. Ancestralidade

6.1 Nacionalidade:

Pai: _____ Mãe: _____

Avô Paterno: _____ Avó Paterna: _____

Avô Materno: _____ Avó Materna: _____

Descendentes anteriores: _____ Quantos: _____

7. Presença de Polimorfismo p.A148T

7.1 DNA sangue periférico

() 1. Sim

() 2. Não

14.2. ANEXO B: Termo de consentimento livre e esclarecido dos casos aplicado no

HCPA.

Projeto de pesquisa: Avaliação da presença do polimorfismo A148T no gene CDKN2A em casos de melanoma

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Casos

Justificativa: O melanoma cutâneo é o tipo de câncer da pele que se caracteriza por manchas escuras e irregulares. Diversos fatores colaboram para seu surgimento. O melanoma pode surgir ao acaso ou relacionado a um histórico na família de casos semelhantes. A maioria dos casos é relacionada a exposições solares exageradas que acabam degenerando os melanócitos (células da pele que produzem melanina) em células malignas. A presença de muitos sinais benignos, pele clara, cabelos e olhos claros e história na família de melanoma são alguns dos fatores que sugerem um maior risco de ter câncer de pele. Entretanto, numa parcela destes casos, costuma se encontrar também uma predisposição genética para o desenvolvimento da doença, ou seja, os pacientes apresentam algum tipo de alteração de seus genes que o deixam em maior risco de ter um melanoma. O gene chamado CDKN2A é um destes. É comprovado em diversos estudos em distintas populações que alterações do CDKN2A podem implicar na formação de um melanoma no futuro. Mais de 77 tipos de alteração deste gene já foram descritas. Na nossa população, foi estudada a existência de uma destas alterações (A148T) numa quantidade pequena de pacientes e se viu que ela existia em 13% deles. Enfim, torna-se extremamente importante estudar a existência de alterações de genes na nossa população para poder entender um pouco mais sobre os fatores de risco desta doença no nosso meio e, conseqüentemente, poder oferecer uma prevenção mais efetiva.

Procedimentos: Se você concordar em participar do estudo, após ler cuidadosamente e assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será encaminhado ao Serviço de Dermatologia para realização de exame dermatológico pelo pesquisador principal. Responderá um questionário que conterá perguntas sobre seus hábitos de exposição ao sol, cor da pele, ancestralidade e serão registrados dados sobre seu exame dermatológico e as características da lesão de melanoma. Você será encaminhado ao ambulatório de pesquisa do HCPA para coleta de sangue. Sua amostra de sangue e o bloco de parafina da lesão de pele serão analisados no Centro de Terapia Gênica do HCPA (extração do DNA) e no laboratório de pesquisa do Departamento de Dermatologia da Universidade Ludwig-Maximilians de Munique na Alemanha pelo pesquisador Renato Marchiori Bakos (análise do polimorfismo). Esta avaliação é feita através de um método chamado PCR-RFLP. Nós ainda não sabemos se estes “polimorfismos genéticos” realmente têm alguma importância sobre o risco de melanoma no Rio Grande do Sul, e este estudo está sendo feito justamente para tentar verificar isso. Caso alguma informação derivada deste estudo for importante para você e sua família todo esforço será realizado para informá-los, caso assim o queira. Como ainda não sabemos exatamente o que significa ter cada um destes polimorfismos em termos de risco para melanoma, é importante que você continue realizando todos os seus exames e recomendações de rotina, como evitar queimaduras solares, proteger-se do sol e realizar avaliações médicas e laboratoriais regulares.

Informações adicionais:

- A coleta de sangue do estudo é feita como uma coleta usual. Entretanto, algumas pessoas podem apresentar tonturas e pequeno desconforto no momento da picada da agulha e podem desenvolver pequenos hematomas (manchas roxas na pele) no local da punção.
- Em qualquer das etapas, os pacientes poderão desistir de participar do estudo, sem prejuízo para seu acompanhamento dentro do Serviço de Dermatologia ou outro setor do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- As informações obtidas são de uso exclusivo deste projeto e os resultados serão divulgados em conjunto, sendo preservado o nome dos participantes. Se você autorizar, o seu material genético será armazenado. E, no caso de utilização deste material em estudos futuros, você será contatado para autorizar o seu uso.
- A sua participação não envolve custos para você e também nenhum tipo de remuneração por participar do estudo.

Você está sendo convidado, pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, a participar deste estudo. Instruído de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do

presente Projeto de Pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido, todos acima listados.

1. *Você tem garantia de receber resposta a qualquer pergunta sobre procedimentos, riscos, benefícios ligados à pesquisa e de que será informado quanto a possibilidade de realização de novos exames relacionados ao estudo caso necessários*
2. *A sua participação no estudo não implicará em nenhum tipo de remuneração financeira.*
3. *Sua identidade será preservada e todas as informações serão utilizadas somente para fins de pesquisa.*
4. *Este projeto não prevê prazo exato ou estipulado para fornecer os resultados desta pesquisa, porém serão fornecidos assim que disponível.*
5. *Você poderá optar por não saber o resultado do teste quando este estiver disponível.*
6. *Em caso de impossibilidade de receber o resultado pessoalmente, autorizo meu/minha familiar, Sr./Sra. _____ a recebê-lo.*
7. Autorizo o armazenamento da amostra de meu DNA no Serviço de Genética Médica do HCPA, obtido nesse projeto de pesquisa, para estudos futuros, ciente de que serei contatado para nova autorização deste uso, conforme resolução 347/05.

Eu, _____, li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento e concordo em participar da pesquisa. Eu entendo a informação fornecida por este documento e tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer minhas dúvidas sobre a pesquisa.

Assinatura do paciente: _____

Data: __/__/__

Autorização de responsável (caso paciente tenha idade inferior a 18 anos):

Eu, _____, responsável pelo menor _____ (grau de parentesco : _____), li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento, concordo com o teor do documento e autorizo participação de meu (minha) _____ na pesquisa. Eu entendo a informação fornecida por este documento e tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer minhas dúvidas sobre a pesquisa.

A ser preenchido pelos pesquisadores:

Eu expliquei a _____ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, na minha melhor capacidade.

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: __/__/__

Pesquisadores responsáveis: Renato M. Bakos, Patrícia Prolla, Roberto Giugliani
Contatos: Rua Ramiro Barcellos, 2350 Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Fone/ fax: 21018571

14.3. ANEXO C: Termo de consentimento livre e esclarecido dos controles aplicado no HCPA.

Projeto de pesquisa: Avaliação da presença do polimorfismo A148T no gene CDKN2A em casos de melanoma

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Controles

Justificativa: O melanoma cutâneo é o tipo de câncer da pele que se caracteriza por manchas escuras e irregulares. Diversos fatores colaboram para seu surgimento. O melanoma pode surgir ao acaso ou relacionado a um histórico na família de casos semelhantes. A maioria dos casos é relacionada a exposições solares exageradas que acabam degenerando os melanócitos (células da pele que produzem melanina) em células malignas. A presença de muitos sinais benignos, pele clara, cabelos e olhos claros e história na família de melanoma são alguns dos fatores que sugerem um maior risco de ter câncer de pele. Entretanto, numa parcela destes casos, costuma se encontrar também uma predisposição genética para o desenvolvimento da doença, ou seja, os pacientes apresentam algum tipo de alteração de seus genes que o deixam em maior risco de ter um melanoma. Enfim, torna-se extremamente importante estudar a existência de alterações de genes na nossa população para poder entender um pouco mais sobre os fatores de risco desta doença no nosso meio e, conseqüentemente, poder oferecer uma prevenção mais efetiva. ***Para melhor avaliar este risco, avalia-se a presença desta alteração em pacientes com melanoma e se compara os achados com um grupo de pacientes sem melanoma. Você está sendo convidado a participar do estudo no grupo controle, ou seja, que NÃO tem melanoma.***

Procedimentos: Se você concordar em participar do estudo, após ler cuidadosamente e assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será encaminhado ao Serviço de Dermatologia para realização de exame dermatológico pelo pesquisador principal. Responderá um questionário que conterá perguntas sobre seus hábitos de exposição ao sol, cor da pele, ancestralidade e serão registrados dados sobre seu exame dermatológico. Você será encaminhado ao ambulatório de pesquisa do HCPA para coleta de sangue. Sua amostra de sangue será analisada no Centro de Terapia Gênica do HCPA (extração do DNA) e no laboratório de pesquisa do Departamento de Dermatologia da Universidade Ludwig-Maximilians de Munique na Alemanha pelo pesquisador Renato Marchiori Bakos (análise do polimorfismo). *Esta avaliação é feita através de um método chamado PCR-RFLP.* Você poderá ser informado dos resultados da análise caso assim o queira. Como ainda não sabemos exatamente o que significa ter cada um destes polimorfismos em termos de risco para melanoma, é importante que você continue realizando todas as recomendações de rotina, como evitar queimaduras solares, proteger-se do sol e realizar avaliações médicas regulares.

Informações adicionais:

- A coleta de sangue do estudo é feita como uma coleta usual. Entretanto, algumas pessoas podem apresentar tonturas e pequeno desconforto no momento da picada da agulha e podem desenvolver pequenos hematomas (manchas roxas na pele) no local da punção.
- Em qualquer das etapas, os pacientes poderão desistir de participar do estudo, sem prejuízo para seu acompanhamento dentro do Serviço de Dermatologia ou outro setor do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- As informações obtidas são de uso exclusivo deste projeto e os resultados serão divulgados em conjunto, sendo preservado o nome dos participantes. Se você autorizar, o seu material genético será armazenado. E, no caso de utilização deste material em estudos futuros, você será contatado para autorizar o seu uso.
- A sua participação não envolve custos para você e também nenhum tipo de remuneração por participar do estudo.

Você está sendo convidado, pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, a participar deste estudo. Instruído de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do

presente Projeto de Pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido, todos acima listados.

1. *Você tem garantia de receber resposta a qualquer pergunta sobre procedimentos, riscos, benefícios ligados à pesquisa e de que será informado quanto a possibilidade de realização de novos exames relacionados ao estudo caso necessários*
2. *A sua participação no estudo não implicará em nenhum tipo de remuneração financeira.*
3. *Sua identidade será preservada e todas as informações serão utilizadas somente para fins de pesquisa.*
4. *Este projeto não prevê prazo exato ou estipulado para fornecer os resultados desta pesquisa, porém serão fornecidos assim que disponível.*
5. *Você poderá optar por não saber o resultado do teste quando este estiver disponível.*
6. *Em caso de impossibilidade de receber o resultado pessoalmente, autorizo meu/minha familiar, Sr./Sra. _____ a recebê-lo.*
7. *Autorizo o armazenamento da amostra de meu DNA no Serviço de Genética Médica do HCPA, obtido nesse projeto de pesquisa, para estudos futuros, ciente de que serei contatado para nova autorização deste uso, conforme resolução 347/05.*

Eu, _____, li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento e concordo em participar da pesquisa. Eu entendo a informação fornecida por este documento e tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer minhas dúvidas sobre a pesquisa.

Assinatura do paciente: _____

Data: __/__/__

Autorização de responsável (caso paciente tenha idade inferior a 18 anos):

Eu, _____, responsável pelo menor _____ (grau de parentesco : _____), li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento, concordo com o teor do documento e autorizo participação de meu (minha) _____ na pesquisa. Eu entendo a informação fornecida por este documento e tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer minhas dúvidas sobre a pesquisa.

A ser preenchido pelos pesquisadores:

Eu expliquei a _____ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, na minha melhor capacidade.

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: __/__/__

Pesquisadores responsáveis: Renato M. Bakos, Patrícia Prolla, Roberto Giugliani
Contatos: Rua Ramiro Barcellos, 2350 Serviço de Dermatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Fone/ fax: 21018571

14.4. ANEXO D: Fotografia de eletroforese em gel mostrando diferentes genótipos.

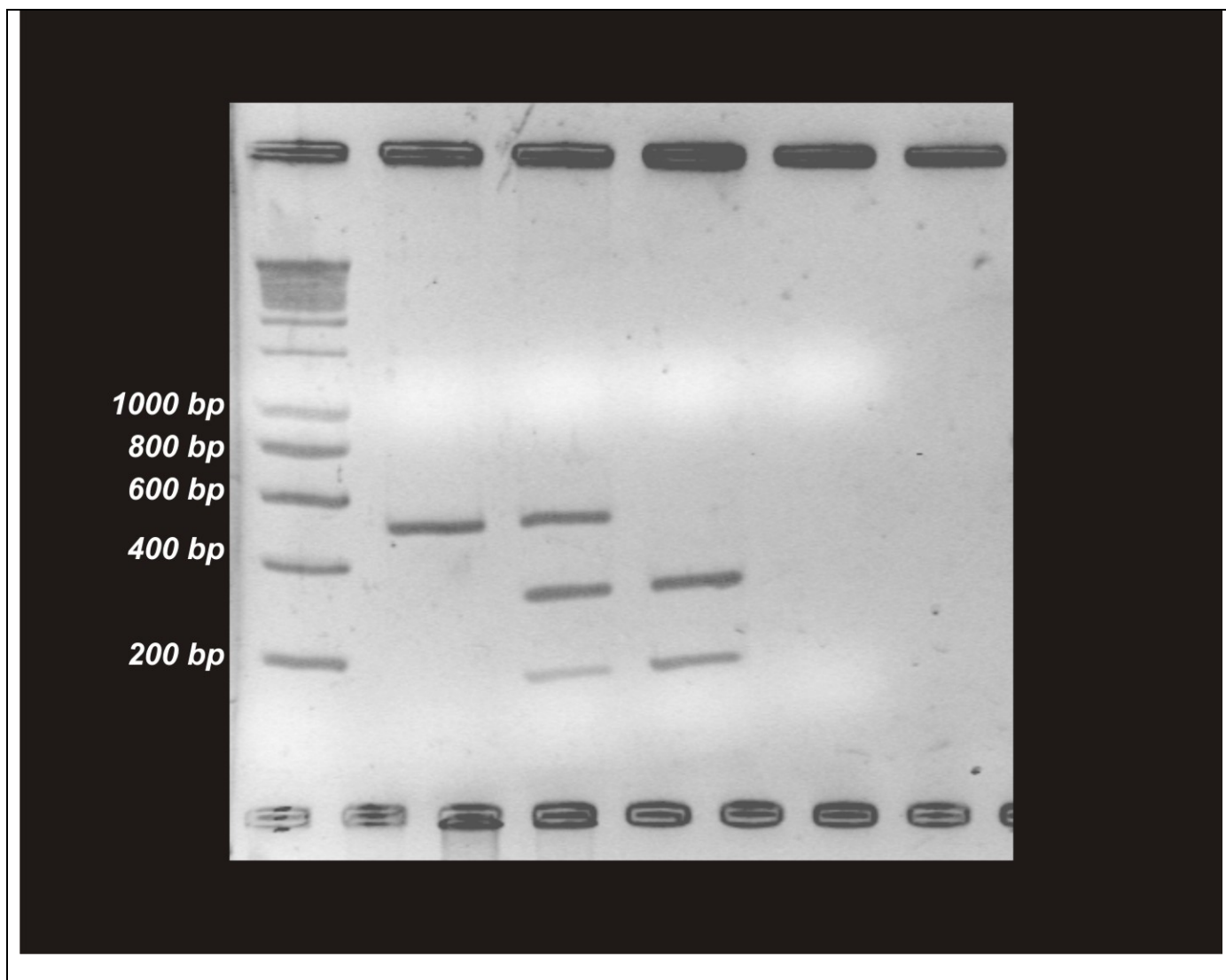


FIGURA D1: fragmentos de DNA após realização de PCR e digestão com enzima de restrição. Da esquerda para direita: marcador de peso molecular, caso polimórfico homocigoto (479bp), caso polimórfico heterocigoto, caso selvagem (322bp e 157bp) e controle negativo.

14.5. ANEXO E: Protocolo de avaliação das lâminas de imunohistoquímica utilizado na Universidade Ludwig-Maximilian de Munique.

so	Prontuário	Idade	Tipo	Nesqt	Nesql	SOX9qt	SOX9ql	SOX10qt	SOX10ql	BRN2qt	BRN2ql	MITFqt	MITFql
1													
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													
9													
10													
11													
12													
13													
14													
15													
16													
17													
18													
19													
20													

Legenda: Tipo- tipo de tumor, Nesqt- expressão quantitativa de nestina, Nesql – expressão qualitativa de nestina, SOX9qt - expressão quantitativa deSOX9, SOX9ql - expressão qualitativa de SOX9, SOX10qt - expressão quantitativa deSOX10, SOX10ql - expressão qualitativa de SOX10, BRN2qt- expressão quantitativa de BRN2, BRN2ql - expressão qualitativa de BRN2, MITFqt - expressão quantitativa de MITF, MITFql - expressão qualitativa de MITF.

14.6. ANEXO F: Fotografias das lâminas de imunohistoquímica com expressão de nestina, SOX9, SOX10, BRN2 e MITF em melanomas.

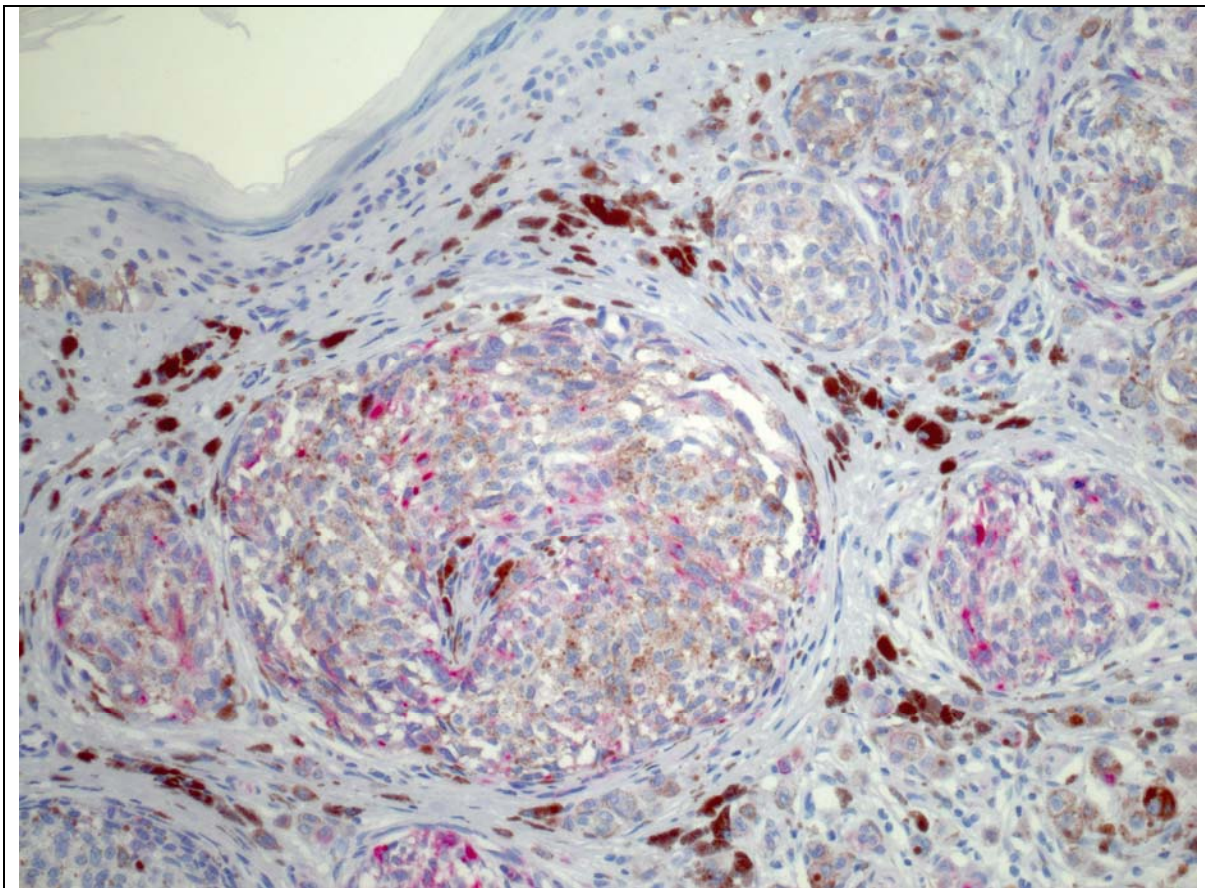


FIGURA F1: Expressão imunoistoquímica da nestina em células tumorais. (no original, x 200, APAAP – *fast red*)

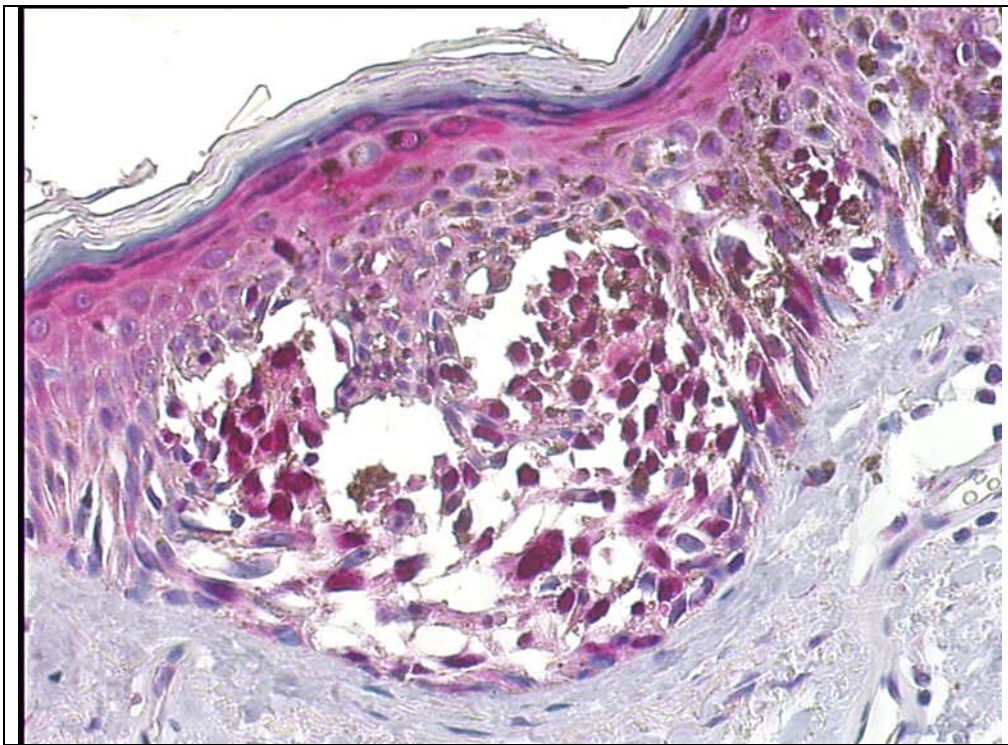


FIGURA F2: Expressão imunoistoquímica de SOX9 em células tumorais demonstrando o padrão predominantemente nuclear. (no original, x 200, APAAP – *fast red*)

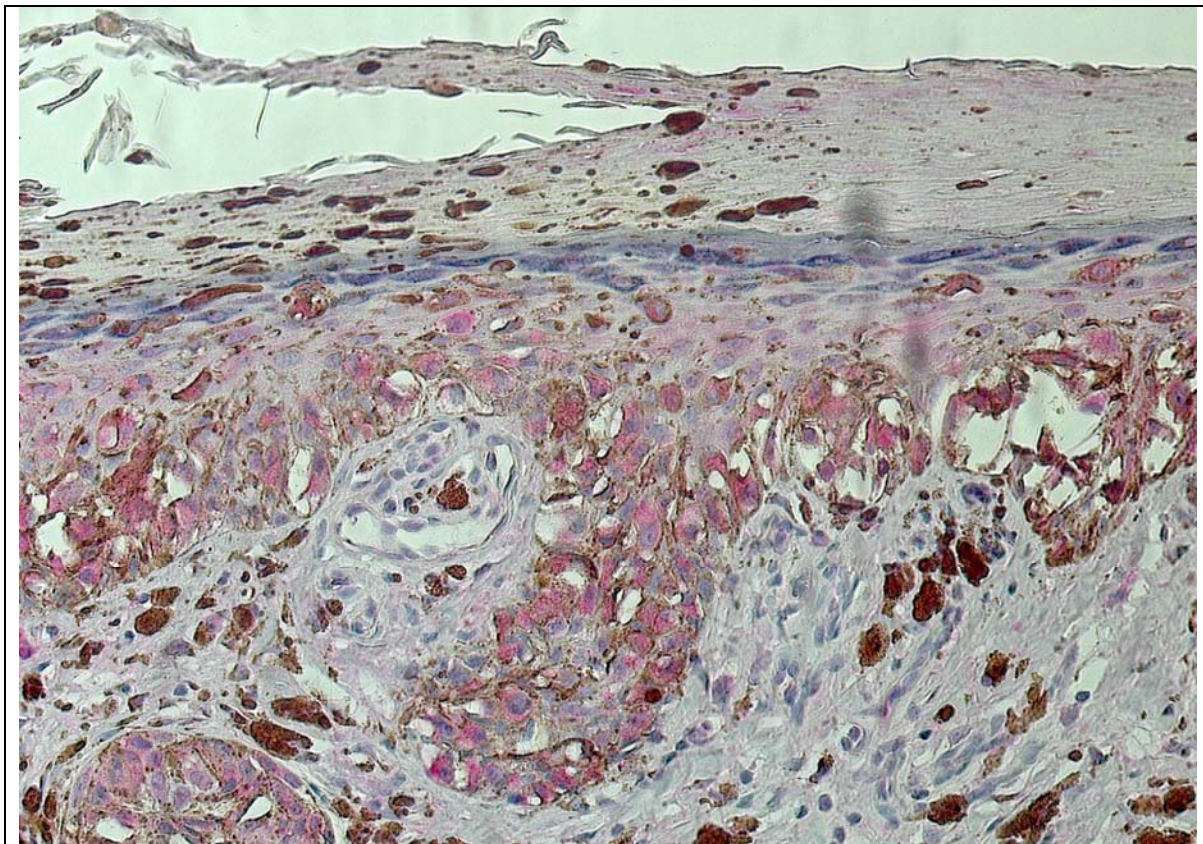


FIGURA F3: Expressão imunoistoquímica de SOX10 em células tumorais em áreas perinucleares e citoplásmicas. (no original, x 200, APAAP – *fast red*)

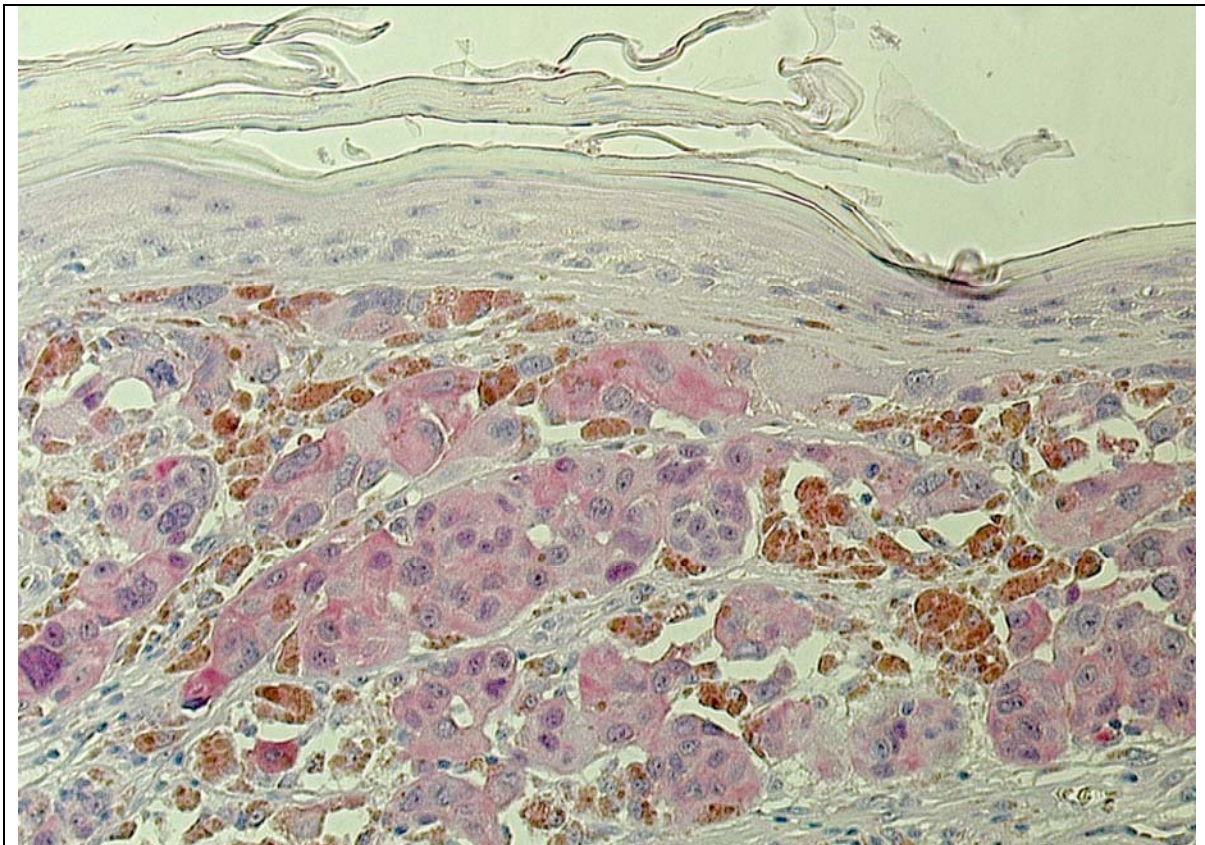


FIGURA F4: Expressão imunoistoquímica de BRN2 em células tumorais em distribuição citoplasmática. (no original, x 200, APAAP – *fast red*)

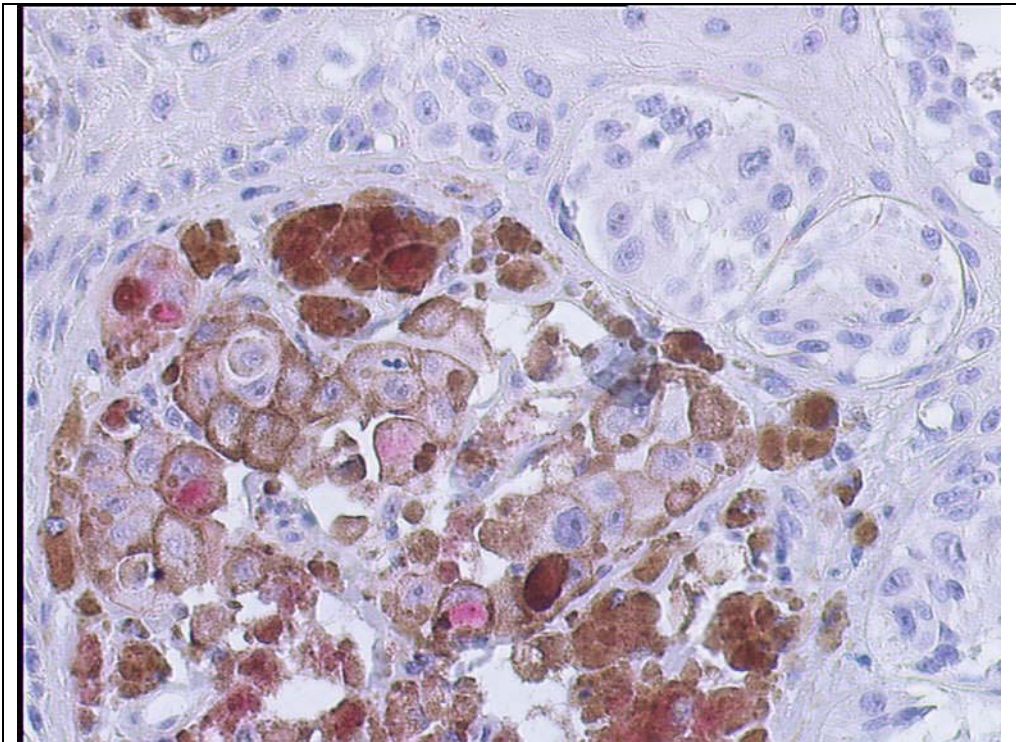


FIGURA F5: Expressão imunoistoquímica de MITF associada a células tumorais pigmentadas. (no original, x 200, APAAP – *fast red*)