

**Ricardo José David
Costa Vieira**

Oncogénese e progressão do melanoma

**Análise mutacional e estudo clínico
retrospectivo**

Coimbra

2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Dissertação apresentada à Universidade de
Coimbra para candidatura ao grau de Doutor em
Ciências da Saúde – Ramo de Medicina,
especialidade de Medicina Interna
(Dermatologia e Venereologia), realizada sob a
orientação científica do Prof. Doutor Américo
Figueiredo e do Prof. Doutor Carlos Faro

Resumo

Fundamentos: As mutações de genes que regulam a proliferação celular e a apoptose através das vias MAPK, PI3K/AKT e p16INK4A são eventos críticos na oncogénese do melanoma. Diversas mutações potencialmente patogénicas têm sido identificadas em estudos de sequenciação genómica de linhas celulares de melanoma.

A biopsia do gânglio sentinela avalia a disseminação linfática do melanoma, sendo preditiva de metastização à distância e de morte relacionada com o tumor. Estando bem estabelecida em doentes de risco intermédio, permanece controversa nos doentes com melanomas espessos (>4,0 mm) devido à alta taxa de invasão linfática e de metastização distante oculta.

A disseminação à distância é a principal causa de morte por melanoma e pode ocorrer por via linfática ou por via hemática.

Objectivos: (i) Determinar a frequência de 29 mutações em amostras de melanoma e de nevos melanocíticos, inferindo acerca da sua relevância patogénica, (ii) avaliar o valor prognóstico do estado do gânglio sentinela nos doentes com melanomas espessos (>4,0 mm), (iii) identificar factores relacionados com a disseminação da doença loco-regional e (iv) identificar factores preditivos da via de disseminação metastática.

Material e métodos: Amostras de tecido fixadas em formol e incluídas em parafina de melanomas primários (n=81) emparelhados com metástases loco-regionais (n=21) e nevos melanocíticos (n=28) foram submetidas a genotipagem de 29 mutações seleccionadas. Após extracção de DNA, cuja concentração e qualidade foi verificada por espectrofotometria e fluorimetria, as amostras foram genotipadas e a relevância patogénica de cada mutação foi avaliada com o auxílio de ferramentas bioinformáticas.

O estudo clínico retrospectivo incluiu 208 doentes com melanoma observados no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra de 2000 a 2007. As variáveis estudadas foram: sexo, idade, grupo etário, localização do melanoma, tipo de melanoma, espessura, ulceração, estado do gânglio sentinela, metastização em trânsito, metastização ganglionar regional, metastização à distância, progressão da doença loco-regional, via metastática, morte por melanoma, tempo de evolução até à metastização distante e tempo até à morte ou à última observação.

Resultados: Identificaram-se 4 mutações: BAI3 D755N (em 1,2% dos doentes com melanoma), DLEC1 D215N (em 3,7% dos doentes com melanoma e em 7,1%

dos nevos melanocíticos), MYO9A G2291V (em 1,2% dos doentes com melanoma) e TP63 M499I (em 1,2% dos doentes com melanoma). Todas as mutações foram observadas no tumor primário, à excepção de TP63 M499I, que só se verificou numa metástase em trânsito. Apenas DLEC1 D215N não foi apontada como deletéria pelas ferramentas bioinformáticas, mas o seu papel patogénico foi considerado possível, já que esta mutação nunca foi descrita na população geral.

O estudo clínico retrospectivo revelou que a espessura foi o factor de prognóstico com maior valor preditivo da metastização em trânsito, da metastização ganglionar, da metastização à distância, da sobrevivência livre de doença e da sobrevivência global. A espessura e o sexo masculino relacionaram-se com uma maior taxa de positividade da biopsia do gânglio sentinela. O estado do gânglio sentinela foi preditivo de metastização em trânsito, de metastização à distância e de morte relacionada com o melanoma, excepto nos doentes com melanomas espessos (>4,0 mm). A sobrevivência livre de doença foi influenciada pelo estado do gânglio sentinela, mas este não teve impacto na sobrevivência global dos doentes com melanomas espessos (>4,0 mm), excepto em relação à sobrevivência a curto prazo (2,5 anos). A progressão da doença loco-regional para metastização distante (61,4% dos casos) não foi influenciada por nenhuma das variáveis estudadas. A doença metastática à distância ocorreu em 31,7% dos doentes. As metástases ganglionares foram o foco metastático inaugural em 53% dos casos, as metástases em trânsito em 30,3% e as metástases distantes em 16,7%. A sobrevivência livre de doença, a sobrevivência livre de metástases distantes e a sobrevivência global foram semelhantes nas várias vias metastáticas.

Conclusões: As mutações BAI3 D755N, DLEC1 D215N, MYO9A G2291V e TP63 M499I ocorreram numa frequência reduzida nos melanomas. DLEC1 D215N foi igualmente observada em nevos melanocíticos. TP63 M499I apenas foi identificada numa metástase. O papel destes genes na oncogénese do melanoma e na nevogénese requer esclarecimento futuro.

Nos doentes com melanomas espessos o prognóstico parece ser mais influenciado pela disseminação hemática à distância do que pelo estado do gânglio sentinela, embora este manifeste valor preditivo da sobrevivência livre de doença e da sobrevivência a curto prazo (2,5 anos).

Não se identificaram factores clínicos relacionados com a progressão para metastização à distância em doentes com metastização loco-regional nem factores preditivos da via de disseminação do melanoma.

Abstract

Background: Genetic mutations in regulators of cell proliferation and apoptosis through MAPK, PI3K/AKT and p16INK4A pathways are critical events in melanoma oncogenesis. Several potentially pathogenic mutations have been identified in whole genome sequencing of melanoma cell lines.

Sentinel lymph node biopsy assess the lymphatic spread of melanoma, predicting the risk of distant metastases and melanoma-related death. Despite being well-established for intermediate risk tumors, it is still controversial in thick melanoma (>4.0 mm) due to the high rate of lymphatic spread and occult distant metastases.

Metastatic disease is the main cause of melanoma-related death. The migration of tumor cells to distant sites can occur either by lymphatic invasion either by hematic dissemination.

Objectives: (i) Determine the frequency of 29 mutations in melanoma and melanocytic nevi samples, assessing their relevance in nevogenesis and melanoma pathogenesis, (ii) assess the prognostic value of sentinel lymph node status in patients with thick tumors (>4.0 mm), (iii) identify factors related with the progression of locoregional disease and (iv) identify factors underlying the metastatic route of melanoma.

Material and methods: Formalin fixed paraffin embedded tissue samples of primary melanomas (n=81) paired with locoregional metastases (n=21) and melanocytic nevi (n=28) were genotyped for 29 selected mutations. After DNA isolation and spectrophotometric and fluorimetric control of DNA concentration and quality, the samples were genotyped and the pathogenic relevance of each mutation was assessed by bioinformatic tools.

The retrospective clinical study was conducted on a sample of 208 melanoma patients observed in the Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra between 2000 and 2007. The variables analyzed were: sex, age, age group, site of melanoma, type of melanoma, thickness, ulceration, sentinel node status, in-transit metastases, regional nodal metastases, distant metastases, progression of locoregional disease, metastatic route, melanoma-related death, time until distant metastases and time to death or time to last observation.

Results: Mutational analysis identified 4 mutations: BAI3 D755N (1.2% of melanoma patients), DLEC1 D215N (3.7% of melanoma patients and 7.1% of

melanocytic nevi), MYO9A G2291V (1.2% of melanoma patients) and TP63 M499I (1.2% of melanoma patients). All these mutations were observed in the primary tumor, except TP63 M499I mutation which occurred only in a sample of in-transit metastasis. Only DLEC1 D215N were not pointed as deleterious by bioinformatic tools, but was also likely to be pathogenic, considering that it had never been described in general population.

The retrospective clinical study revealed that thickness was the most important predictive factor of in-transit metastases, disease-free survival and overall survival. The rate of positivity of sentinel lymph node biopsy was significantly higher in patients with thick melanomas and in males. The sentinel lymph node status showed prognostic influence on the occurrence of in-transit metastases, distant metastases and melanoma-related death, except in patients with thick melanoma (>4.0 mm). Disease-free survival was determined by sentinel lymph node status but its impact in overall survival was not observed in patients with thick melanoma (>4.0 mm), excepting in short-term survival (2.5 years). The progression of locoregional disease up to distant metastases (61.4% of cases) was not influenced by any of the variables studied. Distant metastatic disease affected 31.7% of patients. Nodal metastases were the first to arise in 53% of cases, followed by in-transit metastases in 30.3% and distant metastases in 16.7%. Disease-free survival, distant metastases-free survival and overall survival were identical regardless the metastatic route.

Conclusion: BAI3 D755N, DLEC1 D215N, MYO9A G2291V and TP63 M499I mutations occurred with a low frequency in melanoma samples. DLEC1 D215N was also observed in melanocytic nevi. TP63 M499I was found in one metastasis but not in the primary tumor. The role of these genes in melanoma oncogenesis and nevogenesis needs to be clarified.

In patients with thick melanoma the prognosis seems to be mostly determined by distant hematic spread with little influence of the sentinel lymph node status, but sentinel lymph node invasion retained the ability to predict a worst disease-free survival and a poorest short-term overall survival (2,5 years).

We identified no factors related with the progression to distant metastases in patients with locoregional involvement neither factors related with the metastatic route followed by the tumour.

agradecimentos

Agradeço aos orientadores, Prof. Doutor Américo Figueiredo e Prof. Doutor Carlos Faro pelas sugestões críticas que possibilitaram e enriqueceram este trabalho desde a concepção do projecto de investigação até à sua conclusão.

À técnica de Anatomia Patológica do Laboratório de Dermatopatologia do Serviço de Dermatologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Sra. D. Luísa Luzia, estou grato pelo esmero e dedicação na preparação das amostras de tecido para a genotipagem.

À Dra. Maria José Simões, do Biocant – Centro de Inovação em Biotecnologia, minha interlocutora durante a análise mutacional, assim como a toda a equipa da Unidade de Serviços Avançados, agradeço o seu inestimável contributo para o sucesso da mesma.

À Dra. Margarida Marques, do Laboratório de Bioestatística e Informática Médica da Faculdade de Medicina, o meu obrigado pelo auxílio na realização da análise estatística.

Um agradecimento especial à Sociedade Portuguesa de Dermatologia e Venereologia, pela atribuição da Bolsa de Investigação Juvenil Esteves (2008), atribuída a este projecto por concurso e sem a qual a realização do mesmo se teria revelado extremamente difícil.

Ao Prof. Doutor Óscar Tellechea, pela sua disponibilidade e sugestões críticas em áreas centrais do trabalho, assim como a todos os que contribuíram de alguma forma para o resultado final do mesmo, expresso a minha mais profunda gratidão.

Índice

Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	xi
Lista de Símbolos e Abreviaturas	xv
Lista de Publicações	xxvii
1. Introdução	1
1.1. Enquadramento geral	1
1.2. Relevância e actualidade do tema	2
1.3. Objectivos	5
1.4. Organização da dissertação	6
2. Revisão da Literatura	7
2.1. Genética do melanoma	7
2.1.1. Perspectiva geral	7
2.1.2. Ciclo celular	9
2.1.3. Via da p16INK4A	11
2.1.4. Via da proteína Ras	12
2.1.5. Via das cinases MAPK	14
2.1.6. Via da PI3K/AKT	17
2.1.7. Via da proteína c-Kit	19
2.1.8. Regulação da melaninogénese	19

2.1.9. Mecanismos de reparação do DNA	22
2.1.10. Apoptose	25
2.1.11. Outros genes	33
2.2. Progressão do melanoma	36
2.2.1. Modelos teóricos de progressão das proliferações melanocíticas	36
2.2.2. Modelos teóricos de disseminação do melanoma	39
2.2.3. Avaliação do risco de disseminação tumoral pela biopsia do gânglio sentinela	42
2.2.4. Eventos precoces na oncogénese	43
2.2.5. Crescimento radial, crescimento vertical e metastização	44
2.2.6. Factores de transcrição	45
2.2.7. Receptores acoplados a proteína G	48
2.2.8. Moléculas de adesão celular	49
2.2.9. Metaloproteinases	55
2.2.10. Angiogénese	57
2.2.11. Células estaminais tumorais	59
2.2.12. Resposta imunitária	60
2.3. Factores clínico-patológicos de risco no melanoma	64
3. Material e Métodos	67
3.1. Introdução	67
3.2. Selecção de amostras	68
3.2.1. Grupo A	68
3.2.2. Grupo B	69

3.3.	Estudo genético	69
3.3.1.	Estratégia global	69
3.3.2.	Seleccção de mutações a testar	70
3.3.3.	Colheita das amostras de tecido	71
3.3.4.	Isolamento do DNA	72
3.3.5.	Preparação e controlo de qualidade das amostras de DNA	74
3.3.6.	Genotipagem	77
3.4.	Estudo clínico retrospectivo	82
3.5.	Tratamento estatístico dos dados	83
4.	Resultados	85
4.1.	Estudo genético	85
4.1.1.	Composição da amostra (grupo A)	85
4.1.2.	Composição da amostra (grupo B)	86
4.1.3.	Caracterização dos grupos amostrais	87
4.1.4.	Amostras de tecido seleccionadas para genotipagem	89
4.1.5.	Genotipagem	91
4.2.	Estudo clínico retrospectivo	95
4.2.1.	Distribuição das variáveis clínico-patológicas	95
4.2.2.	Biopsia selectiva do gânglio sentinela	118
4.2.3.	Progressão da doença metastática loco-regional	126
4.2.4.	Vias metastáticas	129
5.	Discussão	135

5.1. Aspectos metodológicos	135
5.1.1. Selecção da amostra	135
5.1.2. Mutações seleccionadas	136
5.1.3. Isolamento do DNA	137
5.1.4. Genotipagem	138
5.1. Análise mutacional	139
5.2.1. Considerações gerais	139
5.2.2. Mutação BAI3 D755N	139
5.2.3. Mutação DLEC1 D215N	141
5.2.4. Mutação MYO9A G2291V	142
5.2.5. Mutação TP63 M499I	143
5.2.6. Outras mutações	144
5.3. Estudo clínico retrospectivo	144
5.3.1. Caracterização das variáveis clínico-patológicas	144
5.3.2. Biopsia selectiva do gânglio sentinela	150
5.3.3. Progressão da doença loco-regional	151
5.3.4. Vias metastáticas	153
6. Conclusões	155
6.1. Conclusões gerais	155
6.1.1. Análise mutacional	155
6.1.2. Estudo clínico retrospectivo	156
6.2. Aplicações e contribuições do trabalho realizado	159
6.3. Recomendações para investigações futuras	160

7. Referências	163
Anexo A	A1
Anexo B	B1

Lista de Figuras

1. Ciclo celular	10
2. Via da p16INK4A	12
3. Activação da proteína Ras	13
4. Vias das cinases MAPK	15
5. Via da PI3K/AKT	18
6. Via de Raper-Mason	20
7. Apoptose	27
8. Vias metastáticas no melanoma	40
9. Estratégia global do estudo	68
10. Estratégia da análise mutacional	70
11. Hibridização das sondas durante a genotipagem	78
12. Carregamento das amostras na placa de genotipagem	79
13. Resultado de um ensaio de genotipagem	81
14. Grupo A (melanoma): selecção da amostra para os estudos genético e clínico retrospectivo	86
15. Grupo B (nevus melanocíticos): selecção da amostra para estudo genético ..	87
16. Distribuição relativa das amostras de tecido por cada grupo	89
17. Amostras provenientes dos doentes do grupo A	91
18. Idade em função do sexo.	98
19. Espessura do tumor primário em função do sexo	99
20. Idade em função da localização do melanoma	102
21. Idade em função do tipo de melanoma	103

22. Espessura do tumor primário em função do grupo etário	104
23. Espessura do tumor primário em função da localização	105
24. Espessura do tumor primário em função do tipo de melanoma	106
25. Espessura do tumor primário em função da ulceração	107
26. Sobrevivência global	113
27. Sobrevivência em função do sexo	113
28. Sobrevivência em função do grupo etário	114
29. Sobrevivência em função da categoria T do melanoma	114
30. Sobrevivência em função da ulceração do melanoma	115
31. Sobrevivência em função da localização do melanoma.	115
32. Sobrevivência em função do tipo de melanoma.	116
33. Sobrevivência em função da presença de metástases em trânsito.	117
34. Sobrevivência em função da presença de metástases ganglionares regionais. .	117
35. Sobrevivência em função da presença de metástases distantes.	118
36. Idade em função do estado do gânglio sentinela	119
37. Espessura do melanoma em função do estado do gânglio sentinela.	120
38. Sobrevivência livre de doença em função do estado do gânglio sentinela . . .	122
39. Sobrevivência em função do estado do gânglio sentinela.	123
40. Sobrevivência livre de doença em função do estado do gânglio sentinela no subgrupo de melanomas espessos (>4,0 mm)	124
41. Sobrevivência global em função do estado do gânglio sentinela no subgrupo de melanomas espessos (>4,0 mm).	125
42. Sobrevivência livre de doença nos casos com doença loco-regional em função da progressão para metastização distante	128
43. Sobrevivência global nos casos com doença loco-regional em função da progressão para metastização distante	128
44. Distribuição dos casos em função da via metastática	129
45. Sobrevivência livre de doença em função da via metastática.	131

46. Sobrevivência livre de metástases distantes em função da via metastática . .	131
47. Sobrevivência global em função da via metastática	133
48. Sobrevivência a partir do diagnóstico de metastização distante em função da via metastática	133
49. Reacção em cadeia da polimerase com sondas competitivas e específicas de alelo	161

Lista de Tabelas

1. Vias moleculares mais importantes na oncogénese do melanoma.	9
2. Polimorfismos do gene MC1R associados a risco aumentado de melanoma .	22
3. Substituições nucleotídicas seleccionadas para estudo	71
4. Protocolo do processo de extracção de DNA	73
5. Protocolo da quantificação fluorimétrica do DNA	76
6. Protocolo para obtenção da curva-padrão de alta gama da concentração de DNA	77
7. Protocolo para obtenção da curva-padrão de baixa gama da concentração de DNA	78
8. Protocolo da reacção em cadeia da polimerase	80
9. Distribuição dos grupos amostrais em função do sexo e da idade	87
10. Localização e tipo dos melanomas submetidos a estudo genético	88
11. Localização e tipo dos nevos melanocíticos submetidos a estudo genético . .	88
12. Amostras excluídas por extracção de DNA em quantidade e/ou qualidade insuficientes e por genotipagem insatisfatória	90
13. Resultado gerais da genotipagem	91
14. Mutações encontradas nas amostras de melanoma (grupo A) e de nevos melanocíticos (grupo B)	92
15. Frequência alélica das mutações nas amostras de melanoma e nos nevos melanocíticos. Potencial patogénico previsto pelas ferramentas bioinformáticas	94
16. Mutações observadas e respectivos génotipos	94
17. Frequência das mutações BAI3 D755N, DLEC1 D215N, MYO9A G2291V e TP63 M499I nos doentes com melanoma (grupo A) e nos doentes com nevos melanocíticos (grupo B).	95

18. Distribuição em função do sexo e da idade	95
19. Distribuição por grupo etário	96
20. Localização do melanoma	96
21. Distribuição em função do tipo de melanoma	96
22. Distribuição em função da categoria T da classificação TNM (AJCC 2009) . .	96
23. Ulceração do tumor primário	97
24. Metastização em trânsito, metastização ganglionar regional, metastização à distância e morte por melanoma	97
25. Distribuição por grupo etário em função do sexo	98
26. Localização do melanoma em função do sexo	98
27. Tipo de melanoma em função do sexo	99
28. Espessura do tumor primário em função do sexo	100
29. Distribuição dos melanoma por categoria T da classificação TNM (AJCC 2009) em função do sexo	100
30. Ulceração do tumor primário em função do sexo	100
31. Idade em função da localização e do tipo de melanoma	101
32. Localização do melanoma por grupo etário	102
33. Tipo de melanoma por grupo etário	103
34. Espessura do tumor primário por grupo etário	104
35. Categoria T da classificação TNM (AJCC 200) por grupo etário	104
36. Ulceração do tumor primário por grupo etário	106
37. Ulceração do tumor primário em função da localização	106
38. Ulceração do tumor primário em função do tipo de melanoma	107
39. Ulceração do tumor primário em função da categoria T da classificação TNM (AJCC 2009)	108
40. Tipo de melanoma em função da localização	108
41. Metástases em trânsito em função do sexo, idade, espessura, ulceração, localização e tipo de melanoma	109

42. Metástases ganglionares regionais em função do sexo, idade, espessura, ulceração, localização e tipo de melanoma	110
43. Metástases distantes em função do sexo, idade, espessura, ulceração, localização e tipo de melanoma	111
44. Morte por melanoma em função do sexo, idade, espessura, ulceração, localização e tipo de melanoma	112
45. Risco de morte por melanoma em função da presença de metástases em trânsito, ganglionares regionais e à distância	112
46. Regressão de Cox das variáveis que influenciaram a sobrevivência	117
47. Estado do gânglio sentinela em função do sexo	119
48. Estado do gânglio sentinela em função da categoria T da classificação TNM (AJCC 2009)	120
49. Estado do gânglio sentinela em função da ulceração do melanoma	120
50. Estado do gânglio sentinela em função da localização do melanoma	121
51. Estado do gânglio sentinela em função do tipo de melanoma	121
52. Risco de metastização em trânsito, metastização à distância e morte por melanoma em função do estado do gânglio sentinela	122
53. Estado do gânglio sentinela em função da espessura do melanoma (inferior ou igual a 4 mm <i>versus</i> superior a 4 mm)	124
54. Risco de metastização em trânsito, metastização à distância e morte por melanoma em função do resultado da biopsia do gânglio sentinela em doentes com melanoma espesso (>4 mm)	124
55. Progressão da doença loco-regional para doença à distância em função do sexo, idade, espessura, ulceração, tipo, localização do melanoma e morte por melanoma	127
56. Vias metastáticas do melanoma	130
57. Sobrevivência livre de metástases distantes	132

Lista de Símbolos e Abreviaturas¹

A	Adenina
ABC	ATPases do tipo ABC (<i>ATP binding cassette</i>)
AD	Domínio de activação
ADULT	Síndrome acro-dermato-ungueal-lacrima-dentária
AFX	Factor de transcrição AFX
AIF	<i>Apoptosis inducing factor</i>
AIM1	Antígeno do melanoma AM1 (o mesmo que MATP ou SL45A2)
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKT/Akt	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog/protein kinase B</i>
ALCAM	<i>Activated leukocyte cell adhesion molecule</i>
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AP	<i>Activator protein</i>
APAF	<i>Apoptotic protease activating factor</i>
APE	Endonuclease apurínica/apirimidínica
ARAF/A-Raf	<i>V-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog/cinase A-Raf</i>
ASIP	<i>Agouti signalling peptide</i>

¹Considerando o uso disseminado e tendencialmente consensual de determinados acrónimos em língua inglesa nos textos científicos em língua portuguesa, optou-se pela discriminação do significado desses acrónimos no seu idioma original.

ASPP	<i>Inhibitor of apoptosis-stimulating protein for p53</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
BAD	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
BAI-3	<i>Brain-specific angiogenesis inhibitor</i>
BAK/Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
BAP	Hidrolase carboxi-terminal da ubiquitina (<i>BRC A1-associated protein</i>)
BCL-2/Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-Xs	<i>Bcl-2-like protein 1</i>
BER	<i>Base excision repair</i>
BID/Bid	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
BIK/Bik	<i>Bcl-2-interacting killer</i>
BIM/Bim	<i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>
BMF/Bmf	<i>Bcl-2-modifying factor</i>
BOD/Bod	<i>Bcl-2-related ovarian death</i>
BOK/Bok	<i>Bcl-2-related ovarian killer</i>
BRAF/B-Raf	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i> /cinase B-Raf
BRIM-3	Ensaio clínico comparativo entre vemurafenib e dacarbazina no melanoma
BTG	<i>NGF-inducible anti-proliferative protein PC3</i>
C	Citosina
CAD	Gene das enzimas carbamoil-fosfato sintetase 2, aspartate transcarbamilase e di-hidro-orotase
cAMP	AMP cíclico

CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CCL	<i>Chemokine ligand</i>
CCND1	Gene da ciclina D1
CCR	<i>Chemokine receptor</i>
CD	<i>Cluster differentiation</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CDKN	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
cDNA	DNA complementar
CHUC	Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
cIAP	<i>Cellular inhibitor of apoptosis</i>
CKIT/c-Kit	<i>V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i> /cinase c-Kit
CMH	Complexo <i>major</i> de histocompatibilidade
COX	Cicloxygenase
CpG	Citosina-fosfato-guanina
CRAF	<i>V-Raf-1 murine leukemia oncogene homolog</i> /cinase c-Raf
CRE	<i>cAMP responsive element</i>
CREB	<i>cAMP responsive element binding</i>
CREM	<i>cAMP responsive element modulator</i>
CSA/CSB	<i>Cockayne syndrome A/B</i>
CTD	<i>Carboxi-terminal domain</i>
CTLA	Cytotoxic T cell antigen
CXCL	<i>C-X-C motif chemokine</i>

DAMPs	<i>Damage-associated molecular pattern molecules</i>
DBD	<i>DNA-binding domain</i>
DDB	<i>DNA damage-binding protein</i>
DLEC	<i>Deleted in lung and esophageal cancer</i>
DMRT	<i>Doublesex and mab-3 related transcription factor</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	DNA de cadeia dupla (<i>double strain DNA</i>)
EEC	Displasia ectodérmica-ectrodactilia
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EMMPRIN	<i>Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147)</i>
Eph	Receptores de efrina
ERBB4	<i>V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)</i>
ERCC	<i>Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
ESL	<i>E-selectin ligand</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FAM-M	Síndrome dos nevos atípicos múltiplos-melanoma familiar
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEN-1	<i>Flap structure-specific endonuclease</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FRET	<i>Förster resonance energy transfer</i>
G	Guanina
GAGE	<i>G antigen gene</i>

GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDP	Difosfato de guanosina
GEF	<i>Guanine-nucleotide exchange factor</i>
GEMA	<i>Gene expression microarrays</i>
GlyCAM	<i>Glycosylation-dependent cell adhesion molecule</i>
GNAQ/GNA11	<i>Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha 11</i>
GRIN	<i>Glutamate receptor ionotropic N-methyl D-aspartate</i>
GRB	<i>Growth factor receptor-bound protein</i>
GSK	<i>Glycogen synthase kinase</i>
GTBP	<i>G/T binding protein</i>
GTP	Trifosfato de guanosina
GZMK	<i>Granzime K</i>
HDM	<i>Mouse double minute homolog</i>
HER	<i>Human epidermal growth factor receptor</i>
hMSH	<i>Human mutS homolog</i>
HRAS	<i>V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
HR23B	<i>Human RAD23 homolog B</i>
HRK	Proteína activadora da apoptose <i>Harakiri</i>
I_0	Luz incidente
I_1	Luz transmitida
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis</i>
IASPP	<i>Inhibitor of apoptosis-stimulating protein for p53</i>

IC	Intervalo de confiança
ICAD	<i>Inbibitor of caspase activated Dnase</i>
ICAM	<i>Intercelular adhesion molecule</i>
ICOS	<i>Inducible T-cell co-stimulator</i>
ICD.9	9ª revisão da <i>International Classification of Diseases</i>
IFN	Interferão
Ig	Imunoglobulina
IGF-R	<i>Insulin-like growth factor receptor</i>
iGluRs	Receptores do glutamato inotrópicos
IKK	<i>IxB kinase</i>
IL	Interleucina
KRAS	<i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
L1CAM	<i>L1 cell adhesion molecule</i>
LCK	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
LDH	Desidrogenase láctica
LFA	<i>Lymphocyte function-associated antigen</i>
MAC	<i>Macrophage antigen</i>
MAdCAM	<i>Mucosal addressin cell adhesion molecule</i>
MAGE	<i>Melanoma antigen gene</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKK	<i>MAPK kinase</i>
MAPKKK	<i>MAPKK kinase</i>
MART	<i>Melanoma antigen recognized by T-cells</i>

MATP	<i>Membrane-associated transporter protein</i>
MCAM/MUC18	<i>Melanoma cell adhesion molecule</i>
Mcl	<i>Myeloid cell leukemia</i>
MC1R	<i>Melanocortin receptor 1</i>
MDM	<i>Mouse double minute homolog</i>
MdmX	<i>Mdm4 p53 binding protein homolog</i> (o mesmo que MDM4 ou MRP1)
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MELOE-1	<i>Melanoma-overexpressed antigen</i>
MGB	<i>Minor groove binder</i>
MITF	<i>Microphthalmia transforming factor</i>
ML-IAP	<i>Melanoma inhibitor of apoptosis protein,</i>
MMAC	<i>Mutated in multiple advanced cancers</i>
MMP	<i>Metaloproteinases da matriz</i>
MMR	<i>Mismatch Repair</i>
mRNA	<i>RNA mensageiro</i>
MSH	<i>Melanocyte stimulating hormone</i>
MSLT	<i>Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MUM1	<i>Mutated melanoma associated antigen</i>
MutS	<i>Mutator S</i>
MutL	<i>Mutator L</i>
MYO9A	<i>Gene da miosina IXA</i>

NAIP	<i>Neuronal apoptosis inhibitory protein</i>
NCAM	<i>Neural cell adhesion molecule</i>
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>
NFκB	<i>Nuclear factor κB</i>
Nix	<i>BCL-2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like</i>
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NKG2D	<i>Natural Killer group 2D</i>
NKT	Células T <i>Natural Killer</i>
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartico
Noxa	<i>NADPH oxidase activator</i>
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>
NRG	<i>Neuregulin</i>
NRSF	<i>Neuron-restrictive silencer factor</i>
NUSAP1	<i>Nucleolar and spindle associated protein 1</i>
NY-ESO	<i>New York-esophageal squamous cell carcinoma</i>
OCA	<i>Oculocutaneous albinismo</i>
Omi/HtrA2	Serina protease mitocondrial HtrA2
OPN	Osteopontina
OR	<i>Odds ratio</i>
p	Valor p de significância estatística
PAF	<i>Platelet activating factor</i>
PAFR	<i>Platelet activating factor receptor</i>

PAR	<i>Protease-activated receptor</i>
p14ARF	<i>p14 alternate reading frame</i>
Pax	<i>Paired box</i>
p21Cip1	<i>p21 cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Reacção em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD	<i>Programmed cell death</i>
PDE4D	<i>cAMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 4D</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDK1	<i>Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1</i>
PD-L	<i>Programmed cell death ligand</i>
PECAM	<i>Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PIG	<i>p53 inducible protein</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide-3 kinase</i>
p16INK4A	<i>p16 cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PIP-3,4-P2	Fosfatidilinositol-3,4-bifosfato
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PKCB	<i>Protein kinase C binding</i>
p27Kip1	<i>p27 cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
PPP6C	<i>Protein phosphatase 6, catalytic subunit</i>

PREX2	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 2</i>
PSGL	<i>P-selectin glycoprotein ligand</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin</i>
Rb	<i>Retinoblastoma</i>
Rho	<i>Família de cinases Rho</i>
RIP	<i>Receptor-interacting serine-threonine</i>
RNA	<i>Ácido ribonucleico</i>
RPA	<i>Replication protein A</i>
SAM	<i>Sterile alpha motif</i>
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SHP	<i>Small heterodimer partner</i>
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SLC	<i>Solute carrier family</i>
SLe	<i>Sialil Lewis</i>
Smac/DIABLO	<i>Second mitochondria activator of caspases</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SOS	<i>Son of sevenless homolog</i>
Sox	<i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i>
SPC	<i>Spindle pole body component homolog</i>
SPP	<i>Secreted phosphoprotein</i>

Src	<i>Família de cinases Src</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>
T	<i>Timina</i>
TAD	<i>Trans-activating domain</i>
TAN	<i>Tumor infiltrating neutrophils</i>
TARP	<i>TCR gamma alternate reading frame protein</i>
Tcf	<i>Transcription factor</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TIL	<i>Tumor infiltrating lymphocytes</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNF-R	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
TP63	<i>Tumor protein 63</i>
TP73	<i>Tumor protein 73</i>
TRADD	<i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAIL-R	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor</i>
TRAT	<i>T cell receptor associated transmembrane adaptor</i>
TRP	<i>Tyrosinase related protein</i>

TRRAP	<i>T cell receptor associated transmembrane adaptor 1</i>
TFIIH	<i>Transcription factor II H</i>
TYR	Gene da tirosinase
Tyrp	<i>Tyrosinase-related protein</i>
UV	Ultravioleta
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VDR	<i>Vitamin D receptor</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
VLA	<i>Very late antigen</i>
Wnt	Via de sinalização Wnt
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis</i>
XPA	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group A</i>
XPB	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group B</i>
XPC	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group C</i>
XPD	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group D</i>
XPE	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group E</i>
XPF	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group F</i>
XPG	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group G</i>
XRCC1	<i>X-ray repair cross-complementing protein 1</i>
ZAP70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>

Lista de Publicações

1. Vieira R, Simões MJ, Carmona S, Egas C, Faro C, Figueiredo A. Identification of DLEC1 D215N somatic mutation in formalin fixed, paraffin embedded melanoma and melanocytic nevi specimens. *Journal of Skin Cancer* (submetido para publicação).
2. Vieira R, Figueiredo A. Impact of sentinel lymph node status on disease-free survival and overall survival in thick (>4,0 mm) melanoma: a retrospective single center study. *An Bras Dermatol* (submetido para publicação).

Capítulo I

Introdução

1.1. Enquadramento geral

O melanoma cutâneo é uma neoplasia maligna que deriva dos melanócitos^[1], células que se encontram maioritariamente distribuídas ao longo da camada basal da epiderme e nos folículos pilosos. Cada melanócito, segundo o modelo de Fitzpatrick e Breathnach (1963)^[2], integra a unidade melano-epidérmica com cerca de 36 queratinócitos circundantes, aos quais transfere melanossomas contendo melanina, aspecto relevante na pigmentação cutânea constitucional e na pigmentação induzida pela radiação ultravioleta.

Os melanócitos derivam de células pluripotenciais da crista neural que migram em sentido dorso-lateral ao longo das camadas mesodérmica e ectodérmica do embrião e podem encontrar-se na epiderme, na derme, na túnica vascular do olho (úvea), no ouvido interno, nas leptomeninges, na mucosa oral e genital, no tubo digestivo e, pontualmente, no tecido conjuntivo de diversos órgãos^[3,4]. Apesar desta ampla distribuição, a população melanocítica epidérmica é a mais numerosa, podendo contar-se nesta localização cerca de 500 a mais de 1200 melanócitos por cm², variável segundo a área do tegumento, mas constante nos diversos fotótipos e etnias^[3].

Apesar da origem da maioria dos melanócitos remontar à crista neural embrionária, permanece um potencial de renovação melanocítica a partir de uma população de células epidérmicas pluripotenciais residentes na região da protuberância folicular (células melanocíticas estaminais), que retêm a capacidade de se diferenciar em melanócitos^[5]. A

possibilidade do melanoma surgir por transformação destas células permanece em discussão^[6], conforme se desenvolverá adiante.

O melanoma cutâneo é amplamente o mais comum, correspondendo a mais de 90% dos casos^[7]. Os melanomas extra-cutâneos, que no seu conjunto correspondem a 8,3% dos casos, são maioritariamente representados pelo melanoma ocular (6,2%). A variante conjuntival deste último é muito semelhante do ponto de vista genético ao melanoma cutâneo primário (mutações de BRAF bastante comuns). Em contraste, a raridade da mutação de BRAF e a elevada frequência de mutações de GNAQ/GNA11 distinguem a variante uveal de melanoma^[8].

1.2. Relevância e actualidade do tema

O melanoma cutâneo representa apenas 5 a 10% das neoplasias malignas da pele. No entanto, é a que mais contribui para a mortalidade por cancro cutâneo (75 a 90% dos casos)^[9,10].

Na primeira metade do século XX começou a observar-se um aumento progressivo da incidência desta neoplasia. Este facto levou à individualização epidemiológica do melanoma em relação às restantes neoplasias cutâneas (antes registadas em conjunto) na 6ª. revisão da International Statistical Classification of Diseases (Organização Mundial da Saúde, 1948) e aos primeiros estudos epidemiológicos nesta área^[11]. A tendência crescente da incidência manteve-se ao longo da segunda metade do século XX, atingindo um aumento de 15 vezes em cerca de 40 anos, magnitude não registada em qualquer outro tipo de cancro^[12]. Nalguns países (Noruega, Islândia, França, Israel, Canadá, Estados Unidos da América, Austrália e Nova Zelândia) regista-se actualmente uma estabilização da incidência, facto particularmente notório nas populações mais jovens^[13] e que possivelmente representa o reflexo das campanhas de prevenção primária desenvolvidas. Apesar disso, o melanoma é ainda a sexta neoplasia mais diagnosticada e o risco de desenvolver um melanoma ao longo da vida, estimado em 1/1500 em 1935, era de 1/68 em 2002^[14].

As provas que demonstram que a exposição à radiação UV se relaciona com o aumento do risco de melanoma provêm de diversos estudos observacionais, estudos caso-controlo, estudos prospectivos e meta-análises. Encontram-se neles diferentes metodologias, avaliando-se a exposição à radiação UV em diferentes contextos: exposição solar intermitente, exposição solar continuada e cumulativa ou exposição a fontes artificiais de UV

(câmaras de fototerapia e solários). Também existem estudos que avaliaram o risco relacionado com a ocorrência de condições resultantes de uma exposição intensa aos UV, particularmente a presença de uma história prévia de queimaduras solares em idade jovem, a quantidade de queimaduras solares previamente sofridas e a existência de sinais de dano actínico. Por exemplo, uma grande meta-análise baseada em 57 estudos observacionais^[15] mostrou uma diferença estatisticamente significativa no número de melanomas em indivíduos com um padrão intermitente de exposição solar. Episódios de queimadura solar, principalmente na infância ou em indivíduos com maior susceptibilidade fenotípica à radiação UV foram relacionados com um risco acrescido de melanoma, embora a magnitude desse risco tenha sido inferior a duas vezes ao estimado para a população geral^[16,17]. Ao invés, a exposição solar regular conferiu menor risco nalguns estudos retrospectivos, em particular nalgumas áreas anatómicas expostas, como foi o caso dos membros inferiores, permitindo evocar um hipotético papel preventivo inerente à fotoadaptação ou a maiores níveis de vitamina D^[17], molécula que intervém na regulação da diferenciação celular e inibição do crescimento tumoral. Por esta razão, a relação entre o nível sérico de vitamina D e o risco de melanoma tem sido um assunto de intenso debate nos anos recentes. Se há estudos que foram incapazes de estabelecer relações entre os níveis séricos de vitamina D e a ocorrência de melanoma^[18], outros demonstram níveis de vitamina D sub-óptimos (na forma de 25-hidroxivitamina D3) em doentes com melanoma e sugerem o envolvimento de determinados polimorfismos do receptor da vitamina D (VDR) na susceptibilidade de desenvolver um melanoma, conforme se discutirá adiante (ver Capítulo II)^[19].

Em suma, a grande relevância epidemiológica do melanoma, resultado do incremento da incidência e do impacto desta neoplasia na mortalidade por cancro cutâneo, constitui o primeiro factor de motivação deste trabalho.

Presume-se que a transformação oncogénica dos melanócitos siga múltiplas etapas caracterizadas por uma acumulação sequencial de mutações até à aquisição plena de um fenótipo neoplásico^[20]. A radiação UV (num padrão intermitente de exposição) funcionaria, desta forma, como iniciador e simultaneamente como promotor tumoral. Este modelo, todavia, é apenas aplicável ao melanoma de crescimento superficial (que representa cerca de 2/3 dos casos^[3]), não se adaptando a outros tipos anátomo-clínicos. Com efeito, o lénigo maligno tem sido relacionado apenas com um padrão cumulativo de exposição à radiação solar, enquanto o melanoma acral e o melanoma nodular não foram até à data inequivocamente relacionados com a exposição a este tipo de radiação. Estes dados epidemiológicos levantam a questão dos diversos tipos anátomo-clínicos de melanoma serem

biologicamente distintos, ao invés de meras variantes de uma entidade nosológica única^[21]. A oncogénese do melanoma é, na realidade, complexa, e os oncogenes ou os genes onco-suppressores que habitualmente aparecem mutados variam de acordo com o tipo anátomo-clínico. Assim, as mutações do gene BRAF são observadas numa frequência estatisticamente mais elevada em melanomas situados nas regiões anatómicas intermitentemente expostas à radiação UV^[22], em particular nas variantes de crescimento superficial. Estas mutações, no entanto, não são relacionáveis directamente com a radiação UV (carecem da sua “assinatura molecular”, CC>TT ou C>T)^[23], embora se suponha serem condicionadas por efeitos indirectos da mesma^[24]. Por outro lado, mutações do gene CCND1, que codifica a ciclina D1, e mutações de CKIT são mais comuns no melanoma acral. Identificaram-se igualmente determinadas variantes alélicas relativamente específicas do melanoma de crescimento superficial ou do melanoma nodular^[21]. Estes dados, no seu conjunto, e a par das dissemelhanças epidemiológicas, evocam diferenças biológicas essenciais entre as formas anátomo-clínicas de melanoma.

A relevância da predisposição genética foi igualmente fundamentada, ao ponto de alguns autores definirem o melanoma como uma doença poligénica multifactorial^[10]. Existem variantes alélicas de baixa penetrância, mas de frequência significativa na população geral, que incrementam o risco de melanoma, como acontece com o gene do receptor da melanocortina (MC1R). Além disso, há mutações de alta penetrância (pouco frequentes na população geral) que conferem uma magnitude de risco bastante mais elevada, como é o caso das mutações nos genes CDKN2A e CDK4, ambos bem caracterizados no contexto dos melanomas familiares. Por outro lado, mutações somáticas esporádicas em diversos oncogenes e em genes onco-suppressores foram descritas como eventos relevantes na génese e progressão do melanoma, tendo sido definidas como alvos terapêuticos algumas proteínas disfuncionais por eles codificadas.

O interesse crescente acerca do conhecimento fisiopatológico dos mecanismos oncogénicos subjacentes à transformação e progressão tumoral e o seu impacto na determinação de factores de prognóstico moleculares e no estabelecimento de alvos terapêuticos constitui o segundo factor subjacente à escolha deste tema.

A prática clínica diária com doentes de melanoma e a observação dos padrões evolutivos da doença suscitam questões relevantes, alvos incontornáveis da investigação clínica actual: (i) porque razão alguns doentes com gânglio sentinela negativo desenvolvem metastização ganglionar ou à distância?, (ii) porque razão a linfadenectomia radical não provou ser capaz de melhorar a sobrevivência global em doentes com metastização ganglionar regional?, (iii)

porque razão alguns doentes com metastização em trânsito e ganglionar desenvolvem metástases à distância, enquanto outros podem viver longos períodos sem que a doença se dissemine por via hemática? e, por fim, (iv) porque razão a doença metastática pode surgir, não raras vezes, ao fim de anos ou décadas, numa altura em que se poderia supor a remissão definitiva?

A inquietude científica que estas questões encerram é a terceira motivação do estudo realizado.

1.3. Objectivos

Foi definida a realização de uma análise genética em peças histológicas em blocos de parafina, incluindo melanomas primários, as suas metástases loco-regionais e, comparativamente, nevos melanocíticos adquiridos, de modo a pesquisar a frequência de determinadas mutações de descrição recente, tentando inferir acerca da sua eventual influência na oncogénese e progressão da doença. Concomitantemente, pretendeu-se efectuar um estudo clínico de desenho observacional, retrospectivo, com incidência numa amostra de doentes com melanoma, no intuito de pesquisar a influência de diversas variáveis clínico-patológicas na progressão do melanoma e nas suas vias de metastização. Estes dois propósitos globais podem ser detalhados através de diversos objectivos concretos:

- Identificação da prevalência de mutações seleccionadas num conjunto de amostras de melanomas cutâneos primários e de metástases loco-regionais (metástases cutâneas em trânsito e metástases ganglionares).
- Determinação da pertinência patológica dessas mutações na oncogénese do melanoma, com base em dados da literatura, em ferramentas bio-informáticas e por comparação com amostras de nevos melanocíticos adquiridos.
- Identificação de factores clinico-patológicos ou genéticos preditivos da progressão tumoral.

- Avaliação do impacto da biopsia do gânglio sentinela no prognóstico quando utilizada em distintas fases da doença, analisando o seu papel preditivo da progressão tumoral.
- Identificar factores clínico-patológicos ou genéticos capazes de determinar a via de disseminação metastática da doença.
- Avaliar diferenças evolutivas entre melanomas que metastizam por vias metastáticas distintas.

1.4. Organização da dissertação

O presente capítulo fornece uma breve perspectiva acerca do melanoma cutâneo, da sua relevância epidemiológica e dos conhecimentos recentes acerca da oncogénese e da progressão tumoral, factores relevantes no desenvolvimento de novas armas terapêuticas de desenvolvimento recente. São igualmente expostas as motivações que levaram ao planeamento do trabalho e são definidos os objectivos a alcançar.

No capítulo II é realizada uma revisão bibliográfica sobre áreas do conhecimento que se relacionam com o trabalho desenvolvido. Em concordância, são abordados os aspectos genéticos subjacentes à oncogénese do melanoma, são revistos os modelos hipotéticos de progressão tumoral e os factores que se revelaram importantes para a progressão da neoplasia e para o desenvolvimento de metástases loco-regionais e à distância.

O capítulo III pormenoriza os materiais utilizados e a metodologia detalhada de todo o projecto de investigação.

A descrição dos resultados e a análise de correlações estatísticas entre as variáveis em análise estão expressas no capítulo IV.

A discussão dos resultados é realizada ao longo do capítulo V, recorrendo-se às bases teóricas previamente expostas, complementando-as sistematicamente com observações críticas. São também discutidas as limitações e as dificuldades encontradas.

No capítulo VI resumem-se as principais conclusões, sublinham-se os contributos mais relevantes e apontam-se sugestões para ramificações futuras da investigação desenvolvida.

Capítulo II

Revisão da Literatura

2.1. Genética

2.1.1. Perspectiva geral

O melanoma, como outras neoplasias, é uma doença cuja fisiopatologia é influenciada fortemente por alterações genéticas, ou seja, pela ocorrência de mutações herdadas e/ou adquiridas em genes críticos.

As mutações são alterações permanentes na sequência do DNA, podendo ser silenciosas ou assumir tradução fenotípica. Quando presentes nos gâmetas, designam-se por mutações germinativas, sendo passíveis de transmissão vertical aos descendentes do indivíduo portador. Pelo contrário, se forem exclusivas das células somáticas não afectarão a prole do indivíduo portador^[25].

Algumas mutações têm expressão citogenética. É o caso das alterações numéricas e estruturais dos cromossomas. Algumas amplificações, responsáveis por uma multiplicação funcional dos genes afectados, também são identificáveis no cariótipo, embora a maioria ocorra somente a um nível molecular. A poliploidia e a aneuploidia estão descritas em diversos tumores sólidos^[1], assim como as deleções e as translocações. No melanoma, foram reportadas inúmeras alterações deste tipo. Nas regiões de quebra cromossômica responsáveis por estas mutações, foram localizados genes cuja expressão se encontra alterada, em particular certos genes envolvidos na proliferação celular e na apoptose^[26].

As mutações pontuais, as deleções e as inserções de pares de bases apenas se podem evidenciar através de técnicas de biologia molecular^[27]. As mutações pontuais podem alterar a leitura de um determinado codão, levando à alteração da sequência de aminoácidos do produto proteico (mutação *missense*) ou, por outro lado, podem criar erroneamente um codão de terminação, com conseqüente síntese de uma proteína truncada, quase sempre não funcional (mutação *nonsense*). A deleção ou inserção de pares de bases tem um efeito distinto, criando uma nova sequência de codões a partir do sítio em que ocorre (mutação *frameshift*).

No contexto da oncogénese, as mutações surgem como um acontecimento de extrema relevância, levando à activação de oncogenes ou à inactivação de genes onco-supressores. Os oncogenes, ainda que em heterozigotia, são funcionalmente relevantes, enquanto a perda de actividade de um gene onco-supressor só é crítica, em regra, quando em homozigotia. Isto significa que uma mutação inactivadora de um único alelo de um gene onco-supressor permite a compensação funcional pelo alelo não mutado. Apenas uma nova agressão mutagénica que conduza à perda do alelo normal (“perda de heterozigotia”), poderá constituir um factor crítico na transformação neoplásica. Excepções a esta regra são as mutações dominantes-negativas, como acontece habitualmente com as mutações de TP53^[28]. Neste caso, a proteína p53 anómala, codificada pelo alelo mutado, inibirá a expressão ou a função da proteína normal e, deste modo, o resultado é equivalente *ab initio* à perda de heterozigotia.

O contributo exacto de uma mutação individual na transformação neoplásica é difícil de estabelecer, mas a oncogénese parece ser o resultado aditivo e orquestrado de diversas mutações que perpetuam sinais proliferativos e inibem a morte celular programada.

No que concerne especificamente ao melanoma, as mutações mais frequentes verificam-se em genes que codificam proteínas que participam em três vias moleculares específicas^[29]: a via das cinases activada por mitogénios (MAPK), a via da PI3K/AKT e a via da p16INK4A, uma vez que mutações em diversos oncogenes e nalguns genes onco-supressores que codificam proteínas funcionalmente relevantes nestas vias são frequentemente observadas nesta neoplasia cutânea (Tabela 1).

Estudos de sequenciação genómica recentes permitiram identificar assinaturas mutacionais em diversas neoplasias^[30]. Em relação ao melanoma, o trabalho de Pleasance *et al.* (2010)^[31] realizou um rastreio abrangente de mutações somáticas numa linha celular (COLO-829) derivada de uma metástase de melanoma, detectando 33.345 substituições de bases, 292 das quais em regiões codificadoras, sendo 187 mutações não sinónimas

(causadoras de troca de aminoácidos). É de realçar que a maioria das alterações mononucleotídicas foram substituições C>T e G>A, assim como mais de metade das alterações dinucleotídicas foram substituições CC>TT e GG>AA. Estas alterações são muito provavelmente resultantes do efeito mutagénico directo da radiação UV, caracterizado pela criação de ligações covalentes entre pirimidinas adjacentes (“assinatura molecular” da radiação UV)^[32]. Nesse contexto, uma enorme proporção de mutações C>T e CC>TT ocorreram na base pirimidínica 3’ de um dinucleótido de pirimidina. A frequência destas mutações em dinucleótidos CpG também se revelou duas vezes maior do que a esperada, factos que estão de acordo com a suposta intervenção mutagénica directa da radiação UV.

Tabela 1. Vias moleculares mais importantes na oncogénese do melanoma.

Via molecular	Alterações habituais
MAPK	Mutação de RAS
	Mutação de RAF
	Mutação de KIT
PI3K/AKT	Mutação de RAS
	Mutação de PTEN
	Expressão desregulada de AKT
p16INK4A	Mutação de CDKN2A
	Mutação de ARF
	Mutação de TP53

Dada a variedade e a complexidade das mutações encontradas em células de melanoma, a exposição das consequências funcionais delas resultantes não se esgota na revisão sistemática das três principais vias moleculares implicadas. Adicionalmente, é fundamental rever o papel regulador que as vias de reparação do DNA podem representar diante dos fenómenos mutacionais, a participação de genes que codificam proteínas da via de melaninogénese na expressão fenotípica e no conseqüente risco de melanoma e, finalmente, a desregulação da apoptose como evento paralelo à proliferação ilimitada.

2.1.2. Ciclo celular

O ciclo celular é o processo fisiológico que resulta na divisão celular^[33], convergindo nele diversas vias de sinalização intracelular que o transformam no alvo final de uma variedade de

sinais proliferativos iniciados habitualmente pela ligação de factores de crescimento aos seus receptores membranares. Como exemplo disso, todas as vias descritas adiante (p16INK4A, MAPK e PI3K/Akt) participam na regulação do ciclo celular^[34]. A complexa interacção entre os sinais proliferativos e as proteínas inibidoras condiciona a existência de autênticos interruptores moleculares para a continuação ou o bloqueio do ciclo^[33].

Ao longo da vida da célula, cada período de divisão celular (mitose) é separado por um período de duração muito variável, a interfase, na qual se reconhecem 3 períodos distintos: G1, S e G2^[33] (Fig. 1).

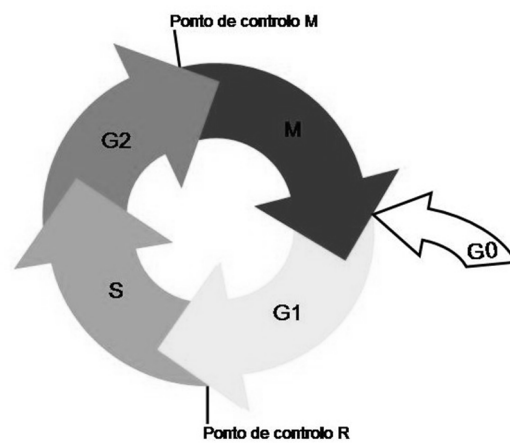


Figura 1. Ciclo celular.

Durante G1 a célula transcreve activamente múltiplos genes e sintetiza grandes quantidades de proteínas, aumentando o seu volume. Quando a célula alcança todos os requisitos necessários à replicação do seu material genético, inicia-se a fase S. Depois de todo o DNA ter sido replicado, a célula entra em G2, prosseguindo a síntese de mRNA e de proteínas^[33]. No início da fase mitótica (profase), o nucléolo desaparece, a cromatina condensa-se progressivamente até formar os cromossomas e os microtúbulos do citoesqueleto organizam-se numa estrutura fusiforme que parte dos centríolos: o fuso mitótico. De seguida (prometafase), dá-se a ruptura do envelope nuclear, deixando de haver separação nítida entre o núcleo e o citoplasma (o núcleo desaparece). Algumas fibras do fuso mitótico alongam-se e estabelecem ligações com os cineticores, um conjunto de feixes proteicos dependentes dos cromossomas. Outras fibras do fuso, em lugar de estabelecerem contacto com os cromossomas, sobrepõem-se em redor do equador celular. Findo este processo, a tensão aplicada pelas fibras do fuso mitótico sobre os cromossomas durante a metafase, faz com que estes se encontrem relativamente alinhados no equador da célula, havendo um emparelhamento de cromossomas homólogos. Por fim, os cromossomas homólogos

separam-se durante a anafase, migrando ao longo do fuso mitótico em direcções diametralmente opostas. Na telofase, a migração atinge os pólos da célula, ficando em cada pólo o material genético de cada uma das futuras células filhas. Assiste-se, então, à desagregação progressiva do fuso mitótico e à formação de novas membranas nucleares. O processo culmina na citocinese, durante a qual a porção do fuso mitótico que ainda não foi desagregada (a porção constituída pelas fibras sobrepostas no equador da célula) forma um anel contráctil que cliva a célula em duas novas células perfeitamente individualizadas.

Muitas células revivem indefinidamente este processo, embora outras, particularmente aquelas que atingiram um alto grau de diferenciação, como é o caso dos neurónios, possam abandonar o ciclo celular, ficando numa fase G_0 , no decurso da qual, mesmo sob estímulos proliferativos, são incapazes de prosseguir o ciclo^[35].

Os pontos críticos na regulação do ciclo celular são as transições entre as diferentes fases, em particular as transições G1/S (ponto de controlo R) e G2/M (ponto de controlo M)^[33]. A perturbação da homeostase do ciclo celular é indiscutivelmente um dos acontecimentos mais importantes na transformação oncogénica^[36]. Os genes que codificam proteínas implicadas na estimulação do ciclo celular são proto-oncogenes (CDK4^[37], CCND1^[38], BRAF^[39], NRAS^[40], etc.). De igual modo, os genes que codificam proteínas reguladoras que inibem o ciclo celular são genes onco-supressores (CDKN2A, que codifica as proteínas p16INK4A e p14ARF^[40]).

2.1.3. Via da p16INK4A

A via da p16INK4A (Fig. 2) é uma via molecular fundamental na fisiologia da célula, uma vez que exhibe uma importante função reguladora da progressão do ciclo celular^[36]. A p16INK4A é um importante travão à proliferação celular, inibindo a progressão da fase G1 e a transição G1/S. Esta proteína inibe a actividade catalítica das enzimas CDK4 e CDK6 (cinases dependentes de ciclinas)^[41], impedindo que estas fosforilem a proteína do retinoblastoma (Rb). A conservação da forma hipofosforilada de Rb mantém a afinidade desta proteína pelo factor de transcrição E2F. Assim, este factor fica impedido de se heterodimerizar com a proteína DP e de interagir com o DNA (sequências TTTCGCGC das regiões promotoras dos genes alvo). Esta via constitui um ponto de convergência, estando funcionalmente alterada em virtualmente todas as linhas celulares de melanoma^[42].

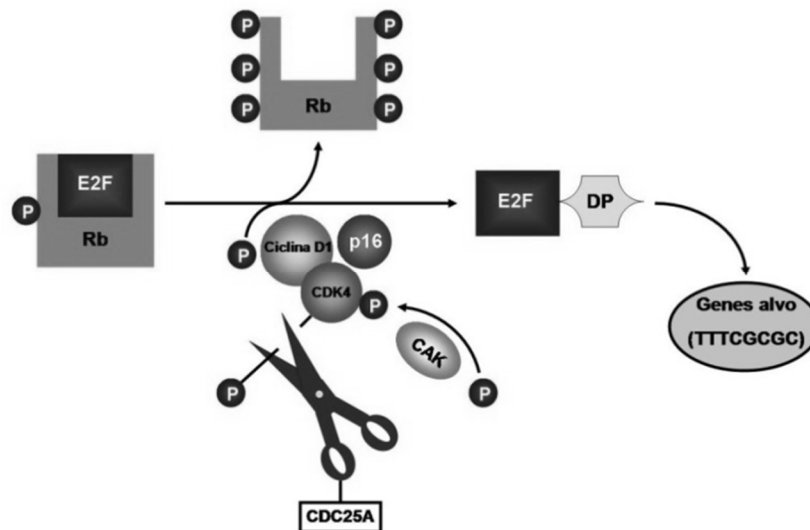


Figura 2. Via da p16INK4A.

A p16INK4A é o produto resultante da combinação dos exões 1 α , 2 e 3 do gene onco-supressor CDKN2A^[40]. Este complexo *locus*, situado em 9p21, contém 4 exões (1 α , 1 β , 2 e 3). Além da p16INK4A, o gene também é responsável pela codificação da proteína p14ARF, cuja função principal é a inibição da MDM2^[43], uma proteína capaz de degradar a p53 e aumentar a semivida do factor de transcrição E2F^[44]. A proteína p14ARF, apesar de resultar da combinação dos exões 1 β , 2 e 3, não tem homologia estrutural com a p16INK4A^[45], já que é traduzida através de um padrão alternativo de leitura de codões.

As mutações do gene CDKN2A são as alterações genéticas mais comuns em melanomas familiares (20 a 40% dos casos^[40]). Apesar de pouco comum em melanomas esporádicos, a perda de heterozigotia deste *locus* pode também ser relevante nesse contexto específico^[45].

Algumas mutações no oncogene CDK4, codificador da cinase dependente de ciclina-4 (CDK4), foram associadas a risco familiar de melanoma, embora sejam muito menos comuns do que as mutações de CDKN2A^[37]. As mutações de CDK4 identificadas até à data (apenas descritas em 12 famílias) localizam-se no códon 24 do exão 2, resultando numa proteína resistente à inibição pela p16INK4A.

2.1.4. Via da proteína Ras

A família de proteínas Ras é formada por 3 GTPases de pequeno peso molecular denominadas N-Ras, H-Ras e K-Ras^[48]. Estas proteínas estão situadas no lado citosólico da membrana celular, acopladas a receptores do tipo tirosina-cinase^[49]. O papel principal destas

proteínas é a transdução de sinais iniciados pela ligação de factores de crescimento ao seu receptor específico^[48].

A sinalização através da via da proteína Ras é complexa, baseando-se num mecanismo dependente de GTP^[50] (Fig. 3). A proteína Ras encontra-se activa enquanto associada a uma molécula de GTP e inactiva quando o GTP é degradado em GDP. A actividade intrínseca de GTPase da proteína Ras confere-lhe a capacidade de regular o seu próprio estado de activação. A formação de complexos Ras-GTP é mediada pelas proteínas adaptadoras Grb2 e SOS após ligação de um factor de crescimento ao seu receptor membranar. Estas proteínas adaptadoras recrutam proteínas GEF que funcionam como interruptores moleculares: estimulam a libertação de GDP do complexo Ras-GDP, permitindo a ligação de GTP e a obtenção de complexos Ras-GTP activos^[29]. Ao invés, a actividade da proteína Ras como GTPase pode ser induzida por proteínas GAP, responsáveis pela cessação da sinalização.

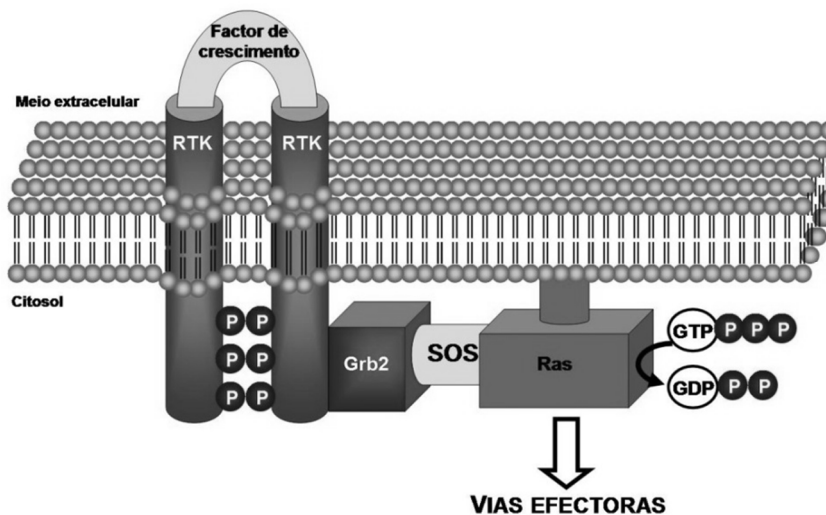


Figura 3. Activação da proteína Ras.

Quando activa, a proteína Ras pode desencadear vias efectoras, entre as quais a via das cinases MAPK e a via da PI3K/Akt^[48]. O resultado final é a expressão de genes codificadores de proteínas responsáveis pela progressão do ciclo celular e pela sobrevivência celular^[51].

Os genes NRAS, HRAS e KRAS são oncogenes conhecidos desde há longa data. O gene NRAS foi inclusivamente o primeiro oncogene identificado em células neoplásicas humanas^[52].

As mutações que resultam em proteínas Ras disfuncionais, desprovidas de actividade enzimática de GTPase ou resistentes à acção inibidora das proteínas GAP, afectam geralmente a isoforma NRAS. Estas mutações, que ocorrem habitualmente nos codões 12,

13 e 61, são relativamente comuns nas lesões melanocíticas^[53], podendo observar-se em 56% dos nevos congénitos, em 33% dos melanomas primários e em 26% dos melanoma metastáticos^[29]. Relacionam-se com a acção da radiação UV, sendo mais comuns em melanomas de áreas associadas a exposição solar contínua (56%) do que em melanomas de áreas de exposição intermitente (21%). As mutações de HRAS e KRAS são, no entanto, pouco comuns, ocorrendo respectivamente em 1% e 2% dos melanomas.

A proteína oncogénica Ras constitui um alvo potencial na terapêutica antineoplásica. Dado que a farnesilação da proteína Ras (ligação a um grupo farnesilo) é fundamental para que a molécula permaneça no lado citosólico da membrana plasmática^[49], onde é funcionalmente activa, os inibidores da enzima farnesiltransferase demonstraram-se eficazes na inibição da activação de Ras *in vitro*^[54]. Todavia, em relação ao melanoma, o tipifarnib, inibidor da farnesiltransferase, não revelou qualquer benefício terapêutico em associação com o sorafenib, inibidor de tirosina-quinases e de quinases Raf, num ensaio clínico em fase II^[55].

2.1.5. Via das quinases MAPK

A via das quinases MAPK é uma cascata de sinalização intracelular capaz de transduzir estímulos desencadeados por factores de crescimento e por receptores acoplados a proteínas G⁵¹. Intervêm em funções celulares que participam na transformação neoplásica, como a proliferação, a diferenciação e a migração celulares^[29].

A activação da via das quinases MAPK é uma consequência da activação da proteína Ras^[51] (Fig. 4) e o resultado final desta cascata sinalizadora é a activação de uma enzima da família MAPK^[56], em particular ERK1 ou ERK2. Dessa activação resulta um aumento na expressão de vários factores de transcrição, resultando na síntese de proteínas que interferem com a proliferação e a sobrevivência celulares.

Para desencadear a cascata, a proteína Ras activa actua sobre uma enzima da família MAPKKK (quinase das MAPKK)^[56] denominada B-Raf, activando-a sequencialmente. O passo seguinte é a activação de enzimas da família MAPKK (quinase das MAPK), nomeadamente MEK1 e MEK2, numa reacção catalizada pela proteína B-Raf. Estas activações enzimáticas sucessivas dão-se através da fosforilação de determinados resíduos de serina e treonina localizados nos domínios reguladores destas moléculas. Dessa forma, todas as proteínas da cascata se comportam funcionalmente como quinases de serina/treonina, sendo capazes de se activarem em cascata.

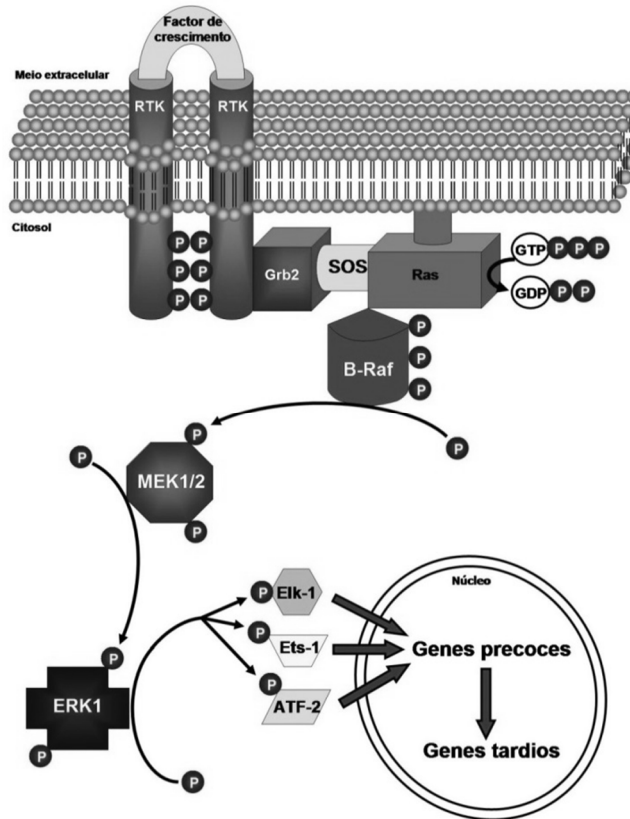


Figura 4. Via das cinases MAPK.

Mutações no gene BRAF (que codifica a proteína B-Raf) são muito frequentes nos melanomas cutâneos primários esporádicos^[34], variando de 27 a 70%, de acordo com as séries^[29]. É também frequente em nevos melanocíticos (82%). Apesar de existirem relatos de mais de 40 mutações distintas, a mutação pontual V600E no exão 15^{29,34} é a mais comum (92%)^[29]. Esta mutação é particularmente prevalente nos melanomas de crescimento superficial localizados no tronco ou nos membros inferiores^[22]. Ao invés, ocorre de forma excepcional no melanoma das mucosas^[57] ou no melanoma ocular^[58], sugerindo uma possível relação com a exposição esporádica à radiação UV^[22].

Apesar da frequência individual de mutações BRAF e NRAS ser elevada, é excepcional a concomitância destas mutações no melanoma^[59]. Com efeito, uma vez que as proteínas Ras e B-Raf actuam na mesma via sinalizadora, a mutação simultânea em ambos os genes seria funcionalmente redundante. O mecanismo subjacente a esta exclusividade permanece, no entanto, por elucidar.

Dada a elevada prevalência de mutações BRAF V600E no melanoma, esta proteína mutada foi considerada um potencial alvo terapêutico há mais de uma década^[29]. Um dos primeiros fármacos utilizados com o objectivo de a bloquear foi o sorafenib^[60], um inibidor potente de multikinases (RAF-1, BRAF nativo, BRAF V600E), aprovado em 2006 para o

tratamento do carcinoma hepatocelular e do carcinoma de células renais. Contudo, o benefício do sorafenib em monoterapia no melanoma, para o qual nunca obteve aprovação, é muito discreto, tendo-se abandonando rapidamente o seu uso, em função do aparecimento de inibidores mais específicos de BRAF V600E.

Um inibidor BRAF com elevada especificidade para BRAF V600E, vemurafenib, tem um efeito citotóxico importante em células de melanoma *in vitro* e *in vivo*, com impacto na sobrevivência global^[29]. Em ensaio clínico de fase III (BRIM-3), conduziu a uma diminuição do volume tumoral na maioria dos doentes com mutação BRAF V600E tratados, demonstrando uma resposta objectiva em 48% dos casos, bastante superior aos 5% obtidos com o uso de dacarbazina^[61]. A sobrevivência global média, estimada pelo método de Kaplan-Meier, foi de 13,2 meses nos doentes tratados com vemurafenib comparada com os 9,6 meses no grupo tratado com dacarbazina. Curiosamente, a resposta à dacarbazina nestes doentes foi inferior à esperada, admitindo-se que a expressão de BRAF mutado possa, por mecanismos pouco claros, conferir resistência à quimioterapia. O que mais condiciona o uso do vemurafenib é a resistência inata e adquirida, resultando numa perda de eficácia, demonstrável através de uma sobrevivência livre de doença de apenas 7 meses^[62]. As razões desta resistência são multifactoriais, passando pela reactivação da sinalização MEK/ERK mediada pelas isoformas ARAF e CRAF, pelo aumento da expressão de ciclina D1 através da amplificação do *locus* CCND1 (conduzindo a uma activação do ciclo celular geralmente regulada pela sinalização ERK1/2) ou pela activação de vias de sinalização alternativas, como a via PI3K/AKT. O vemurafenib pode induzir o aparecimento de queratoacantomas e carcinomas espinhocelulares eruptivos^[63] e, nos melanomas que carecem de expressão da mutação BRAF V600E, resulta habitualmente na progressão da doença, podendo atribuir-se estes efeitos a um aumento da sinalização através da proteína ERK^[29]. Todavia, o vemurafenib revela-se igualmente benéfico nos doentes cujo tumor possua a variante mutada BRAF V600K.

O dabrafenib, um outro inibidor específico do BRAF mutante, de desenvolvimento mais recente, revelou um perfil de eficácia e de segurança relativamente similar ao do vemurafenib, resultando numa sobrevivência livre de progressão de 5,1 meses, comparada com os 2,7 meses obtidos com dacarbazina num ensaio de fase III^[64].

As cinases MEK1/2 são outros alvos terapêuticos potenciais da via MAPK. Apesar de raramente se encontrarem mutadas (3 a 8% dos melanomas)^[29], o seu bloqueio por fármacos específicos constitui uma estratégia delineada para os casos de resistência aos inibidores de BRAF. Neste contexto, o trametinib^[65] demonstrou aumentar a sobrevivência livre de

progressão em doentes de melanoma com a mutação BRAF V600E, quando este agente se utilizou em associação a inibidores de BRAF mutante. O selumetinib, outro inibidor das MEK, não demonstrou ser mais eficaz em monoterapia do que a temozolamida em doentes com melanoma avançado não seleccionados de acordo com a presença de mutações BRAF ou RAS^[66].

Porém, os inibidores de cinases MEK são completamente ineficazes em determinadas mutações com ganho funcional de MEK1 e MEK2, capazes de originar proteínas anormais resistentes à acção inibidora dos fármacos^[67].

2.1.6. Via da PI3K/AKT

A via da PI3K/Akt (Fig. 5) é responsável pela transdução de sinais iniciados pela ligação de factores de crescimento aos respectivos receptores de membrana^[52].

Uma das formas mais comuns, embora não a única, de activação desta cascata é a sinalização através da proteína Ras^[48].

A cinase de fosfoinosítídeos PI3K é a primeira enzima desta via^[68], catalizando a conversão do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) ou em fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PI-3,4-P2). O PIP3 e o PI-3,4-P2 são os activadores de uma cinase dependente de fosfoinosítídeos conhecida como PDK1. A PDK1 é uma cinase de serina/treonina, tendo como principal função biológica a activação da cinase Akt3. Por sua vez, a cinase Akt3 é responsável pela activação sucessiva de uma grande variedade de substratos (cinase mTOR, cinase GSK3, factores de transcrição AFX, NFkB, CREB e *forkhead*, proteína p21Cip1, proteína p27Kip1, proteína Bad e procaspase-9)^[69-78], resultando na progressão do ciclo celular, na estimulação da síntese proteica e na promoção da sobrevivência celular.

A sinalização através desta via é inibida pela enzima PTEN, previamente conhecida por MMAC1^[68,79]. Esta proteína tem actividade intrínseca de fosfatase de serina/treonina e é capaz de remover grupos fosfato das moléculas de fosfoinosítídeos^[80], bloqueando a activação de Akt3.

A expressão aumentada de AKT é observada em 43 a 60% dos melanomas cutâneos e correlaciona-se com a progressão da doença^[81]. Resulta maioritariamente de mutações do gene onco-supressor PTEN (observadas em cerca de 30% dos casos)^[82]. Outras causas da sobre-expressão de AKT são a amplificação de 1p (que inclui o *locus* AKT3) e a activação

anormal da via da proteína Ras^[81] (14% dos melanomas acumulam mutações de NRAS com a perda de PTEN^[83]).

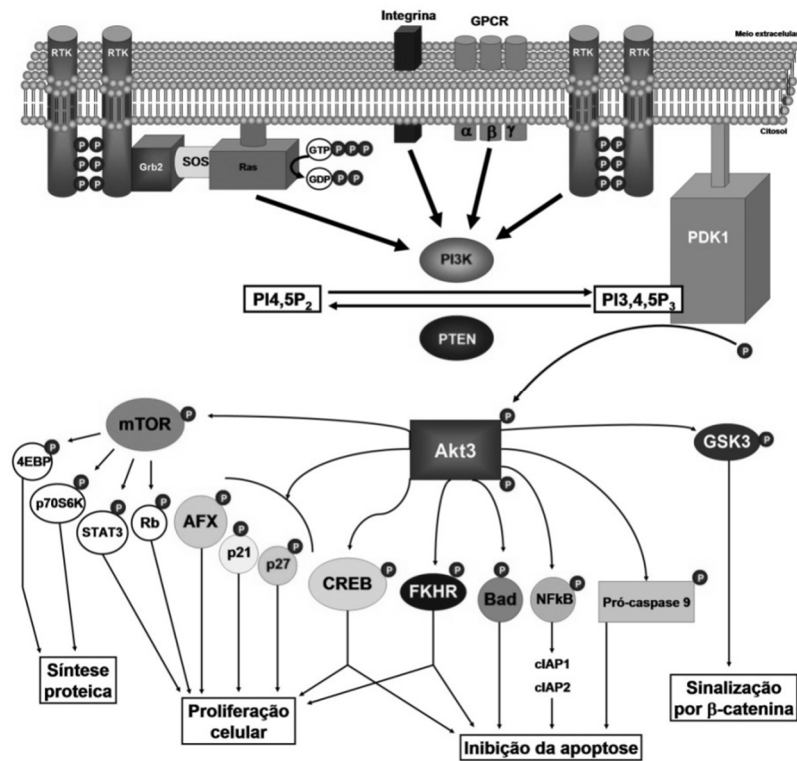


Figura 5. Via da PI3K/AKT.

A inibição da via PI3K/AKT com interesse terapêutico é um assunto actual, salientando-se, uma vez mais, a relação da genética tumoral com a definição de alvos terapêuticos. O agente LY294002 foi o primeiro inibidor desta via e, apesar da actividade inibitória sobre a cinase PI3K ser relativamente pouco potente, mostrou-se capaz de bloquear a activação de Akt *in vitro*, embora as suas propriedades farmacocinéticas não permitam o seu uso *in vivo*^[84]. Diversos inibidores de PI3K com potencial efeito anti-tumoral (PWT-458, PX-866, ZSTK474, API-2, isolenocianato, SR13668, BI-69A11, GSK690693, MK2206, perifosina/kerix e NVP-BEZ235) encontram-se actualmente em desenvolvimento^[29,84].

A inibição de mTOR, um dos efectores da via PI3K/AKT, é outra estratégia com potencial interesse terapêutico. Em relação ao melanoma, estudos *in vitro* com o temsirolimus, um inibidor de mTOR, demonstraram indução de morte celular por apoptose em culturas celulares tridimensionais de melanoma e em xeno-enxertos tumorais^[85].

2.1.7. Via da proteína c-Kit

A proteína c-Kit é um receptor tirosina-cinase transmembranar, responsável pela génese de sinais intracelulares em resposta ao seu ligando natural, o SCF (*stem cell factor*). Entre diversas funções, salienta-se a regulação funcional dos melanócitos. De facto, a perda funcional de c-Kit leva a distúrbios da pigmentação, uma vez que, nos melanócitos, a cascata de sinalização iniciada por c-Kit culmina no aumento da expressão do factor de transcrição Mitf (*microphthalmia-associated transcription factor*), o principal orquestrador da actividade biológica dos melanócitos^[86], conforme desenvolvido adiante neste capítulo.

A ligação do SCF à porção extracelular de c-Kit leva à dimerização e autofosforilação de resíduos de tirosina na porção intracelular do receptor, activando-se a partir de diversas vias de sinalização intracelular. A fosforilação em Y568 e Y560 torna o receptor capaz de fosforilar e activar as cinases da família Src que, por sua vez, desencadeiam a sinalização através da cascata MAPK. Por outro lado, a fosforilação de c-Kit em Y721 é responsável pela activação da via PI3K^[86].

Amplificações e mutações activadoras no gene *CKIT* (localizado em 4q11-q12) podem ser encontradas em cerca de 30% dos melanomas acrais e dos melanomas das mucosas, mas apenas numa minoria dos melanomas que surgem em áreas expostas à radiação UV^[87].

O receptor c-kit e algumas proteínas efectoras, como as cinases da família Src, são alvos potenciais da terapêutica anti-neoplásica. Assim, o imatinib constitui uma opção terapêutica em melanomas que possuem amplificações ou mutações activadoras do gene *CKIT*, conforme demonstrado num ensaio clínico de fase II, em que 23,3% dos doentes obtiveram uma resposta parcial (90% deles com mutações nos exões 11 ou 13)^[88]. Um ensaio clínico em fase II com o dasatinib (inibidor das cinases Src e de c-Kit) no tratamento do melanoma avançado (estádio III com doença irrecorrível e estágio IV) revelou uma eficácia mínima (taxa de resposta de 5%) em melanomas não seleccionados em função de mutações *CKIT*^[89].

2.1.8. Regulação da melaninogénese

A melanina é o principal pigmento determinante da coloração da pele e do cabelo. É sintetizada no interior dos melanossomas, organelos existentes no citoplasma dos melanócitos e que demonstram semelhanças morfológicas com os lisossomas. A via de Raper-Mason ou via de síntese da melanina^[90] (Fig. 6) começa num precursor comum, o

aminoácido tirosina, e bifurca-se para originar duas formas distintas de pigmento: a eumelanina (melanina castanha ou negra, de médio a alto peso molecular, insolúvel e sem enxofre) e a feomelanina (melanina amarelo-avermelhada, de baixo peso molecular, solúvel em meio alcalino e contendo enxofre).

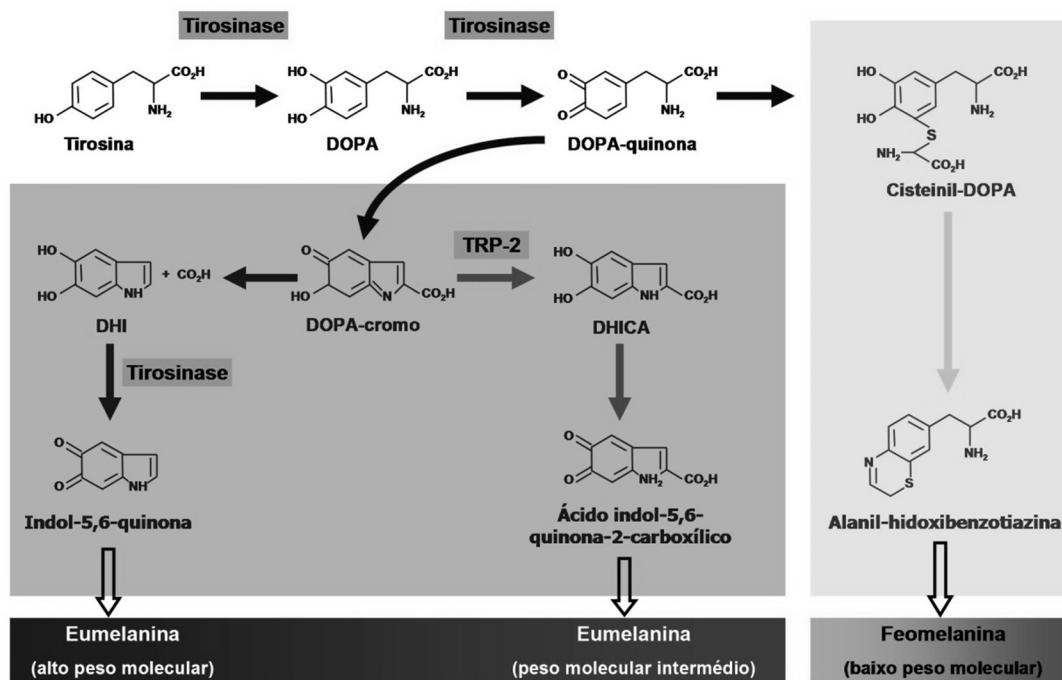


Figura 6. Via de Raper-Mason.

Os melanossomas com o seu conteúdo em melanina são transportados ao longo dos prolongamentos dendríticos dos melanócitos. Neste transporte, dependente de ATP, participam a rede de microtúbulos do citoesqueleto, a miosina Va, a actina, a proteína rab27 e a melanosina^[91]. Ao chegarem à extremidade dos prolongamentos, os melanossomas são transferidos para os queratinócitos através de um processo mal esclarecido, mas que provavelmente inclui exocitose por parte dos melanócitos e pinocitose pelos queratinócitos. Finalmente, os melanossomas concentram-se no citoplasma dos queratinócitos, agrupados em forma de capuz supranuclear^[92]. Esta distribuição peculiar constitui um mecanismo adaptativo, aproveitando a capacidade da melanina absorver a luz com comprimento de onda compreendido entre 280 e 400 nm. Assim, estabelece-se um escudo pigmentar que protege os ácidos nucleicos dos efeitos deletérios da radiação UV.

No entanto, os intermediários da síntese de melanina e a própria melanina podem, paradoxalmente, exercer acções nocivas. Por exemplo, a DOPAquinona é citotóxica, capaz de levar à morte celular quando os seus níveis são excessivos. Além disso, a generalidade dos

intermediários potencia a ocorrência de rupturas da dupla cadeia do DNA em células irradiadas por UVA *in vitro*, efeito que também ocorre na presença de feomelanina^[93]. Concomitantemente, todas as formas de melanina são avidamente reactivas com o DNA e, durante a exposição aos UVA, originam foto-reacções que culminam na geração de espécies reactivas de oxigénio. A forma que a selecção evolutiva encontrou para aproveitar beneficemente as propriedades foto-reactivas da melanina e obstar aos seus efeitos nocivos foi a restrição da sua produção e do seu transporte ao interior dos melanossomas.

A relação entre os níveis de feomelanina e de eumelanina também influi na protecção natural, na medida em que quanto maior for a quantidade relativa de feomelanina, maior será a susceptibilidade à luz UV. Uma relação feomelanina/eumelanina extremamente elevada, como se observa nos indivíduos ruivos e de fotótipos baixos^[93], traduz-se num risco comprovadamente aumentado de melanoma.

A produção de melanina e a regulação dos níveis relativos de feomelanina e de eumelanina depende da ligação da α -MSH e da proteína ASIP ao receptor das melanocortinas (MC1R)^[89]. O MC1R é um receptor acoplado a proteína G que, na presença do ligando, activa uma proteína Gs que conduzirá secundariamente ao aumento da concentração intracelular de cAMP^[94]. O cAMP é o segundo mensageiro que realizará a transdução do sinal, modulando a expressão do factor de transcrição Mitf^[95]. O Mitf vai induzir a expressão de vários genes reguladores da proliferação, diferenciação e apoptose dos melanócitos, exibindo as mesmas funções nas células de melanoma^[86]. Dentro do seu papel regulador, o factor Mitf aumenta a expressão da enzima CDK2 e da proteína BCL2, fundamentais para a sobrevivência celular, regulando a expressão de CDKN1A e CDKN2A, de modo a inibir o ciclo celular e a promover a diferenciação. De igual modo, em resposta à activação do receptor MC1R pela α -MSH, aumenta a expressão de tirosinase^[10] e, conseqüentemente, a síntese de eumelanina é estimulada em detrimento da feomelanina.

Contudo, diversos polimorfismos do gene MC1R (situado no extremo telomérico do cromossoma 16q24.3^[10]) podem perturbar a função do receptor por ele codificado. Estes polimorfismos (Tabela 2) relacionam-se com um aumento do rácio feomelanina/eumelanina e, através disso, conferem um risco relativamente elevado de melanoma^[93].

Além dos polimorfismos de nucleótico único (SNP) do *locus* MC1R, outros polimorfismos em quatro *loci* relacionados com a regulação da pigmentação cutânea (SLC45A2, OCA2, TYR e ASIP) relacionam-se com um aumento do risco de melanoma e explicam, no seu conjunto, um terço a metade da variação do risco relacionada com o fenótipo pigmentar^[96].

Tabela 2. Polimorfismos do gene MC1R associados a risco aumentado de melanoma.

Polimorfismo	Alteração funcional do receptor MC1R
V60L	
I40T	
R142H	
R151C	Síntese ineficaz de cAMP
R162P	
R160W	
N294H	
V22M	Menor afinidade pela α -MSH
R84E	
I55T	Mecanismo desconhecido
H260P	

2.1.9. Mecanismos de reparação do DNA

A actividade metabólica normal das células, a replicação do património genético que ocorre durante o ciclo celular e a acção de mutagénios ambientais físicos e químicos podem produzir danos estruturais no DNA. As células possuem, no entanto, diversos mecanismos biológicos capazes de detectar e corrigir este tipo de defeitos do DNA, de modo a evitar que se tornem permanentes. Entre estes mecanismos, encontram-se a apoptose mediada pela proteína p53 e os mecanismos celulares de reparação do DNA. A disfunção destes mecanismos, na medida em que permite a acumulação de mutações em oncogenes e em genes onco-supressores, relaciona-se com um maior risco de desenvolvimento de neoplasias, incluindo o melanoma^[97-99].

Dentro das vias reparadoras de DNA responsáveis pela manutenção da integridade do genoma das células, salientam-se três processos principais: (i) via de reparação por excisão de nucleótidos (NER – *nucleotide excision repair*), (ii) via de reparação por excisão de bases (BER – *base excision repair*) e (iii) via de reparação de erros de emparelhamento (MMR – *mammalian mismatch repair*).

A via de excisão e reparação de nucleótidos compreende uma sequência de eventos que resultam na identificação e reparação dos defeitos do DNA induzidos principalmente pela radiação UV. Neste processo intervêm de forma preponderante diversas endonucleases que, quando mutadas em homozigotia, são a causa do *xeroderma pigmentosum*^[99].

Esta via reparadora tanto pode aplicar-se aos 99% de DNA não envolvido na transcrição genética (reparação global do genoma) como às cadeias codificadoras de genes activos, que correspondem a cerca de 1% do DNA (reparação acoplada à transcrição)^[99]. Esta última via, dando prioridade à reparação da sequência danificada do DNA de genes que estão em actividade, evita a produção de transcritos anormais, potencialmente lesivos para a estrutura ou função da célula.

Sete endonucleases distintas participam sequencialmente no processo de reparação. O *xeroderma pigmentosum* é uma genodermatose autossómica recessiva cuja etiopatogenia decorre do défice ou disfunção de uma destas enzimas^[99].

As mutações do DNA induzidas pela radiação UV são reconhecidas pelas proteínas XPC e XPE (DDB2), que demonstram afinidade pelos dímeros de pirimidina e pelos fotoprodutos (6-4)-pirimidina-pirimidona, ligando-se ao DNA lesado e marcando-o para a intervenção de outras proteínas reparadoras^[99]. A interacção de XPC com as sequências danificadas do DNA é realizada através de um complexo formado com a proteína HR23B. Este complexo XPC-HR23B actua no início do processo, reconhecendo o defeito e condicionando um desenrolamento local da dupla hélice de DNA. Quando ocorre reparação acoplada à transcrição, porém, o reconhecimento dos defeitos é realizado pelos produtos dos genes CSA e CSB, capazes de bloquear a actividade da RNA-polimerase II.

As proteínas XPB (ERCC3) e XPD (ERCC2) são subunidades constituintes do factor de transcrição básico TFIIH. Têm, respectivamente, a função enzimática de helicases 3'-5' e 5'-3', desenrolando amplamente a dupla hélice do DNA na região marcada com o auxílio de XPA, XPG (ERCC5) e RPA (proteína de replicação A)^[99]. O desenrolamento do DNA permite a acção de endonucleases reparadoras: XPF e ERCC1 formam um complexo com actividade de endonuclease 5', enquanto XPG tem, isoladamente, funções de endonuclease 3'. Das clivagens catenares catalisadas por estas enzimas, resulta a excisão de uma sequência de cerca de 30 nucleótidos em redor da lesão do DNA. A síntese da porção de DNA que foi excisada é realizada tendo por base a cadeia complementar restante. Esta reacção de polimerização é catalisada pela DNA polimerase δ (ou ϵ) associada ao PCNA. O último passo desta via consiste na intervenção da DNA ligase, responsável pela ligação definitiva da sequência nucleotídica reparada à restante molécula de DNA.

A disfunção da via de reparação por excisão de nucleótidos relaciona-se claramente com o cancro cutâneo, na medida em que os doentes com *xeroderma pigmentosum* têm uma incidência de carcinomas epiteliais 10.000 vezes superior à da população geral, sendo este aumento de 1000 vezes no que diz respeito ao melanoma. A idade média destes doentes no momento do

diagnóstico do primeiro carcinoma epitelial (carcinomas espinhocelular ou basocelular) é de 9 anos, sendo mais tardia (22 anos) para o primeiro melanoma. Do ponto de vista topográfico, realça-se igualmente que a distribuição do cancro cutâneo não-melanoma nos indivíduos afectados por *xeroderma pigmentosum* corresponde à esperada para a população geral, com 80% dos casos na cabeça e pescoço, enquanto essa correspondência não se verifica no melanoma (em que mais de 45% dos casos ocorrem nas extremidades)^[99]. Estes factos apontam para um papel mais marcado da radiação UV na génese dos carcinomas epiteliais do que na génese do melanoma neste contexto particular.

A via de reparação por excisão de nucleótidos parece ser relevante não só na oncogénese, mas também na progressão do melanoma. Um estudo recentemente realizado num universo de 1.042 doentes com melanoma^[100] demonstrou que determinados polimorfismos de genes codificadores de proteínas desta via (particularmente XPE rs28720291, ERCC5 rs4150314, XPC rs2470458 e ERCC2 rs50871) modulam negativamente o prognóstico de uma forma independente e que o risco de morte por melanoma aumenta proporcionalmente ao número de genótipos desfavoráveis coexistentes.

A via de reparação por excisão de bases é um outro mecanismo reparador cuja principal função é a de restaurar os defeitos do DNA que ocorrem durante o ciclo celular^[101], nomeadamente a oxidação, a redução ou a metilação de bases^[102]. O reconhecimento dos erros é realizado por uma DNA glicosilase capaz de excisar a base alterada por hidrólise da ligação N-glicosídica que a une ao esqueleto de desoxirribose-fosfato da molécula de ácido nucleico. Gera-se, assim, um sítio abásico (apurínico ou apirimidínico), denominado sítio AP. A ligação fosfodiéster da posição 5' do sítio AP é, então, clivada através da acção da enzima APE1 (AP-endonuclease 1), originando uma quebra na cadeia onde residia a base defeituosa. A DNA polimerase β é responsável pela remoção do resíduo de desoxirribose-fosfato da extremidade 5' desta zona de quebra e pela adição de um novo nucleótido na extremidade 3'. Finalmente, a continuidade da cadeia é restabelecida por um complexo formado pela DNA ligase III α e pela proteína XRCC1. Este “ramo curto” da via de reparação por excisão de bases pode ser desviado para o “ramo longo”, no caso do resíduo de desoxirribose-fosfato do sítio AP ser resistente à clivagem pela DNA polimerase β . Nessa situação, é a DNA polimerase δ (ou ϵ) que intervém, adicionando 2 a 8 nucleótidos à zona de quebra. Este “retalho” nucleotídico é removido pela enzima FEN-1 numa reacção dependente de PCNA. A continuidade da cadeia é restaurada pela DNA ligase I^[101].

Existe a suspeita actual, embora sem suporte científico sólido em virtude da existência de estudos contraditórios, de que algumas variantes genéticas de genes codificadores de

proteínas influentes nesta via podem conferir um maior risco de melanoma. Porém, apenas dois polimorfismos de nucleótido único não sinónimos no gene XRCC1 (rs25487 and rs25489) puderam ser consistentemente relacionados com o risco de melanoma^[98].

A via de reparação de erros de emparelhamento do DNA tem a função primordial de identificar e corrigir alterações genéticas decorrentes da replicação de DNA. A maioria destas alterações são detectadas e corrigidas pela própria DNA polimerase. Porém, esta acção reparadora tem limitações e é provável que subsistam algumas bases desemparelhadas ou ansas de inserção-delecção^[102]. Estes erros persistentes na sequência de DNA são reconhecidos por dois complexos heterodiméricos de proteínas homólogas de Mut S: MSH2/GTBP (Mut S α) e MSH2/MSH3 (Mut S β). Um outro heterodímero constituído por proteínas homólogas de Mut L (MLH1/hPMS2) liga-se quer a Mut S α , quer a Mut S β , auxiliando a subsequente reparação. O PCNA parece ter, neste ponto, o papel de factor discriminador da cadeia de DNA onde reside o defeito, permitindo à DNA exonuclease e helicase desenrolar e degradar os nucleótidos errados. O PCNA, mantendo-se ligado à extremidade da sequência errada, recruta finalmente a DNA polimerase para repor os nucleótidos em falta. Esta via diminui a taxa de mutações durante a replicação do DNA entre 100 e 1000 vezes, o que a torna bastante importante na protecção contra a transformação neoplásica^[102].

Desconhece-se, porém, qual o papel exacto das proteínas desta via reparadora de DNA no desenvolvimento de carcinomas epiteliais e de melanoma. O facto do gene que codifica a proteína hMSH2 ser um alvo da proteína p53 e de ser induzível por radiação UV deixa antever uma possível participação na oncogénese do melanoma^[103].

2.1.10. Apoptose

A apoptose é um fenómeno fisiológico de selecção natural à escala celular, cujo principal papel é a eliminação de células desnecessárias ou potencialmente nocivas, como aquelas infectadas por vírus ou geneticamente alteradas pela acção de agentes mutagénicos. A apoptose intervém em processos biológicos tão variados como a embriogénese, a renovação de células epiteliais e hematopoiéticas, a involução cíclica dos órgãos reprodutivos da mulher, a atrofia induzida pela remoção de factores de crescimento ou hormonas, a regulação da resposta imunitária e a citotoxicidade mediada por células^[104].

Seja induzida por estímulos imunológicos ou por outros factores, a apoptose também parece ser um importante mecanismo de eliminação de células em transformação neoplásica. A perturbação da apoptose é, portanto, um dos processos envolvidos na oncogénese^[105], concorrendo para ela através de vários proto-oncogenes e genes onco-supressores que codificam proteínas que intervêm neste fenómeno biológico.

A apoptose, também denominada *morte celular programada*, distingue-se da necrose^[104], na medida em que a célula não sofre edema intracelular, o conteúdo celular não é libertado para o interstício (não há inflamação) e ocorre na dependência de consumo energético sob a forma de ATP. Do ponto de vista citológico, verifica-se uma fragmentação nuclear e celular, resultando na formação de vesículas apoptóticas que serão reconhecidas e fagocitadas pelos macrófagos, num processo que dura em média cerca de 3 horas.

A apoptose é o resultado da activação em cascata de um grupo de proteínas denominadas caspases^[106], que consistem em enzimas proteolíticas que clivam diversas proteínas na posição subsequente a um resíduo de ácido aspártico. São sintetizadas como precursores inactivos (pró-caspases) e a sua activação é realizada por clivagem proteolítica. A activação ocorre de forma hierárquica, podendo umas caspases clivar e activar outras em sequência^[105,106] (Fig. 7). Esta hierarquia, bem como o tipo de caspases envolvidas, difere segundo o modo de indução da apoptose. De qualquer forma, há um grupo de caspases iniciadoras que são activadas em primeiro lugar (caspases 2, 8, 9 e 10). Existem, ainda, caspases efectoras, activadas pelas primeiras e responsáveis pela clivagem e degradação de outras proteínas celulares (caspases 3, 6 e 7).

O resultado final da cascata das caspases é a digestão de proteínas estruturais do citoplasma e a degradação do DNA cromossómico^[104,105]. A caspase 3 é capaz de degradar a gelsolina, uma proteína ligada ao citoesqueleto de actina, levando à desagregação deste e à perda da forma da célula^[106]. Por outro lado, é responsável pela clivagem da proteína ICAD (inibidor da DNase activada por caspases)^[104], libertando a endonuclease CAD (uma DNase), que migrará para o núcleo e catalisará a fragmentação internucleossómica do DNA em blocos de cerca de 200 pares de bases. É este fenómeno que explica um típico padrão “em escada”, com múltiplas bandas sucessivas (cuja espessura depende do tamanho do fragmento de DNA), obtido após electroforese em gel de agarose do DNA proveniente de células apoptóticas^[107].

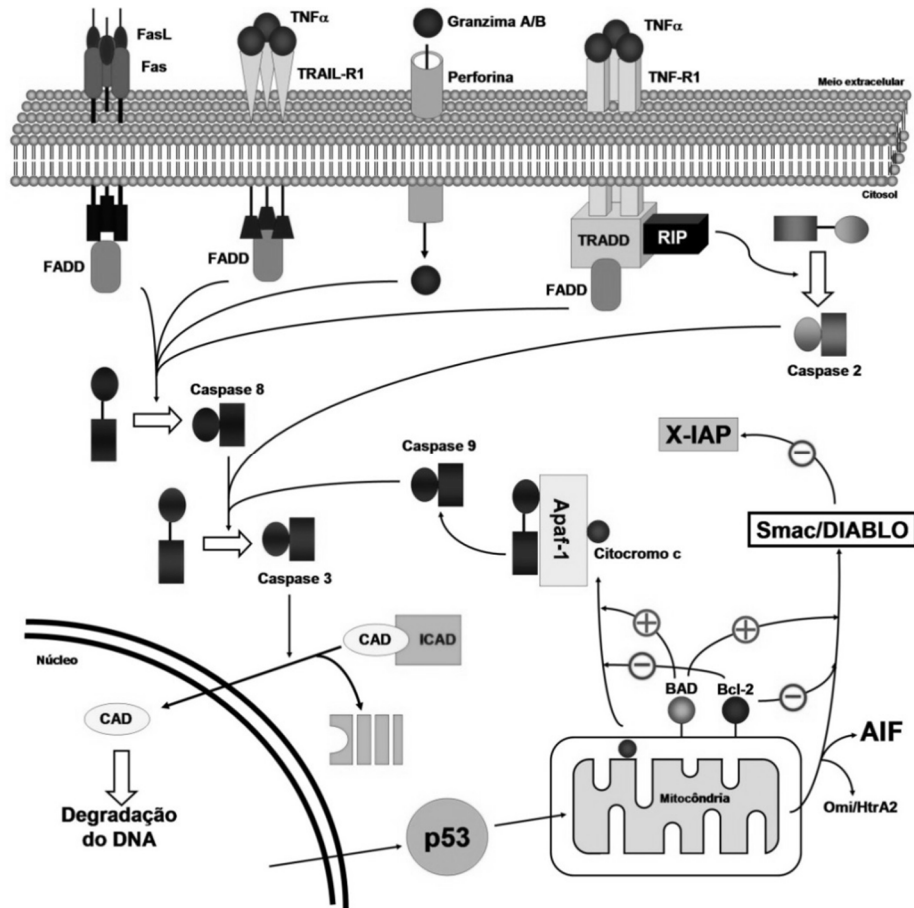


Figura 7. Apoptose.

Até à data foram identificados 14 tipos de caspases^[106]. No entanto, as caspases 1, 4, 5, 11, 12, 13 e 14 não se relacionam com a apoptose, mas sim com a resposta inflamatória, ao contribuírem para o processamento de algumas citocinas pró-inflamatórias^[106,108].

Para que se inicie a cascata das caspases é imprescindível a actuação de determinados deflagradores. Consoante a forma de deflagração, a activação sequencial das caspases pode decorrer segundo 2 vias^[105,109] (Fig. 7):

(i) A via extrínseca é deflagrada pela actuação directa de certas moléculas sobre a membrana celular. É o caso da proteína transmembranar Fas (CD95)^[110], dos receptores do TNF α (TNF-R1, TRAIL-R1 e TRAIL-R2)^[111] e das enzimas dos grânulos líticos dos linfócitos T citotóxicos (perforina, granzima A e granzima B)^[104]. O evento inicial comum a esta via é a activação da caspase 8 que, por sua vez, desencadeará a activação das caspases efectoras (caspases 3, 6 e 9)^[104,105]. Há, no entanto, algumas particularidades a referir em relação à apoptose induzida pela ligação do Fas-ligando e do TNF α aos seus receptores específicos. Após a ligação do ligando ao receptor (Fas-ligando ou TNF α), dá-se o

recrutamento de uma molécula adaptadora e, sucessivamente, a complexação e a activação da pró-caspase 8^[104]. A proteína FADD funciona como molécula adaptadora universalmente utilizada por estes receptores^[110]. No entanto, o TNF-R1 interage com a FADD através de outra proteína intermediária, a TRADD^[111]. Além disso, a FADD e a TRADD, com a cooperação da proteína RIP, são capazes de originar uma via alternativa de activação da cascata das caspases, ao activar a pró-caspase 2 (Fig. 7).

(ii) A via intrínseca é, ao invés, o resultado da perturbação da homeostase mitocondrial, ocorrendo, por exemplo, em consequência da privação de factores de crescimento^[105]. O evento deflagrador é a libertação de citocromo c mitocondrial para o citosol^[105,109]. O citocromo c, associado à proteína Apaf-1 e à pró-caspase 9 formam o complexo apoptossómico^[112], resultando na libertação da caspase 9, responsável pela prossecução da cascata (activação das caspases 3, 6 e 7)^[103,108]. A regulação desta via tem o seu ponto de controlo na libertação do citocromo c, processo onde intervêm diversas proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas da família Bcl-2.

A família Bcl-2 compreende uma multiplicidade de moléculas reguladoras. A proteína anti-apoptótica Bcl-2 foi a primeira a ser identificada. É codificada por um gene em 18q21 e foi descoberta em células de linfoma B folicular portadoras da translocação t(14;18)^[113]. Para além da Bcl-2, as proteínas Bcl-w, Bcl-X_L, Mcl-1 e A1 são outros membros anti-apoptóticos desta família. Como membros pró-apoptóticos, consideram-se as proteínas Bax, Bak, Bad, Bik, Bid, Bok, Bim, Bod, Bmf, Hrk, Nix, Noxa, PUMA e Bcl-X_S^[114].

A maioria dos membros da família Bcl-2 possui uma extremidade C-terminal hidrofóbica que lhes permite unir-se às membranas de distintos organelos, principalmente à membrana externa da mitocôndria e, acessoriamente, à membrana do retículo endoplasmático e do envelope nuclear^[114]. Somente as proteínas Bad e Bid não estão providas desta sequência hidrofóbica, permanecendo livres no citosol^[115]. Todos os membros da família possuem, ainda, diferentes combinações de 4 domínios conhecidos como BH1, BH2, BH3 e BH4^[113,114]. Cada uma das moléculas pode ter um ou mais destes domínios, responsáveis pela formação de homo ou heterodímeros entre os elementos da família. Perante as diferentes distribuições destes domínios, as proteínas Bcl-2 foram classificadas em 3 grupos^[114,115]:

- Grupo I: proteínas anti-apoptóticas portadoras dos domínios BH1, BH2, BH3 e BH4 (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 e A1).
- Grupo II: proteínas pró-apoptóticas portadoras dos domínios BH1, BH2 e BH3 (Bax, Bak e Bok).

- Grupo III: proteínas pró-apoptóticas portadoras apenas do domínio BH3 (Bik, Bid, Bad, Hrk, Bim, Bod, Bmf, Nix, Noxa e PUMA). Bcl-X_s habitualmente inclui-se neste grupo, embora seja também integrada pelo domínio BH4.

O mecanismo de acção destas proteínas não se encontra completamente elucidado. Supõe-se que sejam translocadas para a membrana mitocondrial quando se inicia um estímulo apoptótico^[113]. Esta mobilização parece depender da formação de complexos homo ou heterodiméricos entre os diferentes membros que, por sua vez, ocorre em consequência da fosforilação de sítios críticos da molécula (por exemplo, a proteína Bad é activada por fosforilação do domínio BH3 nas posições Ser112 e Ser136). Diversas cinases podem catalisar esta fosforilação, entre as quais a proteína Akt3^[74].

A dimerização das proteínas da família Bcl-2 pode induzir efeitos pró ou anti-apoptóticos. Assim, o homodímero Bcl-2/Bcl-2 correlaciona-se com a inibição da apoptose, enquanto o homodímero Bax/Bax e os heterodímeros Bax/Bcl-2 e Bad/Bcl-XL são pró-apoptóticos^[113]. Heterodímeros em que participem proteínas com apenas um domínio BH3 são igualmente pró-apoptóticos^[114].

As diferentes funções biológicas atribuídas a estas proteínas explicam esta duplicidade de actuação: (i) dos dímeros pró-apoptóticos depende o controlo da libertação de citocromo c, da proteína AIF (factor indutor da apoptose), de Smac/DIABLO e de Omi/HtrA2 a partir do espaço intermembranar da mitocôndria^[116]. O citocromo c, juntamente com a proteína Apaf-1 e com a pró-caspase 9, é parte integrante de um complexo denominado apoptossoma^[117], fundamental para a activação da pró-caspase 9. Smac/DIABLO e Omi/HtrA2 são neutralizadores do efeito inibidor que a proteína XIAP (inibidor da apoptose ligado ao X) exhibe sobre as caspases^[118]. A proteína AIF também tem efeitos pró-apoptóticos^[114], embora o seu mecanismo de acção continue por esclarecer; (ii) alguns dímeros anti-apoptóticos são responsáveis pelo sequestro de Apaf-1, um constituinte do apoptossoma^[113]; (iii) alguns dímeros anti-apoptóticos formam megacanaís iónicos entre a membrana interna e a membrana externa da mitocôndria, anulando a força motriz protónica ou potencial eléctrico transmembranar, fundamental para a produção energética celular^[113].

Fica, assim, clarificada a acção anti-apoptótica inerente à activação de certas vias de sinalização celular, como a via das cinases MAPK^[119] e a via da PI3K/AKT^[75]. Conforme já referido, a proteína Bad é um substrato das cinases Raf-1 e Akt3. Da sua fosforilação resulta a sua inactivação. A cinase Akt3 é, ainda, responsável pela fosforilação da pró-caspase 9^[120],

impedindo a sua clivagem proteolítica mediada pelo complexo apoptossómico (Apaf-1 e citocromo c).

A sobre-expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 parece ser relativamente comum em células de melanoma, estando relacionada com a progressão para doença metastática^[121]. O bloqueio farmacológico de Bcl-2 parece ser, portanto, uma possível arma no tratamento do melanoma. Porém, um ensaio clínico de fase III que incluiu 771 doentes com melanoma em estágio IV randomizados em dois grupos, um que recebeu apenas dacarbazina e outro que recebeu dacarbazina associada ao oblimersen (sequência oligonucleotídica *antisense* que bloqueia o codão de iniciação do mRNA da Bcl-2) não demonstrou diferença significativa na sobrevivência global entre os dois grupos, embora a taxa de resposta tenha sido ligeiramente superior no grupo que foi submetido ao oblimersen (11,7% *versus* 6,8%). Encontram-se actualmente em estudo outros inibidores da proteína Bcl-2 (ABT-737, TW-37 e obatoclax) no tratamento do melanoma avançado^[121].

Existem outras proteínas com função reguladora na apoptose. As proteínas da família IAP (XIAP, cIAP1, c-IAP2, NAIP, ML-IAP e survivina)^[114] são um grupo de importantes inibidores da apoptose. Como já ficou expresso, XIAP é um potente inibidor da actividade proteásica das caspases. As proteínas cIAP1 e cIAP2, por outro lado, funcionam como ubiquitina-ligases para a proteína pró-apoptótica Smac/DIABLO, levando à sua destruição selectiva^[122].

A proteína p53 é provavelmente a proteína pró-apoptótica mais amplamente estudada^[123], sendo codificada por um gene onco-supressor (TP53) localizado no cromossoma 17p13.1^[124]. Trata-se de um factor de transcrição que, em resposta à detecção de danos no genoma (resultantes da acção da radiação UV ou de outros mutagénios), tem a capacidade de induzir determinados genes responsáveis pela apoptose e pelo bloqueio do ciclo celular. Quando os danos são mínimos e recuperáveis, a p53 bloqueia o ciclo celular e estimula a expressão da maquinaria enzimática reparadora. No caso dos danos serem extensos e irreparáveis, a proteína deflagra a cascata apoptótica^[125]. É um efeito de natureza selectiva, “altruísta”, condicionando um sacrifício da célula em prol do organismo.

A proteína p53 pertence a uma família de factores de transcrição que inclui dois outros membros: as proteínas p63 e p73. Todos os membros da família têm uma homologia estrutural superior a 60% no domínio de ligação ao DNA (ver adiante) e todos se comportam funcionalmente como factores de transcrição^[126].

A proteína p53 é uma metaloproteína formada por 4 monómeros idênticos que contêm 393 aminoácidos e um átomo de zinco. Os monómeros subdividem-se em 6 domínios funcionalmente distintos^[125]:

- Domínio de activação da transcrição N-terminal (TAD, *transcriptional activation domain*) (resíduos 1 a 62), que inclui o domínio ácido de activação 1 (AD1, resíduos 1 a 42) e o domínio ácido de activação 2 (AD2, resíduos 43 a 62), cuja função é a regulação da apoptose.
- Domínio rico em prolina (resíduos 63 a 97), fundamental para a actividade apoptótica da proteína.
- Domínio de ligação ao DNA (DBD, *DNA binding domain*) (resíduos 102 a 292), que é responsável pela interacção com o DNA e reconhecimento de mutações.
- Domínio de sinalização da localização nuclear (resíduos 316-325), responsável pela localização intranuclear da proteína.
- Domínio de oligomerização (resíduos 326 a 356), responsável pela formação de homotetrâmeros, estrutura essencial à actividade da proteína.
- Domínio regulador intrinsecamente desordenado C-terminal (CTD) (resíduos 363 a 393), responsável pela regulação da ligação da proteína ao DNA.

A actividade da p53 influencia diversos fenómenos biológicos à escala celular, como a transcrição genética, a síntese e reparação do DNA, o ciclo celular, a apoptose e a senescência^[123,126]. Para intervir a estes níveis, a p53 liga-se à região promotora dos seus genes alvo, que consistem em genes codificadores de proteínas intervenientes nos processos celulares referidos. São inúmeros os genes actualmente reconhecidos como alvos da p53, incluindo reguladores do ciclo celular (p21CIP1, ciclina E e TGFβ), reguladores da apoptose (Bax, PIG-3, Bak, Noxa, PUMA, IAP, Fas)^[112] e enzimas reparadoras do DNA (BTG2 e DDB2)^[126,127].

As funções mais relevantes da p53 resumem-se, no entanto, ao bloqueio do ciclo celular em G1 (determinado pelo aumento da expressão de p21CIP1) e na indução da apoptose (determinada pelo aumento da expressão de Bax, Bak e PIG-3)^[126].

A função pró-apoptótica da p53 é potenciada por duas proteínas conhecidas respectivamente por ASPP1 e ASPP2^[126]. As ASPP1 e ASPP2 têm afinidade pelo domínio ligador de DNA da p53 e aumentam a avidéz desta pelos promotores dos genes pró-apoptóticos. Recentemente, verificou-se que as proteínas ASPP1 e ASPP2 podem induzir a

apoptose de uma forma independente da p53. Presume-se que esta acção seja realizada por intermédio da p63 ou da p73.

A actividade da p53 pode ser regulada negativamente por uma proteína inibidora, a IASPP^[126], e pelas proteínas Mdm2 e MdmX, responsáveis pela selectividade da p53 pelas sequências de DNA dos genes alvo, fazendo-o directa ou indirectamente (afectando a estabilidade do RNAm da p53 ou diminuindo a expressão de outros factores de transcrição, como a p73)^[128].

A p53, pelas propriedades fisiológicas que lhe conferiram a denominação corrente de *guardião do genoma*, tem uma importância fulcral na carcinogénese humana^[125]. Estima-se que mutações inactivadoras neste *locus* ocorram em cerca de 35 a 40% de todas as neoplasias humanas^[126], subindo esta percentagem para cerca de 50% em relação às neoplasias cutâneas, em que predominam mutações com a assinatura molecular da radiação UV. Contudo, parece ser um evento pouco comum no melanoma (cerca de 10%)^[129], à excepção dos casos que ocorrem no contexto do *xeroderma pigmentosum* (60% deles com variantes mutadas da p53, maioritariamente por efeito mutagénico da radiação UV). Curiosamente, o alelo p53 mutante, ainda que em heterozigotia, exibe geralmente um efeito inibitório (dominante-negativo) sobre a variante nativa, conduzindo, na prática, à perda de heterozigotia, ainda que apenas de um ponto de vista funcional^[130].

Apesar da baixa frequência de mutações de p53 no melanoma, a disfunção desta proteína parece ser relativamente comum, ainda que na ausência de mutações. Este facto pode explicar-se pela hiperactividade de Mdm2, que pode ocorrer na sequência de perda de função de p14ARF (por mutação de CDKN2A, geralmente em melanomas familiares) ou por amplificações da região 12q13-15, que incluem os oncogenes CDK4 e MDM2^[131].

A p63 e a p73 partilham muitas semelhanças estruturais com a p53, sendo igualmente homotetrâmeros com domínios funcionais idênticos. No entanto, estas duas proteínas, que são filogeneticamente mais antigas, possuem uma extensa região C-terminal que não existe na p53^[132]. A p63 possui, ainda, um domínio SAM (*sterile alpha motif*), ausente na homóloga p53, consistindo funcionalmente num domínio de interacção com outras proteínas, relacionado com a embriogénese, a apoptose, a transactivação de diversos genes, a adesão celular, a remodelação da cromatina, a sinalização através de receptores do tipo tirosina-cinase e processos de SUMOilação^[133]. Todas as proteínas desta família possuem isoformas, em virtude do processamento alternativo (*splicing*) dos exões C-terminais. No entanto, ao contrário do gene TP53, que possui apenas um único promotor, os genes TP63 e TP73 possuem dois promotores distintos. Através da utilização diferencial destes promotores e da

ocorrência de *splicing* alternativo, o gene TP63 pode codificar diferentes isoformas da proteína: isoformas com domínio TAD (TAp63 e TAp73, respectivamente) e isoformas sem este domínio (Δ Np63 e Δ Np73, respectivamente). As isoformas Δ Np63 e Δ Np73 exibem actividade dominante-negativa e são reguladores funcionais de TP53, TP63 e TP73^[132]. Em relação à p63, as isoformas TAp63 e Δ Np63 parecem ser importantes no desenvolvimento embrionário, sendo provável a sua implicação na diferenciação epitelial e na oncogénese^[134]. Apesar disso, modelos murinos demonstraram que a actividade destas proteínas, maioritariamente centrada no desenvolvimento embrionário^[135], parece ser menos relevante na regulação da homeostasia celular em tecidos adultos do que a sua congénere p53. A diferença funcional das isoformas sumariza-se do seguinte modo: enquanto as variantes da isoforma TAp63 activam ou reprimem genes alvo e conduzem à detenção do ciclo celular e à apoptose, as variantes da isoforma Δ Np63 exercem actividade dominante-negativa sobre a p53, promovendo a proliferação e bloqueando a apoptose. Isto significa que o gene TP63, em oposição ao gene onco-supressor TP53, pode actuar como oncogene, baseado na actividade da isoforma Δ Np63, a mais abundante nas camadas basais proliferativas dos tecidos epiteliais^[136].

Recentemente, tem sido descrita a sobre-expressão de TP63 em melanomas, em contraste evidente com a ausência de expressão desta proteína nos melanócitos normais. A acumulação desta proteína associa-se a um agravamento do prognóstico (aumento do risco de morte relacionada com o melanoma) e, adicionalmente, parece conferir quimio-resistência às células tumorais^[137]. A expressão de p63 demonstrável por imunocitoquímica em células de melanoma, é, no entanto, bastante inferior à observada em relação à p53^[138].

As mutações inactivadoras de TP63 não se correlacionam com risco de melanoma nem com a progressão desta neoplasia, mas, quando presentes nas células germinativas, podem provocar, de acordo com a mutação verificada, diferentes displasias ectodérmicas^[138].

2.1.11. Outros genes

A exploração do genoma das células de melanoma através de modernas técnicas de sequenciação levou à identificação de genes cujo papel na oncogénese do melanoma era desconhecido^[29]. A função destes genes e, particularmente, a possibilidade de se tornarem alvos terapêuticos ou de servirem de indicadores de prognóstico e da resposta aos tratamentos estão a ser amplamente avaliados. Salientam-se, entre estes trabalhos, a

sequenciação genómica realizada por Pleasance *et al.* numa linha celular de melanoma^[31] (com identificação de substituições somáticas mononucleotídicas ou dinucleotídicas, de mutações *missense*, de amplificações, de inserções, de deleções e de perdas de heterozigotia), a sequenciação genómica realizada por Berger *et al.*^[139] (que detectou múltiplas substituições de bases, com uma taxa mutacional que variou de 30/Mb nos melanomas das áreas foto-expostas a 3-14/Mb nos acromelanomas) e as sequenciações do exoma de células de melanoma realizadas por Wei *et al.*^[140] (sequenciação de cerca de 20.000 genes ao longo de 37 Mb de exões e suas regiões vizinhas, observando mutações com carácter patológico nalguns genes que nunca tinham sido relacionados com neoplasias) e por Krauthammer *et al.*^[138] (que também revelou uma maior frequência de mutações somáticas em melanomas de áreas fotoexpostas do que em acromelanomas). Todos estes trabalhos demonstraram que a maioria das mutações encontradas foram transições C>T, com particular foco na base 3' de uma sequência dipirimidínica, apoiando o papel mutagénico da radiação UV na patogenia do melanoma^[31,139-141].

A mutação do gene PREX2 está entre as mutações mais prevalentes (14% das amostras estudadas) encontradas por Berger *et al.*^[139], depois de BRAF e de NRAS. Este gene codifica um factor de troca Rac dependente de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, responsável pela activação da proteína G Rac2, ao trocar o GDP a ela ligado por GTP livre. O seu papel na oncogénese poderá estar relacionado com o incremento de sinalização através de Rac2 e com a interacção inibitória que exerce sobre a fosfatase PTEN.

O gene TRRAP mutado, não sendo o mais frequente nas amostras de melanoma estudadas por Wei *et al.*^[140] (apenas presente em cerca de 4% dos casos), apresentou de forma consistente a mutação pontual S722F, correspondente a uma transição C>T. Este gene codifica uma histona-desacetilase, cujas funções são exercidas através de um complexo multiproteico co-activador que modula a actividade dos factores de transcrição p53, c-Myc e E2F1.

Foram descritas 34 mutações somáticas distintas em GRIN2A em 33% das amostras sequenciadas por Wei *et al.*^[140], facto que nunca tinha sido previamente relatado em nenhum tipo de neoplasia. Este gene, localizado em 16p13.2 codifica a subunidade ϵ -1 de um complexo heteropentamérico que funciona como receptor de glutamato, o que levanta a possibilidade da via de sinalização do glutamato participar na transformação neoplásica, muito para além do bem reconhecido papel na excitação pós-sináptica das células neuronais. O glutamato activa dois tipos de receptores: os receptores ionotrópicos (iGluRs) e os receptores metabotrópicos. Os iGluRs são canais iónicos que permitem o fluxo

transmembranar de Na^+ , K^+ e, às vezes, de Ca^{2+} . Reconhecem-se 3 subtipos de iGluRs, de acordo com determinados agonistas específicos: receptores AMPA (estimulado pelo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico), receptores kainato (estimulado por um ácido natural extraído da alga *Digenea simplex*) e receptores NMDA (estimulados pelo ácido N-metil-(D)-aspártico)^[142]. O receptor GRIN2A é precisamente um iGluR do tipo NMDA^[140], que permite a entrada de Ca^{2+} na célula, um processo dependente da ligação de glutamato e que activa diversas cascatas sinalizadoras que intervêm na regulação da expressão genética^[143].

A potencial importância da via de sinalização do glutamato na oncogénese do melanoma é, ainda, apoiada pela observação de mutações de genes que codificam proteínas envolvidas na regulação dos receptores NMDA (como o gene do receptor ERBB4 e o gene NRG1, que codifica o seu ligando) ou proteínas envolvidas na transdução de sinais mediada por mGluRs (PLCB4 e GRM3)^[140].

A mutação pontual activadora P29S de RAC1 (uma transição C>T na base 3' de uma sequência dipirimidínica) foi encontrada em 9,2% das amostras de melanoma de áreas fotoexpostas^[141]. Estas mutações parecem ser biologicamente relevantes, na medida em que a proteína RAC1 pertence à família Rho (pequenas GTPases que controlam a proliferação celular, a reorganização do citoesqueleto e a migração celular). As funções de RAC1 são exercidas através da sinalização por uma cadeia de cinases efectoras. Quer RAC1 quer as suas proteínas efectoras são potenciais alvos terapêuticos no melanoma.

Duas mutações recorrentes no gene PPP6C (H92Y e R301C) foram encontradas em 12,4% dos melanomas das áreas fotoexpostas^[141]. Realça-se que qualquer destas mutações ocorreu sempre em concomitância com mutações de BRAF ou de NRAS.

Diversas mutações em genes que codificam receptores Eph foram previamente descritas no melanoma (EPHA6, EPHA10, EPHB1 e EPHB6)^[144]. Estes receptores são tirosina-cinases capazes de transduzir sinais através das cascatas da PI3K/AKT e das cinases MAPK. O receptor EphA2 é aquele que, dentro desta família de proteínas, tem sido mais estudado no contexto da carcinogénese. Apesar de mutações no gene que o codifica (EPHA2) serem excepcionais no melanoma, a influência deste receptor na sobrevivência das células tumorais e na sua migração parece não ser desprezável, não obstante alguns aspectos das suas funções na célula tumoral não serem suficientemente claros e, até certo ponto, parecerem paradoxais. Assim, a expressão de EphA2 parece ser essencial para a apoptose mediada pela radiação UV e a sua expressão ectópica nas células tumorais induz apoptose. Porém, o silenciamento de EphA2 num xenotransplante de células tumorais de melanoma levou ao desencadeamento da apoptose, deixando antever um papel deste receptor na sobrevivência celular. Portanto, ainda

não é possível, na actualidade, definir claramente se os genes EPHA e EPHB actuam como oncogenes ou como genes onco-supressores.

Mutações no gene ERBB4, que codifica outro receptor do tipo tirosina-cinase, foram encontradas em 19% dos melanomas (mutações *missense* oncogénicas comprovadas por diversos trabalhos, inclusive pela constatação que o lapatinib, inibidor de ERBB4, induz apoptose das células tumorais que possuem o alelo mutado)^[144]. A importância desta ocorrência na transformação neoplásica é desconhecida, presumindo-se que, em virtude da frequência de mutações de NRAS e de BRAF, activadoras de efectores comuns aos de ERBB4, as mutações deste último possam ser relativamente redundantes.

Alguns polimorfismos do gene do receptor da vitamina D (VDR) foram associados ao melanoma, um deles (SNP rs2189480) associado ao desenvolvimento de um número elevado de nevos melanocíticos, factor de risco reconhecido no melanoma, e outro (SNP rs7975128) com efeito protector em relação ao aparecimento de nevos melanocíticos e ao desenvolvimento de melanoma^[19].

O gene BAP1, localizado em 3p21, codifica a proteína associada a BRCA-1, um membro da subfamília das hidrolases C-terminais, enzimas responsáveis pela remoção da ubiquitina dos seus substratos proteicos. Funciona como um gene onco-supressor e as mutações inactivadoras neste *locus* associam-se a risco aumentado de melanoma cutâneo, melanoma uveal e mesotelioma. Mutações germinativas em BAP1, como Q684* e P147fs*48, foram observadas em contexto familiar, associando-se a uma síndrome de transmissão hereditária autossómica dominante, caracterizada por um risco elevado de nevos melanocíticos atípicos, nevos de Spitz, melanomas cutâneos, melanomas uveais e mesoteliomas malignos^[145].

2.2. Progressão do melanoma

2.2.1. Modelos teóricos de progressão das proliferações melanocíticas

O conceito de progressão tumoral traduz a presunção teórica de que uma neoplasia passa por diversas fases sucessivas desde a transformação maligna até adquirir a capacidade de originar metástases.

Wallace H. Clark definiu em 1984 um modelo de progressão dos tumores melanocíticos em 5 fases^[146], desde o nevo melanocítico benigno ao melanoma metastático, passando

sequencialmente pelo nevo melanocítico displásico, pelo melanoma em fase de crescimento radial e pelo melanoma em fase de crescimento vertical. Esta sequência baseia-se no conceito de que os nevos melanocíticos e os nevos melanocíticos displásicos são precursores do melanoma. Porém, esta hipótese assenta numa premissa falaciosa, uma vez que a maioria dos melanomas (75-80%) surge *de novo*, ou seja, sem qualquer tipo de lesão precursora^[147] e o risco de transformação de um nevo melanocítico adquirido é extremamente reduzido, estimando-se que seja inferior a 0,0005% ao ano (uma probabilidade que ronda 1:200.000)^[148]. Assim, o risco estimado de um indivíduo de 20 anos desenvolver um melanoma a partir de um nevo melanocítico até aos 80 anos de idade é de apenas 0,03% (1:3.164) no sexo masculino e 0,009% (1:10.800) no sexo feminino. Mesmo os nevos melanocíticos displásicos esporádicos comportam um risco relativamente baixo^[149], salvo no contexto da síndrome familiar dos nevos displásicos e melanoma (FAM-M, *familial atypical mole-melanoma syndrome*), em que o risco cumulativo ao longo da vida se aproxima de 100%^[150].

Whiteman *et al.* sugeriram um modelo muito diferente daquele proposto por Clark^[151]. Este modelo baseia-se na iniciação precoce de melanócitos induzida principalmente pela exposição à radiação UV, o que explicaria o risco acrescido de melanoma em indivíduos com história de queimaduras solares na infância ou na adolescência. A partir daí, a génese do melanoma poderá consumir-se segundo duas vias divergentes. Por um lado, nos indivíduos com baixa propensão genética para proliferação melanocítica (baixa carga névica), o aparecimento do melanoma depende da exposição solar cumulativa, ocorrendo mais frequentemente em áreas expostas (como a face), predominando o lêntigo maligno, sem mutação de BRAF e associado a elastose solar e a queratoses actínicas. Por outro lado, em indivíduos com predisposição genética para proliferação melanocítica (revelada fenotipicamente por uma carga névica elevada), os melanomas tendem a ocorrer nas regiões anatómicas em que existem nevos e maior instabilidade dos melanócitos (o tronco, por exemplo), associam-se com frequência à variante mutada de BRAF e não têm relação com sinais de dano actínico crónico.

Um terceiro modelo, mais recente, centra a atenção nas células melanocíticas estaminais como precursoras do melanoma^[152], procurando elucidar, através desta suposição teórica, as questões deixadas em aberto pelos modelos anteriores, nomeadamente os seguintes factos discordantes: a maioria dos melanomas surge em pele normal (contrariamente ao esperado se os nevos melanocíticos corresponderem realmente a etapas precursoras do melanoma), as células névicas invadem com frequência a derme e podem migrar para os gânglios linfáticos (tal como ocorre no melanoma), mas sem que isso conduza à disseminação da doença, a

resposta imunológica inata ou adquirida contra antígenos tumorais não consegue controlar a doença metastática e um tumor com a agressividade do melanoma pode permanecer quiescente e recidivar anos ou décadas depois. Estas questões podem ser respondidas se concebermos que, ao contrário de depender de um melanócito diferenciado, a histogénese do melanoma resulte de mutações cumulativas em oncogenes e genes onco-supressores numa célula estaminal quiescente. Dessa forma, apesar das mutações cumulativas poderem transformar células névicas, originando um melanoma sobre nevo prévio, este passo não seria necessário na maioria dos casos. A partir desse ponto, as vias habituais de diferenciação dos melanócitos levariam as células transformadas a migrarem para a epiderme (fase de crescimento radial), até que factores de crescimento autócrinos ou provenientes do micro-ambiente epidérmico, bem como alterações moleculares resultantes da instabilidade genética das células neoplásicas resultassem na invasão dérmica (fase de crescimento vertical).

As células estaminais tumorais são pouco imunogénicas, são resistentes à agressão por agentes citostáticos e pela radiação ionizante e, além disso, têm uma expressão alterada de moléculas de adesão, o que as torna incapazes de se fixarem nos gânglios linfáticos e as conduz directamente para a corrente sanguínea (um mecanismo hipotético para a disseminação com gânglio sentinela negativo).

A taxa de proliferação das células estaminais é geralmente baixa. Por isso, estas células podem permanecer longos períodos em quiescência, sujeitas à regulação por mecanismos de controlo intrínsecos ou pela resposta imunitária do hospedeiro^[153]. Deste modo, o modelo das células estaminais evoca igualmente uma explicação para o fenómeno de melanoma latente ou de dormência metastática, subjacente às recorrências tardias de melanomas supostamente em remissão.

Este modelo das células estaminais enfrenta a perspectiva reducionista clássica, aceite durante décadas, que defende que as neoplasias são proliferações monoclonais. As células estaminais tumorais expressam frequentemente proteínas de células germinativas (MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, NY-ESO-1 e GAGE)^[154]. Estas proteínas promovem a transdiferenciação de células estaminais tumorais e estimulam a proliferação celular, ao mesmo tempo que induzem a expressão de proteínas próprias do processo de meiose. A coexistência de outras anomalias, como alterações das vias de reparação do DNA e o encurtamento dos telómeros durante as divisões celulares, leva à criação de pontos de fusão entre cromátides irmãs. Durante a divisão celular, a tentativa de separar as cromátides irmãs resulta em quebras e erros de segregação. Este fenómeno, conhecido por meiomitose, é o grande responsável pela instabilidade genética do melanoma e pela diversidade de clones

tumorais que vão surgindo ao longo do tempo^[152]. Em virtude deste facto, Hanahan e Weinberg propuseram um modelo heterotípico^[155], mais de acordo com a biologia das neoplasias, que defende a policlonalidade da população de células tumorais.

2.2.2. Modelos teóricos de disseminação do melanoma

As fases sucessivas de crescimento radial e de crescimento vertical apontadas por Clark caracterizam com clareza a história evolutiva da grande maioria dos melanomas cutâneos primários, excepção feita aos melanomas nodulares (em que a fase radial é praticamente inexistente) e aos melanomas dos tecidos moles. Segundo Calonje *et al.*^[156], os melanomas *in situ*, em que os melanócitos atípicos se distribuem ao longo da epiderme individualmente ou em grupos, estão consistentemente numa fase de crescimento radial. Quando existem alguns melanócitos morfológicamente semelhantes aos encontrados na epiderme aglomerados em pequenos grupos na derme papilar ou, mais raramente, na derme reticular superficial, considera-se uma fase de crescimento radial invasivo, caracterizada por um nível de Clark não superior a II e por uma espessura inferior a 0,76 mm. Se a invasão ultrapassar os critérios referidos, ou quando há dúvidas de classificação, assume-se que a lesão melanocítica em causa está numa fase de crescimento vertical.

A probabilidade de disseminação metastática é virtualmente próxima de 0% durante a fase de crescimento radial, mas aumenta drasticamente com a profundidade de invasão durante a fase de crescimento vertical, facto bem estabelecido desde há mais de 4 décadas^[157] e corroborado pelo prognóstico estimado em cada grau T da classificação TNM da AJCC^[158].

A capacidade invasiva não é, porém, sinónimo de capacidade metastática. Esta última requer, em primeiro lugar, que uma determinada subpopulação de células tumorais adquira características de mobilidade aumentada e secreção de enzimas permeadoras do estroma. De seguida, exige que essas células se libertem da interacção com as células vizinhas e penetrem nos vasos linfáticos ou sanguíneos por um processo de migração transendotelial (intravasão), criando êmbolos tumorais. A sobrevivência dos êmbolos tumorais depende, por sua vez, da sua resistência à turbulência circulatória e ao sistema imunitário. Se lograrem sobreviver, as células tumorais circulantes passam por nova fase de migração transendotelial (extravasão) e poderão implantar-se nos órgãos receptores^[159].

Tejera-Vaquerizo *et al.* constataam que a metastização do melanoma pode ocorrer através de implantes cutâneos por via linfática (satelitose/metástases em trânsito), através da

progressão para os gânglios linfáticos regionais ou através da metastização à distância (sistêmica)^[160], o que evidencia claramente dois modos distintos de disseminação: linfática e hemática. Estes autores admitem quatro vias metastáticas distintas, definidas neste trabalho por A1, A2, B e C (Fig. 8):

- A) Satelitose/metástases em trânsito que progridem directamente para os órgãos distantes sem implantação nos gânglios linfáticos regionais (A1) ou com progressão linfática sequencial para os gânglio linfáticos regionais e daí para órgãos distantes (A2).
- B) Metastização por via linfática para os gânglios linfáticos regionais e daí para os órgãos distantes.
- C) Metastização sistêmica por via hemática, sem participação da via linfática.

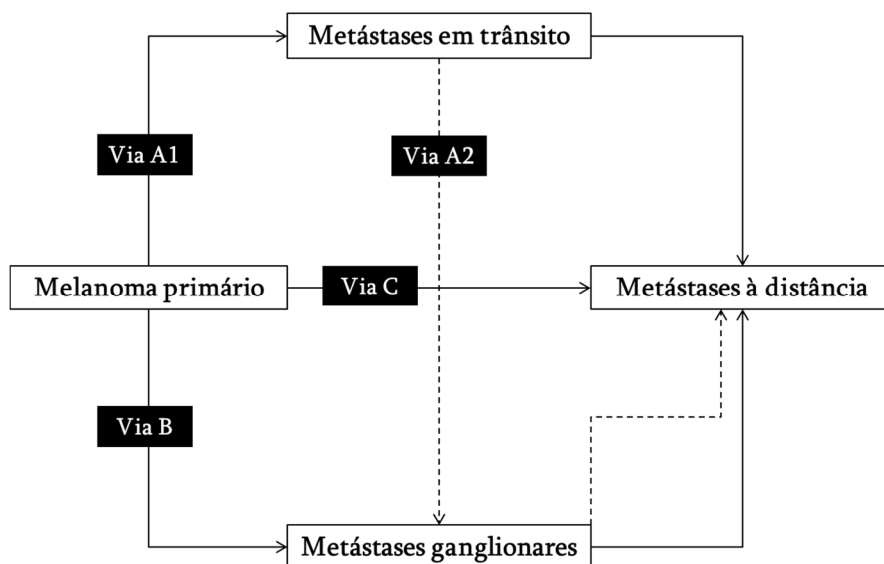


Figura 8. Vias metastáticas no melanoma.

Apesar da definição destas diferentes vias metastáticas, tem-se procurado uma definição de modelos de disseminação suficientemente abrangentes para englobar as tendências que orientam o melanoma na sua progressão.

O primeiro modelo, conhecido por modelo de disseminação sequencial, tem sido defendido principalmente pelos partidários da biopsia selectiva do gânglio sentinela, como Morton^[159]. Este modelo baseia-se na hipótese de que o melanoma se dissemina inicialmente por via linfática regional e só depois progride para metastização à distância. Admite-se a possibilidade do melanoma se disseminar por via hemática, mas, considerando que essa ocorrência é residual, deve ser tomada como uma excepção. Este modelo é designado como

“hipótese da incubadora”, comparando os gânglios linfáticos a incubadoras onde as células de melanoma fazem escala para progredirem sistemicamente^[161].

O segundo modelo é o modelo da disseminação simultânea^[160], particularmente apoiado por críticos da biopsia selectiva do gânglio sentinela, como Ackerman, uma vez que defende a simultaneidade da metastização pelas vias linfática e hemática, de tal modo que a doença ganglionar regional deve ser vista como um marcador de doença sistémica^[161].

Finalmente, o modelo de padrões diferenciais de disseminação sincretiza aspectos das duas hipóteses anteriores^[160]: defende que existem melanomas sem capacidade metastática, melanomas que tendem a metastizar apenas por via linfática, outros que prosseguem da via linfática para a metastização sistémica e outros, ainda, que têm capacidade de metastizar directamente por via hemática.

Esta última teoria baseia-se numa proposta de Paget com mais de 100 anos: um modelo de progressão tumoral muito semelhante, que compara o comportamento metastático com a interacção entre as “sementes” (as células tumorais) e o “solo” (o tecido receptor)^[162]. É a teoria apoiada por um maior número de argumentos, tendo em conta que pode explicar as remissões completas a longo prazo que 30% dos doentes em estágio III experimentam, a incapacidade da linfadenectomia profiláctica ou terapêutica influenciar a sobrevivência global dos doentes e a razão do gânglio sentinela negativo não ser uma garantia de que não haja metastização à distância.

No melanoma, as alterações genéticas subjacentes ao processo oncogénico, à progressão tumoral e à evolução clínica podem ser interligadas através das seguintes questões^[144]: (i) Que alterações genéticas intervêm de um modo crítico na transformação neoplásica e quais delas adquirem importância na disseminação tumoral, ou seja, em que momento e com que ordem se instala cada uma das mutações e quais são absolutamente essenciais para a sobrevivência e proliferação do tumor? (ii) Que alterações moleculares constituem biomarcadores prognósticos e, por isso, alvos terapêuticos?

Com base no que foi exposto em relação aos modelos de progressão e de disseminação do melanoma, procurar-se-á responder a estas questões, recrutando a evidência científica actual.

2.2.3. Avaliação do risco de disseminação tumoral pela biopsia do gânglio sentinela

A biopsia selectiva do gânglio sentinela é utilizada na abordagem dos melanomas cutâneos primários com mais de 1,0 mm de espessura e num subgrupo de melanomas pouco espessos (0,75 mm a 1,0 mm) quando se verificam simultaneamente alguns factores de risco independentes^[163], como a ulceração, a regressão de mais de 75% do volume tumoral e, mais recentemente (7ª. edição da classificação da AJCC), o índice mitótico elevado, definido pela presença de pelo menos uma mitose por mm². A razão subjacente a esta selecção de candidatos prende-se com a magnitude do risco de metastização ganglionar regional. Assim, os doentes com melanomas de espessura inferior a 0,75 mm têm uma probabilidade de 2,7% de metastização nos gânglios linfáticos regionais^[164], um valor razoavelmente baixo, considerando os 20% registados nos candidatos à biopsia do gânglio sentinela^[165]. Esta probabilidade sobe para 30-40% nos doentes com melanomas de espessura superior a 4 mm, havendo algumas séries recentes que apontam frequências próximas a 50% neste grupo^[166-170].

Uma das questões que, desde o dealbar da década de 1990, tem causado intenso debate acerca da biopsia do gânglio sentinela é a aparente falta de valor terapêutico e a incapacidade do procedimento influenciar a sobrevivência dos doentes. Na verdade, o ensaio multicêntrico, randomizado e controlado MSLT-I^[171], que incluiu mais de um milhar de doentes, não demonstrou uma sobrevivência global significativamente maior nos doentes submetidos a biopsia do gânglio sentinela quando comparados com os doentes sujeitos apenas a observação, aos quais apenas era oferecida a linfadenectomia radical no caso de surgirem metástases ganglionares durante o seguimento. No entanto, este ensaio revelou que os doentes com micrometástases ganglionares detectadas na biopsia do gânglio sentinela tiveram uma sobrevivência significativamente maior do que os doentes do grupo de observação com metástases ganglionares clinicamente evidentes. Este achado sugere que a linfadenectomia precoce apresenta vantagens terapêuticas. Assim, a carga tumoral nos gânglios linfáticos demonstra valor prognóstico.

O mérito mais consensual da biopsia do gânglio sentinela é a sua capacidade preditiva da evolução da doença. Em conformidade, o carácter prognóstico das micrometástases ganglionares ficou patente nos resultados do ensaio MSLT-I. Os doentes com metástases no gânglio sentinela tiveram um maior risco de metástases em trânsito (61,5% *versus* 21,1%), de metástases à distância (46,2% *versus* 10,5%) e de morte relacionada com o melanoma (53,8% *versus* 10,5%), comparados com os que tiveram gânglio sentinela negativo. Estes achados conferem uma clara importância prognóstica aos resultados da biopsia do gânglio sentinela.

A ocorrência de falsos negativos, definidos como resultados negativos em doentes que desenvolvem sequencialmente metastização ganglionar, não parece perturbar de forma significativa a acuidade prognóstica do método, tendo ocorrido com uma frequência de apenas 6,3% no ensaio MSLT-I^[165]. A disseminação à distância, sendo mais frequente nos doentes com doença ganglionar, pode também ocorrer independentemente da presença desta, sendo responsável pela maior parte das falhas na predição prognóstica em doentes sem metástases no gânglio sentinela.

Os doentes com melanomas espessos (>4,0 mm), além de terem uma maior taxa de positividade do gânglio sentinela, têm maior tendência para metastização em trânsito e metastização à distância^[164]. Considerando estes factos, e à luz do modelo de disseminação simultânea, o interesse da biopsia do gânglio sentinela em doentes com melanomas espessos (>4,0 mm) revela-se questionável. Não há nenhum ensaio prospectivo, controlado e randomizado realizado neste grupo de doentes de alto risco. No entanto, a maioria dos estudos retrospectivos, incluindo uma meta-análise, apontam para um benefício mantido do procedimento nos tumores espessos, na medida em que mostraram um impacto significativo do estado do gânglio sentinela na sobrevivência livre de doença e na sobrevivência global destes doentes^[172-178]. Há, porém, alguns estudos com resultados contraditórios, ao não conseguirem demonstrar uma maior sobrevivência, ou ao não confirmarem uma maior sobrevivência livre de doença ou uma redução do risco de morte relacionada com o melanoma nos doentes com melanomas espessos e biopsia do gânglio sentinela negativo^[179,180].

Conforme referido anteriormente, a maioria dos insucessos da biopsia do gânglio sentinela deve-se a disseminação hemática independente da via linfática^[181], sendo a magnitude deste factor mais evidente nos doentes com melanomas de espessura elevada.

2.2.4. Eventos precoces na oncogénese

As mutações que conduzem a um ganho funcional de determinados oncogenes, como é o caso de BRAF V600E, parecem ser eventos precoces na génese do melanoma^[182]. No entanto, a ocorrência isolada dessas mutações não é suficiente para induzir transformação oncogénica. A demonstrá-lo está a elevada frequência de mutações BRAF V600E nos nevus melanocíticos (60%), em comparação com 50% dos melanomas^[29]. Também se verifica que a introdução ectópica da variante mutada de BRAF em melanócitos humanos normais conduz

à senescência celular através de um processo independente da p16INK4A e da p53. Este fenómeno de senescência induzida por oncogenes pode ser igualmente mediado por mutações de NRAS, neste caso com intervenção da p53 e da proteína Rb^[182].

A aquisição de outras mutações que permitam à célula ultrapassar a limitação à transformação oncogénica que a senescência induzida por oncogenes impõe é, pois, crucial para a oncogénese do melanoma. As mutações de CDKN2A (p16INK4A/p14ARF), TP53 ou do gene que codifica a β -catenina (levando ao silenciamento de p16INK4A), a par da activação da via da PI3K/AKT ou da inactivação de PTEN parecem ser eventos essenciais neste processo^[182].

2.2.5. Crescimento radial, crescimento vertical e metastização

A transição entre a fase de crescimento radial, a fase de crescimento vertical e a disseminação metastática é um processo ainda pouco compreendido à escala molecular, apesar de se reconhecerem diversas alterações genéticas e epigenéticas que o parecem influenciar, nomeadamente a perda do factor de transcrição AP-2 α , a expressão de receptores membranares acoplados a proteínas G (PAR1, PAFR e o seu ligando PAF), alterações na expressão de moléculas de adesão celular e a activação de CREB, provavelmente o principal regulador da progressão do melanoma^[183].

Alonso *et al.* caracterizaram a expressão de proteínas relacionadas com o ciclo celular, de proteínas reguladoras da apoptose, de factores de transcrição, de receptores membranares, entre outras moléculas diversas, em 175 amostras provenientes de nevos melanocíticos comuns (n=10), melanomas cutâneos primários em fase de crescimento radial (n=28), melanomas cutâneos primários em fase de crescimento vertical (n=66), metástases cutâneas (n=34) e metástases ganglionares (n=37) de melanomas cutâneos^[184]. Tendo em conta a expressão diferencial de diversos produtos proteicos, foi possível delinear um perfil específico de cada fase de progressão do melanoma. Assim, o crescimento radial foi relacionado com a expressão de reguladores do ciclo celular (ciclina A, ciclina D1, CDK1, CDK2, pRb e HDM-2), de survivina (proteína anti-apoptótica da família IAP), do factor de transcrição STAT-1, do receptor c-Kit e da topoisomerase II. A passagem para uma fase de crescimento vertical relacionou-se com a expressão de survivina, do marcador de proliferação Ki-67 e do factor de transcrição PKCB. Um perfil caracterizado pela expressão das ciclinas

D1 e D3 e pela perda da expressão de p16INK4A, da proteína Bcl-2 e de MUM1, relacionou-se com a fase metastática do melanoma.

Schramm *et al.*^[185] compilaram diversos trabalhos realizados ao longo da última década, tendo o propósito de definir assinaturas de expressão genética ao analisar simultaneamente um conjunto determinado de genes através de *microarrays* de expressão genética (GEMA, *gene expression microarrays*). O objectivo principal desses trabalhos foi a identificação de biomarcadores preditivos da progressão e disseminação tumoral, e conseqüentemente da sobrevivência a longo prazo dos doentes de melanoma. Em regra, estes estudos conseguiram correlacionar determinados padrões de expressão genética (assinaturas) com a evolução clínica de diferentes grupos de doentes. Os marcadores de progressão foram maioritariamente genes relacionados com a resposta imunitária (ICOS, CD2, CD3, ZAP70, TRAT1, TARP, GZMK, LCK, CXCL13, CCL19, CCR7, VCAM1, PDE4D, NUSAP1 e SPC24), mas também com a proliferação celular (CDKN2A, BRAF e NRAS), com a pigmentação (MITF), entre outros (SPP1, gene da osteopontina). A falta de validação independente e a escassa solidez estatística das correlações encontradas são limitações que se podem apontar a estes estudos, requerendo-se trabalhos adicionais com amostras de maior dimensão.

2.2.6. Factores de transcrição

Um dos factores de transcrição que vê a sua expressão modificada no decurso da progressão do melanoma é o factor AP-2^[183]. Trata-se de uma proteína com afinidade para uma sequência específica do DNA (*GCC box*)^[186], interagindo com elementos reguladores capazes de activar ou inibir genes envolvidos numa ampla gama de funções biológicas. A família AP-2 engloba 5 isoformas distintas: AP-2 α , AP-2 β , AP-2 γ , AP-2 δ e AP-2 ϵ . A forma activa do factor de transcrição consiste num complexo homo ou heterodimérico formado por duas proteínas da família.

Vários trabalhos demonstraram que a progressão do melanoma se associa à perda de expressão de AP-2. Esta perda conduz à diminuição da expressão de c-Kit (um evento que acompanha geralmente a transição da fase de crescimento radial para vertical) e ao aumento da expressão da molécula de adesão MCAM/MUC18, que se relaciona com a disseminação metastática^[183]. A perda da influência de AP-2 sobre a transcrição genética também conduz ao aumento da expressão da enzima MMP-2, da oncoproteína HER-2, da proteína anti-

apoptótica Bcl-2, do VEGF (factor de crescimento endotelial vascular) e do IGF-R1 (receptor 1 do factor de crescimento aparentado à insulina), assim como à diminuição da expressão da E-caderina, da p21CIP1 e da proteína Fas^[187,188].

Apenas uma pequena proporção das perdas de expressão de AP-2 se devem a mutações inactivadoras^[189], relacionando-se, na maioria dos casos, com alterações epigenéticas (particularmente com o aumento da actividade da caspase 6, capaz de efectuar a degradação proteolítica de AP-2 α). No entanto, numa proporção residual de casos, podem ocorrer mutações genéticas no *locus* AP-2 (foram descritas mutações pontuais no motivo activador deste gene).

Alterações da expressão do factor de transcrição AP-1 também foram descritas no melanoma. Este factor de transcrição resulta da combinação heterodimérica entre uma proteína da família Fos e uma proteína da família Jun. Actua através da interacção com uma sequência específica do DNA (TGAGTCAC), resultando na regulação de diversos genes relacionados com a proliferação, a diferenciação, a morte celular e a carcinogénese^[190]. Este factor de transcrição intervém na regulação da expressão de diversas metaloproteínases. Um trabalho realizado em linhas celulares de melanoma *in vitro* permitiu verificar uma alteração nos pares de AP-1, sendo notória uma perda de c-Jun na passagem da fase de crescimento radial para as fases de crescimento vertical e metastática^[191].

A proteína CREB é um factor de transcrição da superfamília bZIP. A fosforilação do resíduo Ser133 leva à sua activação nas células de melanoma. Esta fosforilação pode resultar da sinalização através da cascata da PI3K/AKT^[185]. Depois de activado, este factor de transcrição conduz à activação sequencial dos seus co-activadores CBP e p300, sendo um dos principais interruptores moleculares da progressão da fase de crescimento radial para a fase de crescimento vertical e subsequente fase metastática^[183]. A heterodimerização de CREB com outras proteínas da superfamília bZIP, particularmente com ATF-1 ou com CREM, é comum. É o dímero CREB/ATF-1 que modula activamente a progressão e disseminação do tumor, promovendo a expressão de moléculas relacionadas com a invasão tumoral (MCAM/MUC18, MMP-2 e HER-2), a inflamação induzida pelo tumor (IL-8) e a sobrevivência celular (Bcl-2). Estes efeitos biológicos são conseguidos através da interacção de CREB com um motivo octanucleotídico do DNA (TGACGTCA) conhecido como CRE^[77]. Realça-se que o silenciamento de CREB nas células de melanoma leva à redução drástica da expressão de MCAM/MUC18 e do factor de transcrição E2F1, mas concomitantemente a uma expressão aumentada das moléculas onco-supressoras p21, CYR61 e AP-2 α ^[183].

O NFkB, outro factor de transcrição que pode ser activado no decurso da cascata PI3K/AKT, aumenta a expressão de proteínas inibidoras da apoptose e pode potencialmente interferir na progressão tumoral^[76].

O factor de transcrição Mitf é codificado por um gene que tem diversas regiões promotoras, uma das quais apenas se encontra activa nos melanócitos^[192]. Este promotor específico contém uma sequência com afinidade para o heterodímero Tcf/Lef, o que o torna susceptível à regulação pela β -catenina através da via de sinalização Wnt^[193]. Possui, ainda, uma sequência com afinidade para o factor CREB, o qual é activado essencialmente em resposta ao aumento dos níveis intracelulares de cAMP^[192]. Isto acontece após a ligação da α -MSH ao seu receptor MC1R. Finalmente, outras duas sequências deste promotor interagem respectivamente com outros dois factores de transcrição de relevância para a diferenciação e sobrevivência dos melanócitos: Sox10 e Pax3.

É o homodímero formado por duas moléculas de Mitf que constitui o factor de transcrição activo. Através da sua interacção com uma sequência conservada (CATGTG) presente na região promotora dos genes alvo^[192] dá-se um aumento da expressão dos genes responsáveis pela melaninogénese (Tyr, OCA-2, Tyrp1, Tyrp2 e AIM-1/MATP)^[194] e do gene CDKN1A, o que culmina na elevação dos níveis da proteína p21CIP1 e na consequente hipofosforilação da proteína Rb. Estes acontecimentos contribuem para a saída do ciclo celular em G1, permitindo à célula activar o seu programa de diferenciação^[195].

O factor de transcrição Mitf é, deste modo, o principal regulador do desenvolvimento e diferenciação dos melanócitos a partir dos melanoblastos e das células precursoras da crista neural^[196]. Apoiado por diversos dados experimentais no ratinho, supõe-se que o papel de Mitf se estenda à regulação da sobrevivência melanocítica não só durante o desenvolvimento embrionário, mas também em plena vida adulta^[192]. A sua mutação em heterozigotia, na espécie humana, é responsável pela síndrome de Waardenburg do tipo IIA, caracterizada por madeixa de cabelos hipopigmentados, máculas hipopigmentadas, heterocromia da íris e surdez, revelando a importância de Mitf no desenvolvimento dos melanócitos da pele, olho e ouvido interno.

A existência de mutações de determinados oncogenes, como a frequente mutação V600E de BRAF, condiciona a supressão da expressão de MITF, sendo esta diminuída a um nível em que a sua interferência inibitória sobre o ciclo celular se torna irrelevante^[197]. Este fenómeno pode ser importante na progressão do melanoma, uma vez que a ausência da expressão de MITF em melanomas de espessura intermédia (1 a 4 mm) se acompanha de sobrevivência global e sobrevivência livre de doença estatisticamente inferior em relação aos

casos em que a expressão deste factor se verifica. Foram descritas amplificações do gene MTTF em melanomas humanos^[198], observadas de uma forma prevalente na doença metastática e que se relacionam com uma menor sobrevivência global. A mutação pontual E318K de MTTF foi também observada no contexto de melanoma familiar sem mutações dos genes CDKN2A e CDK4^[199].

2.2.7. Receptores acoplados a proteína G

O receptor PAR1 e o receptor do factor activador das plaquetas (PAFR) são receptores acoplados a proteína G com papel demonstrado no crescimento tumoral e na metastização^[183], o que decorre da utilização das vias da hemostase e de activação plaquetar por parte das células de melanoma.

A trombina, ao activar as plaquetas, promove a libertação de PDGF e de ácido lisofosfatídico. Concomitantemente, induz também a expressão de MMP-1, MMP-2, IL-8, VEGF, PDGF e bFGF, reforçando o fenótipo invasivo das células neoplásicas^[183] e promove, ainda, a clivagem do domínio N-terminal do receptor transmembranar PAR-1, criando um novo domínio com afinidade para o corpo do receptor e que age como ligando do mesmo, promovendo sinalização que culmina na indução de proliferação, invasão e angiogénese. A activação de PAR-1 intervém na transição de crescimento radial para vertical, sendo igualmente relevante para a metastização, uma vez que promove a expressão de conexina 43, aspecto que se reveste de importância na mediação da adesão das células tumorais aos tecidos receptores.

A inibição do crescimento tumoral e a diminuição do número de metástases pulmonares experimentais foram observadas após silenciamento de PAR-1 por interferência de RNA (utilizando moléculas de shRNA e siRNA)^[183]. Estas observações levantam a possibilidade terapêutica de bloquear PAR-1 por siRNA veiculado através de lipossomas, conforme já descrito em relação a outros alvos moleculares (Bcl-2^[199] e EphA2^[200]).

O PAFR (receptor do factor activador das plaquetas), quando estimulado pelo seu ligando (PAF), desencadeia uma cascata sinalizadora que culmina na expressão de moléculas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8, COX-2 e IL-10), pró-angiogénicas (VEGF e bFGF) e promotoras da intravasão vascular e da migração (MMP-2)^[183]. Duas proteínas intermediárias na cascata sinalizadora desencadeada pela activação de PAFR (PKA e p38 MAPK) são responsáveis

pela fosforilação sequencial de CREB, facto de extrema relevância na progressão do melanoma, conforme descrito anteriormente nesta secção.

2.2.8. Moléculas de adesão celular

As moléculas de adesão celular compreendem uma extensa variedade de proteínas capazes de estabelecer interacções entre as células ou destas com a matriz extracelular. A função destas moléculas estende-se à migração celular e à transdução de sinais, conferindo-lhes um papel dinâmico em fenómenos tão variados como a manutenção da integridade epitelial e vascular, a embriogénese, a diferenciação celular, a proliferação celular, a resposta inflamatória, a defesa imunitária e a progressão tumoral^[201]. As moléculas de adesão são particularmente relevantes na proliferação descontrolada dos clones tumorais, na invasão local e na metastização.

As moléculas de adesão dividem-se em 4 famílias distintas: caderinas, selectinas, imunoglobulinas e integrinas^[201].

As caderinas são proteínas homodiméricas da superfície celular. São estruturalmente formadas por cinco domínios extracelulares, por um domínio transmembranar e por um curto domínio intracitoplasmático. Os cinco domínios extracelulares encontram-se estreitamente entrelaçados com os domínios extracelulares das caderinas das células vizinhas, numa interacção dependente do cálcio e responsável pelo estabelecimento de uma forte e estável união intercelular homotípica, conhecida por *zonula adherens*^[202]. O domínio intracitoplasmático das caderinas interconecta-se com o citoesqueleto de actina por intermédio de uma molécula de catenina. Além de conferir maior estabilidade à união intercelular, esta interacção é importante para que se estabeleça uma correcta comunicação entre células vizinhas. A perda de contacto na *zonula adherens* levará à libertação da catenina. A β -catenina livre migra para o núcleo e interage com os factores de transcrição Tcf/Lef^[203], influenciando a expressão de vários genes. Assim, a interacção entre as moléculas de caderina de células vizinhas é um dos principais mecanismos que conduz à inibição de contacto, impedindo uma proliferação celular descontrolada, prejudicial à homeostasia tissular.

As caderinas são classificadas de acordo com o tecido de onde foram inicialmente isoladas: E-caderina (tecido epitelial), N-caderina (tecido nervoso), P-caderina (placenta), R-caderina (retina), M-caderina (mioblastos) e VE-caderina (células endoteliais)^[202,203].

No melanoma, a invasão tumoral e a metastização relacionam-se com alterações do perfil de caderinas, em particular com a perda da expressão de E-caderina e com o aumento concomitante da expressão de N-caderina^[204,205]. A substituição de E-caderina por N-caderina leva à ruptura da união entre as células de melanoma e os queratinócitos, através da perda da influência da interação entre as moléculas de E-caderina^[206]. Desta forma, as células de melanoma adquirem a capacidade de invadir a derme e de metastizar, estabelecendo interações com os fibroblastos dérmicos e com as células endoteliais, tipos celulares em que a expressão de N-caderina também se verifica^[207]. A troca de E-caderina por N-caderina pode dever-se a diversos factores: modulação da transcrição genética por influência dos factores de transcrição Twist em resposta à activação da via PI3K/AKT^[208], diminuição da expressão de Rac1 em resposta à sinalização por BRAF mutante^[209], fenómenos epigenéticos (hipermetilação do gene da E-caderina)^[210] e perda da influência do domínio intracitoplasmático da E-caderina, que conduz ao aumento dos níveis do factor de transcrição NFkB e este, secundariamente, leva à sobre-expressão de N-caderina^[211].

Um trabalho sobre a migração transendotelial de células de melanoma *in vitro* evidencia que a sobre-expressão de N-caderina detém um papel fulcral no desenvolvimento do processo metastático^[212]. Verificou-se que, após a adesão heterotípica entre o melanoma e o endotélio, a expressão de N-caderina pelas células tumorais é ampliada cerca de duas vezes, facilitando a intravasão e a extravasão vascular. Porém, esta ocorrência só terá eficácia se associada à desregulação da via Wnt a partir da libertação da β -catenina. Com efeito, a N-caderina sobre-expressa na membrana das células neoplásicas parece sofrer fosforilação de resíduos de tirosina no seu domínio intracitoplasmático e esta fosforilação destrói a sua afinidade pela β -catenina, libertando-a no citoplasma. A natureza do sinal que leva à fosforilação da N-caderina é provavelmente mediada por tirosina-cinases da família Src, enzimas cuja expressão aumenta após adesão heterotípica das células de melanoma às células endoteliais^[213].

Alterações da expressão de P-caderina também podem influenciar a invasão. Vários trabalhos publicados mostraram que a perda de expressão desta molécula tem uma correlação negativa com o prognóstico^[205], precedendo geralmente a fase metastática da doença^[214]. A regulação da expressão da P-caderina nas células de melanoma parece ser influenciada por uma série de mecanismos epigenéticos. Um deles é a hipermetilação de determinadas sequências do seu gene, à semelhança do que ocorre com a E-caderina^[210]. Outro mecanismo é a produção de uma forma truncada de P-caderina, na qual estão ausentes os domínios transmembranar e intracitoplasmático. Assim, passa a ser secretada na forma

solúvel, podendo exibir uma acção do tipo dominante-negativa, ao combinar-se com moléculas semelhantes da parede das células tumorais^[215].

A VE-caderina parece desempenhar um papel muito importante nos mecanismos de angiogénese desencadeados pelo tumor^[216], conforme será desenvolvido adiante neste capítulo.

As selectinas são um pequeno grupo de proteínas estruturalmente aparentadas (homologia superior a 60%)^[217]. Possuem 3 domínios extracelulares: um domínio constituído por unidades de repetição consensuais curtas, com estreita semelhança com as proteínas reguladoras do complemento, um domínio semelhante ao EGF (factor de crescimento epidérmico) e, finalmente, um domínio aminoterminal do tipo lectina, dependente do cálcio, responsável pela afinidade pelos ligandos. Podem distinguir-se, ainda, um domínio transmembranar e um curto domínio intracitoplasmático, transdutor de sinais reguladores, capaz de modular a função de outras proteínas de adesão (integrinas) e de induzir a produção de citocinas. A classificação das selectinas, tal como sucedia com as caderinas, é feita de acordo com as células em que são preferencialmente encontradas: E-selectina ou CD62E (molécula de superfície das células endoteliais), L-selectina ou CD62L (molécula de superfície dos leucócitos, podendo ainda encontrar-se na forma solúvel) e P-selectina ou CD62P (molécula de superfície das plaquetas, encontrando-se também armazenada nos grânulos de Weibel-Palade das células endoteliais). Os ligandos naturais das selectinas são glicoproteínas que contêm resíduos de hidratos de carbono fucosilados ou sulfatados, como é o caso do tetrassacárido sialil Lewis X (SLe^x) e glicanos relacionados (sialil Lewis A [SLe^a] e sialil Lewis X dimérico [diSLe^x])^[218]. Todas as selectinas reconhecem o SLe^x, embora a sua afinidade seja particularmente mais forte para a E-selectina. A glicoproteína ESL-1 (*E-selectin ligand 1*) também é um ligando da E-selectina, enquanto as glicoproteínas do tipo mucina (GlyCAM-1, CD34 e MAdCAM-1) são ligandos preferenciais da L-selectina. Finalmente, a glicoproteína PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand 1*), apesar de reconhecida por todos os membros da família, é o ligando mais importante da P-selectina. A interacção dos antigénios SLe^x e SLe^a com a E-selectina da superfície das células endoteliais, após activação das mesmas por citocinas secretadas pelo tumor, parece ser um mecanismo interveniente na metastização de diversos tumores^[219,220], incluindo o melanoma^[221]. A interacção das células tumorais com a E-selectina da parede endotelial promove a geração de estímulos angiogénicos^[214].

A superfamília das imunoglobulinas compreende proteínas que partilham pelo menos um domínio extracelular homólogo das imunoglobulinas. Dada a grande variedade estrutural e

funcional de moléculas que correspondem a esta descrição, esta superfamília divide-se em 4 subtipos^[222]:

- Tipo C1: moléculas ligadas ao reconhecimento de antígenos, como são os receptores das células T (TCR), os receptores de superfície dos linfócitos B, os anticorpos (IgG, IgA, IgM, IgD e IgE) e as moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade (CMH).
- Tipo C2: moléculas ligadas à adesão celular, como os ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), ICAM-3 (CD50), VCAM-1 (CD106), PECAM-1 (CD31), NCAM, MCAM/MUC18 (CD146), CD2, CD4, CD8, CD22, moléculas co-estimuladoras dos linfócitos T, como os CD28, CD80, CD86 e CTLA-4 e proteínas fixadoras do complemento.
- Tipo C3: superóxido dismutase, sinaptotagmina I, NFkB, hemocianina, β-galactosidase.
- Tipo C4: Moléculas com domínios semelhantes à actinoxantina.

Apenas algumas proteínas do tipo C2 se comportam funcionalmente como moléculas de adesão. A expressão da maioria delas é estreitamente influenciada por diversas citocinas, levando à união forte dos leucócitos ao endotélio no decurso dos processos inflamatórios, numa interacção em que intervêm as integrinas^[223]. As acções biológicas das moléculas de adesão desta superfamília vão muito para além da resposta inflamatória, mediando processos como a angiogénese^[188] e a migração de células tumorais^[224].

Em relação à potencial contribuição para a progressão do melanoma, destacam-se vários membros da família: ICAM-1, MCAM/MUC18, L1CAM, NCAM, PECAM, VCAM e ALCAM^[225]. Estas moléculas são glicoproteínas da membrana celular que, para além de promoverem interacções homotípicas e heterotípicas entre as células de melanoma e as células endoteliais, participam igualmente na transdução de sinais^[205], com repercussão na evasão apoptótica, angiogénese, invasão local, intravasão/extravasão vascular, colonização, proliferação e fuga ao sistema imunológico^[225].

A imunopositividade das células de melanoma para o ICAM-1 é mais frequente nos melanomas nodulares^[226], correlacionando-se com a fase de crescimento vertical e,

consequentemente, com o índice de Breslow^[227]. Em doentes com melanoma no estágio I, a expressão de ICAM-1 parece influenciar negativamente a duração do intervalo livre de doença e a sobrevivência global. Alguns autores atribuíram, ainda, um significado prognóstico pejorativo ao aumento dos níveis de ICAM-1 solúvel (sICAM-1) no soro de doentes com melanoma^[228].

A expressão da glicoproteína MCAM/MUC18 foi identificada como marcador de prognóstico independente no melanoma, resultando na diminuição da sobrevivência^[183]. Esta molécula tem a capacidade de promover a invasão por intermédio do aumento da expressão de MMP-2 e de induzir a adesão das células de melanoma ao endotélio vascular. Além disso, a ligação homotípica entre moléculas de MCAM/MUC18 pode desencadear sinalização mediada pelo domínio citoplasmático da glicoproteína, que tem função de proteína-quinase. Em modelos murinos, a expressão de MCAM/MUC18 conferiu maior tumorigenicidade e maior potencial metastático às células de melanoma. Neste contexto, demonstrou-se que o uso de anticorpos monoclonais humanizados (ABX-MA1) dirigidos contra a glicoproteína MCAM/MUC18 em ratinhos inoculados com células de melanoma humano das linhas A375SM e WM2664 foi capaz de inibir o crescimento tumoral e de bloquear o aparecimento de metástases *in vivo*^[229]. A inibição de MCAM/MUC18 pelo anticorpo ABX-MA1 resulta, de modo mais particular, na diminuição da expressão da MMP-2 (evidenciada por zimografia), na inibição da neo-angiogénese e na inibição da adesão das células de melanoma ao endotélio vascular.

Estes resultados estão de acordo com estudos em linhas celulares de melanoma humano. Células de melanoma primário em cultura transfectadas com cDNA codificador de MCAM/MUC18 adquirem um maior potencial metastático quando injectadas no ratinho^[230].

As integrinas são glicoproteínas da membrana celular. Estruturalmente são heterodiméricas, formadas por uma subunidade α e uma subunidade β unidas de modo não covalente. Apesar da subunidade β conferir especificidade à molécula, é a subunidade α a responsável pela afinidade pelo ligando^[231]. As integrinas interagem com os seus ligandos ao nível extracelular e estabelecem contacto com proteínas do citoesqueleto (actina e talina)^[232], o que proporciona um meio de *integrar* a informação extracelular com o comportamento da célula (daí a designação *integrina*). Essa integração é realizada através de uma via sinalizadora, em que entram as fibras de actina e cinases da família Src^[233]. Assim, as vias das cinases MAPK e da PI3K/AKT podem ser activadas por sinais enviados por integrinas^[234].

De acordo com a subunidade β , as integrinas classificam-se em oito tipos diferentes: $\beta 1$ a $\beta 8$ ^[235]. As mais importantes são as dos tipos $\beta 1$ a $\beta 3$.

As integrinas $\beta 1$ são seis (VLA-1 a VLA-6)^[236]. Todas partilham a subunidade $\beta 1$ (CD29) como cadeia β comum e as subunidades α correspondem respectivamente às 6 isoformas do CD49. Estas integrinas são expressas maioritariamente nos leucócitos e nos fibroblastos. Intervêm na inflamação, na cicatrização, na embriogénese, na angiogénese e na migração celular. O VLA-4 (CD49d/CD29) é uma das integrinas $\beta 1$ mais relevantes, sendo um dos mediadores da recirculação dos linfócitos, interagindo com o seu ligando VCAM-1 nas células endoteliais.

As integrinas $\beta 2$ têm o CD18 como subunidade β comum. As 3 isoformas do CD11 representam as subunidades α . Fazem parte deste grupo o LFA-1 (CD11a/CD18), MAC-1 (CD11b/CD18) e a p150,95 (CD11c/CD18)^[236]. São encontradas exclusivamente nos leucócitos, constituindo um elemento crítico para a sua adesão firme às células endoteliais activadas. A sua importância reside, pois, na quimiotaxia e migração transendotelial dos leucócitos para os locais de inflamação, além de intervir na apresentação antigénica.

As integrinas $\beta 3$ têm o CD61 como subunidade β comum e incluem a integrina $\alpha \text{IIb}\beta 3$ (CD41/CD61) e a integrina $\alpha \text{V}\beta 3$ (CD51/CD61)^[236]. São também designadas cito-adesinas, tendo a capacidade de proporcionar interacções heterotípicas entre as células e a matriz extracelular envolvente. Os seus ligandos principais são a vitronectina, a fibronectina, a laminina, a tescina, o fibrinogénico, a trombospondina, o factor de von Willebrand e o CD31. A sua expressão é maioritária nas células endoteliais e nas plaquetas, participando na adesão plaquetar a sítios de endotélio lesado.

No contexto do melanoma, supõe-se que a perda ou ganho de expressão de algumas integrinas possa constituir um mecanismo de adaptação das células neoplásicas, de modo a conseguirem proliferar em ambientes distintos. A correlação da expressão da integrina $\alpha \text{V}\beta 3$ com o crescimento invasivo do melanoma tem sido extensamente referida na literatura. Na verdade, é um facto consensual desde há duas décadas que a sua expressão se encontra significativamente mais elevada nos melanomas em fase de crescimento vertical^[237] e com maior propensão a originar metástases linfáticas^[238] e hematogénicas^[239]. À expressão de integrinas $\beta 3$ foi igualmente atribuído um significado prognóstico, uma vez que, em alguns estudos, se correlacionou com maiores taxas de recidiva e de mortalidade global^[240].

Do ponto de vista funcional, a integrina $\alpha \text{V}\beta 3$ tem afinidade pela molécula de adesão Thy-1 (CD90), cuja expressão é induzida nas células endoteliais activadas^[241]. Desta forma, pode influenciar a migração transendotelial e permitir a metastização. Por outro lado, a expressão paralela da integrina $\alpha \text{V}\beta 3$ e da integrina plaquetar $\alpha \text{IIb}\beta 3$ mostrou estar

associada à regulação positiva do bFGF (factor de crescimento fibroblástico básico), promovendo a angiogénese, fundamental para o crescimento do tumor^[242]. Um modelo laboratorial, que incluiu a incubação de linhas celulares de melanoma sobre um gel tridimensional de colagéneo dérmico, permitiu concluir que a expressão da cadeia αV contribui para a inactivação da proteína p53 e para a regulação positiva da actividade da cascata de cinases MEK1 e ERK1/2, resultando na estimulação da proliferação celular e na inibição da apoptose^[243].

A integrina $\alpha 3\beta 1$ (VLA-3) também pode estar aumentada no melanoma, correlacionando-se com a fase invasiva^[244]. A expressão desta molécula por algumas linhas celulares de melanoma levou a uma maior migração das células neoplásicas ao longo de matrizes extracelulares sintéticas. A glicosilação da integrina $\alpha 3\beta 1$ parece influenciar a sua função e estar associada à aquisição de um comportamento invasivo por parte do tumor^[245]. A glicosilação de outras integrinas parece aumentar a sua afinidade pela fibronectina e, assim, facilitar a progressão tumoral^[246].

2.2.9. Metaloproteinases

As metaloproteinases (MMP) são uma ampla família de enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular. A regulação da síntese e da actividade destas enzimas tem larga influência no equilíbrio que se estabelece entre a produção e a degradação dos componentes da matriz extracelular. Este equilíbrio dinâmico é fundamental para a renovação dos tecidos e é, em larga medida, responsável por fenómenos fisiológicos como a morfogénese, a angiogénese, a cicatrização e o envelhecimento. A sua intervenção desregulada é, no entanto, uma ocorrência de relevo em alterações patológicas como a resposta inflamatória e a metastização de neoplasias^[247].

A família das MMP inclui mais de 2 dezenas de enzimas, entre colagenases, gelatinases, estromalinas, matrilisinas, metalo-elastases, enamelinas e MMP membranares. Todas são primariamente sintetizadas sob a forma de pró-enzimas (zimogénios), estando a sua activação sujeita a processos reguladores complexos^[248]. Em primeiro lugar, a sua síntese é regulada através do controlo da expressão genética. Concomitantemente, existe um segundo ponto de regulação na activação zimogénica (clivagem da pró-enzima em enzima activa), assim como um papel modulador adicional por parte de moléculas inibidoras (TIMP ou inibidores tissulares de metaloproteinases)^[248].

Nas regiões não codificadoras da extremidade 5' dos genes das MMP existem sequências promotoras que são responsáveis pelo referido controlo da expressão genética. Estas regiões contêm elementos AP1, uma sequência de 8 pares de bases (TGAGTCAC) que serve de ligando ao factor de transcrição AP-1 (um heterodímero Fos/Jun), capaz de induzir a transcrição genética^[249].

A glicoproteína transmembranar EMMPRIN (CD147), pertencente à superfamília das imunoglobulinas, é um importante indutor da expressão das MMP^[250]. Foi demonstrada a sua presença nas membranas citoplasmáticas de diversos tipos de células tumorais, sendo capaz de induzir *in vitro* a síntese de MMP-1, 2, 3, 14 e 15 pelos fibroblastos vizinhos. Estas funções de EMMPRIN podem ser estimuladas através da interacção com a proteína S100A, resultando na promoção da migração celular e na metastização do melanoma^[251]. Por esta razão, a interacção EMMPRIN/S100A pode constituir, no futuro, um possível alvo terapêutico.

A regulação da activação das pró-enzimas depende da acção de serina-proteases (por exemplo, tripsina), que levam à clivagem da molécula numa forma intermediária ainda inactiva^[248], sendo a forma activa obtida por clivagem da extremidade amino-terminal, um passo que é sensível à regulação por TIMP. A pró-enzima da MMP-2 necessita de uma via distinta de activação em que intervém a MMP-14.

Mesmo após terem adquirido plena actividade catalítica, as MMP estão sujeitas à regulação pelos seus inibidores específicos (TIMP)^[252]. Os TIMP fazem parte de uma família constituída por 4 proteínas de peso molecular relativamente pequeno, com uma homologia estrutural marcada (40%). Quase todas as MMP são sensíveis à inibição pela generalidade destas moléculas. O que pode variar são as constantes de ligação e, conseqüentemente, a intensidade de inibição conseguida. As regiões promotoras dos genes codificadores dos TIMP têm elementos AP1 idênticos aos dos genes das MMP, estando sujeitos à indução pelo factor de transcrição SP1.

Além da inibição das MMP, alguns TIMP exibem funções acessórias com importância fisiológica. Os TIMP1 e 2 são moléculas sinalizadoras que induzem proliferação celular. O TIMP1 é, ainda, anti-apoptótico, mas, inversamente, o TIMP3 promove a apoptose em diversas linhas de células tumorais^[252].

O papel das MMP e dos TIMP para a invasão tumoral no melanoma é difícil de avaliar com precisão, uma vez que a expressão destas enzimas tanto por células tumorais como por células do estroma pode levar a observações contraditórias: as MMP facilitam a invasão tumoral e a metastização, mas são igualmente essenciais para a infiltração de células

imunitárias na massa tumoral. Em virtude disso, ensaios com inibidores das MMP de largo espectro revelaram um potencial antineoplásico desprezável^[253].

De qualquer modo, vários trabalhos associaram as MMP com a progressão do melanoma. Os níveis séricos de MMP-1, MMP-9 e da forma activa de MMP-13 são mais elevados em doentes com melanoma do que em controlos normais e associam-se a uma menor sobrevivência global^[254]. A maior produção de MMP-1 em linhas celulares de melanoma correlaciona-se com o aumento da actividade da via das cinases MAPK^[255]. A indução da síntese de MMP-1 nos fibroblastos do estroma foi também verificada no melanoma, sendo resultante da acção de factores solúveis (particularmente a IL-1 α e o bFGF) secretados de forma parácrina pelas células tumorais^[256]. A MMP-2 relaciona-se com uma maior probabilidade de metastização, estando demonstrada a sua peculiar activação pela MMP-14 em linhas celulares em cultura^[257]. A capacidade de produzir MMP-2 depende em grande medida do micro-ambiente, já que as células estromais parecem ser a principal fonte desta enzima. Neste contexto, uma das formas de induzir a síntese de MMP-2 é através da acção da osteopontina (OPN)^[258]. Esta proteína induz a expressão do gene da MMP-2 através da via de sinalização IKK (cinase i kappa B alpha/i kappa B alpha). Outra via de induzir a MMP-2 passa pela activação do gene desta metaloproteinase mediada pelo factor de transcrição STAT3, possuidor de uma sequência com alta afinidade para o promotor desse gene^[259].

2.2.10. Angiogénese

Uma massa tumoral com menos de 1 mm³ de volume pode facilmente ser nutrida e receber oxigénio por difusão passiva, já que a presença de vasos sanguíneos a uma distância não superior a 100-200 μ m de cada célula é condição suficiente para que isso ocorra^[260]. Todavia, para que um tumor possa prosseguir o seu crescimento para além de um volume crítico, torna-se imprescindível o recrutamento de estruturas vasculares próprias (angiogénese).

O desencadeamento da angiogénese é o resultado da alteração do equilíbrio entre factores angiogénicos e factores inibidores. O primeiro passo para a formação de neovasos é a degradação da membrana basal endotelial, fenómeno onde intervêm algumas MMP (em particular as MMP-2 e MMP-9)^[261]. Assim, os TIMP1 e TIMP3 constituem estímulos anti-angiogénicos naturais^[260], facto que é corroborado pela inibição da angiogénese e da

metastização obtida por um inibidor sintético das MMP-1, -2, -7, -9 e -14 (BMS-275291) em modelos murinos^[262].

Os principais factores angiogénicos são o factor de crescimento vascular endotelial (VEGF), o factor de crescimento fibroblástico básico (bFGF), a interleucina 8 (IL-8) e o factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). Além destes, podem ainda intervir proteínas da família da angiopoietina, o TGF- β , a integrina $\alpha V\beta_3$, a VE-caderina, o óxido nítrico e a cicloxigenase 2^[260]. Os factores anti-angiogénicos mais importantes são a trombospondina, os TIMP (em particular TIMP1 e TIMP3), o interferão α e o interferão β . Além destes, merecem ainda referência outras moléculas, como a endostatina, o factor plaquetar-4, a osteopontina e as interleucinas 4, 12 e 18.

O VEGF é o mais potente indutor da angiogénese tumoral^[263]. O aumento da sua expressão pode ser desencadeado pela exposição das células de melanoma a ambientes pobres em oxigénio, mostrando que a hipóxia, ainda que transitória, é o factor que determina o início do processo angiogénico^[260,263]. A transição da fase de crescimento radial para crescimento vertical é geralmente acompanhada pela indução da expressão de VEGF e pela sua acumulação no estroma^[264]. A importância do VEGF, bem como a de outras moléculas estimuladoras da angiogénese (bFGF e IL-8), tem sido amplamente avaliada e confirmada através de modelos baseados em xenotransplantes de células de melanoma humano no ratinho^[265]. Está actualmente em curso um ensaio clínico em fase II com o axitinib (inibidor do VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3) no tratamento do melanoma metastático^[266]. A terapêutica com o anticorpo monoclonal bevacizumab, inibidor altamente específico de VEGF-A, em doentes com melanoma metastático demonstrou um intervalo médio livre de progressão de 2,14 meses e uma sobrevivência média de 9 meses, no contexto de um ensaio clínico em fase II^[267].

A interacção entre as células de melanoma e a matriz extracelular pode levar à geração de estímulos angiogénicos através da sinalização mediada por moléculas de adesão. As integrinas $\alpha V\beta_3$ e $\alpha II\beta_3$, por exemplo, podem induzir aumento de expressão de bFGF^[242].

A IL-8 é um importante indutor da proliferação e da migração das células endoteliais, promovendo a angiogénese através da regulação positiva da síntese de MMP^[268]. Em estudos *in vitro*, as células de melanoma em co-cultura com queratinócitos evidenciaram uma expressão aumentada de IL-8, possivelmente por influência da IL-1 produzida pelos queratinócitos. Ao invés, a co-cultura com hepatócitos resultou na inibição da produção de IL-8 por influência do TGF β dos hepatócitos^[269]. Estes resultados reforçam a importância do microambiente na modulação do comportamento das células tumorais.

Constatou-se que determinadas linhas celulares de melanoma, quando cultivadas em matrizes tridimensionais de colagêneo, são capazes de formar redes de estruturas tubulares semelhantes às redes capilares embrionárias^[270]. Este fenômeno de mimetismo vasculogênico simula a diferenciação das células endoteliais a partir dos seus precursores mesodérmicos, estando demonstrada a sua ocorrência *in vivo* em alguns melanomas na fase de crescimento vertical^[271]. Observou-se que estas células neoplásicas expressam diversos marcadores fenotípicos próprios do endotélio, das células epiteliais e das células hematopoiéticas, sugerindo uma reversão para células estaminais ou, o que parece mais provável, uma participação de células estaminais tumorais^[272]. Um dos genes que se relaciona fortemente com o mimetismo vasculogênico é o da VE-caderina (CD144)^[273]. Linhas celulares de melanoma que não expressam VE-caderina são incapazes de formar estruturas tubulares em culturas tridimensionais. Neste processo também parecem intervir tirosina-cinases, particularmente a proteína EphA2, já que o bloqueio transitório da expressão daquela molécula resulta na paragem da formação de novas estruturas tubulares^[274].

Apesar do mimetismo vasculogênico ser uma propriedade de linhas celulares de melanoma muito agressivas^[270], é um fenômeno que não parece conferir nenhum significado prognóstico pejorativo no contexto do melanoma cutâneo pT3 ou pT4^[275].

O estudo das modificações vasculares induzidas pelo melanoma tem igualmente abarcado os vasos linfáticos. Embora não existam provas concludentes, supõe-se que o melanoma é capaz de induzir linfangiogênese^[276]. Diversos estudos procuraram avaliar a densidade linfática em redor e no interior da massa tumoral e a sua relação com a metastização linfática e com o prognóstico^[277]. O VEGF3 e a osteopontina são importantes moduladores desta forma de mimetismo vasculogênico^[278]. A presença de uma grande densidade de microvasos linfáticos intratumorais é um factor preditivo de metastização ganglionar e correlaciona-se com uma diminuição da sobrevivência. A existência de uma grande densidade linfática intratumoral parece ser um critério mais preciso do que a espessura de Breslow na predição da ocorrência de metástases no gânglio sentinela^[279].

2.2.11. Células estaminais tumorais

As células estaminais são células em que coexistem duas propriedades específicas: a capacidade de auto-renovação e a capacidade de diferenciação (plasticidade)^[279]. O modelo de melanomagénesse baseado nas células estaminais, apoiado por estudos *in vitro* e em modelos

animais, advoga que o melanoma resulta de células melanocíticas estaminais mutadas^[281]. Esta ideia provém de argumentos muito simples: é aparentemente mais fácil que uma neoplasia surja a partir de uma célula que já retém de antemão a capacidade de auto-renovação do que resulte da transformação de uma célula plenamente diferenciada, que teria de reactivar um conjunto de programas genéticos conducentes à imortalização. Por outro lado, como a duração da vida de uma célula estaminal é, na prática, muito superior à das células diferenciadas, é muito mais provável que o seu genoma acumule mutações que afectem proto-oncogenes e genes onco-supressores^[280].

A assinatura molecular das células epidérmicas estaminais derivadas da crista neural, localizadas na região da protuberância pilar, é a expressão de nestina, da proteína c-Kit, de CD133 e de CD166. Podem encontrar-se as mesmas proteínas membranares em células estaminais tumorais, nas quais ainda se verifica a expressão de CD44 (ligando da E-selectina, importante para a adesão a locais receptores), de CD27 (modulador da auto-renovação), de CD47 (molécula protectora contra a fagocitose por mononucleares e polimorfonucleares), IL-3R α (que confere resistência a compostos radioactivos) e de bombas ABC, como a proteína ABCB5 (responsáveis pela resistência aos citostáticos)^[152].

As células estaminais tumorais são responsáveis pela diferenciação heterotípica do melanoma, pela invasão da derme e disseminação tumoral, pela quiescência ou dormência metastática, pela resistência aos citostáticos e à radioterapia e pela formação de “reservatórios” capazes de reconstituir toda a massa tumoral após quimioterapia ou radioterapia^[152,282]. Por estas razões, estas células constituem potenciais alvos das terapêuticas antineoplásicas^[282].

2.2.12. Resposta imunitária

A progressão de uma neoplasia quanto ao seu crescimento, invasão e capacidade de originar metástases não depende exclusivamente de factores relacionados com as células tumorais, mas também de características do hospedeiro, em particular do desenvolvimento de uma resposta imunitária^[160]. A imunogenicidade de certos antigénios tumorais e a possibilidade de serem geradas respostas efectoras celulares e/ou humorais podem determinar a viabilidade de um grupo de células neoplásicas. No início do século XX (1909), Paul Erlich referiu-se ao fenómeno de imunovigilância^[283] como um factor limitante da progressão das neoplasias. A importância deste fenómeno torna-se patente no decurso da

imunossupressão após os transplantes de órgãos, contexto em que se observa um aumento do risco de neoplasias cutâneas, incluindo o melanoma^[284].

No entanto, o sistema imunitário pode exercer uma dualidade de funções diante de um tumor: tanto intervém de modo repressivo, induzindo a morte de células tumorais, como pode seleccionar células menos imunogénicas e criar um micro-ambiente permissivo, favorecedor da progressão neoplásica^[285]. Assim, podem distinguir-se três fases distintas da resposta imunitária desencadeada contra uma neoplasia: eliminação, equilíbrio e evasão.

A fase de eliminação consiste no desenvolvimento de mecanismos supressores extrínsecos capazes de conter a proliferação tumoral. A resposta imunitária é iniciada por citocinas (IFN α , IFN β e IFN γ) e por DAMPs libertados por células tumorais necróticas ou por células normais lesadas durante a progressão do tumor. Estas moléculas promovem o recrutamento de células da imunidade inata (células NK, células NKT, células T $\gamma\delta$, macrófagos e células dendríticas) e da imunidade adquirida (linfócitos T CD4 e CD8). As células NK e os macrófagos activam-se mutuamente através da produção de IFN γ e IL-12. As células NK ainda podem ser activadas directamente por células tumorais que expressem NKG2D. São precisamente as células NK que provocam a apoptose das células tumorais através da proteína membrana TRAIL, da perforina e da geração de espécies reactivas de oxigénio e de nitrogénio. Concomitantemente, as células dendríticas fazem a apresentação de antígenos tumorais aos linfócitos T citotóxicos CD8 num processo dependente do auxílio das células T CD4. Os antígenos tumorais em causa podem ser antígenos de diferenciação melanocítica (MART-1, gp100, tirosinase, TRP1, TRP2 e MELOE-1), antígenos de células germinativas (proteínas da superfamília MAGE e NY-ESO-1) e antígenos resultantes de produtos de genes mutados (por exemplo, BRAF)^[285].

A fase de equilíbrio é aquela em que a resposta imunitária controla o crescimento do tumor, embora não seja capaz de o eliminar. As células tumorais podem permanecer num estado de quiescência, influenciadas pelas células T, pela IL-12 e pelo IFN γ , resistindo, porém, à apoptose. Inversamente, podem proliferar de um modo activo e o seu número global ser balanceado por fenómenos apoptóticos^[285].

Finalmente, a fase de evasão corresponde ao período em que as células tumorais proliferam, não obstante a resposta imunitária dirigida contra elas^[285]. Os mecanismos subjacentes a esta evasão imunológica são diversos:

- (i) Fraca imunogenicidade das células tumorais, principalmente por ausência de expressão da molécula adequada do CMH. Segundo Pandolfi *et al.*, a perda de

expressão de CMH da classe I (HLA-A2) por duas linhas celulares de melanoma levou ao não reconhecimento imunológico por parte de linfócitos T autólogos^[286]. Ao invés, a transfecção de cDNA do HLA-A2 para essas células de melanoma restabeleceu a capacidade citotóxica dos linfócitos.

- (ii) Indução de tolerância através da ausência de moléculas co-estimuladoras (CD28, ICOS) ou na presença de moléculas co-inibidoras (CTLA-4, PD-1)^[287,288].
- (iii) Vasos sanguíneos tumorais com perda de expressão de moléculas de adesão, como ICAM-1, limitando a invasão do tumor por linfócitos T citotóxicos^[282].
- (iv) Expressão de Fas-ligando na superfície das células tumorais, capaz de desencadear a apoptose das células T que interagem com o tumor^[288].
- (v) Secreção de citocinas imunossupressoras pelas células de melanoma (TGF β , IL-10, CCL21, etc.)^[285,289].
- (vi) Expressão de HLA-G, o ligando natural dos receptores inibidores das células NK^[290].
- (vii) Intervenção de células imunossupressoras (células T reg CD4+ CD25+ FoxP3+ e células dendríticas plasmocitóides)^[285], cuja função primordial é impedir a activação imunitária desregada e as respostas auto-imunes, sendo um tipo de células particularmente numerosas em doentes com neoplasias.

Além das respostas imunitárias específicas, o desenvolvimento de inflamação crónica é extremamente importante para a progressão do melanoma^[285], uma vez que condiciona a ocorrência de novas mutações através da geração de espécies reactivas de oxigénio e nitrogénio. As células imunitárias que infiltram os tumores libertam citocinas pró-inflamatórias capazes de activar os factores de transcrição NF κ B e STAT-3, controlando a proliferação, a sobrevivência celular, a angiogénese e a invasão. Por essa razão, talvez a presença de infiltrado linfocitário tumoral (TIL), apesar de traduzir uma resposta imunitária activa contra o melanoma, não tenha demonstrado ser um factor preditivo independente de sobrevivência livre de doença ou de sobrevivência global^[291]. Os neutrófilos que infiltram o tumor (TAN) são inclusivamente capazes de promover a migração das células de melanoma através da facilitação das interacções entre moléculas de adesão (MAC-1/ICAM-1)^[285].

A indução de respostas imunitárias dirigidas contra as células de melanoma foi desde há muito tempo explorada do ponto de vista terapêutico. A administração de interferão α (proposto em protocolos de interferão em doses altas, interferão em doses baixas e interferão peguilado) resulta numa destruição tumoral mediada pelo influxo de células T e células

dendríticas. Adicionalmente, exibe efeitos apoptóticos e anti-angiogénicos. Esta substância tem sido utilizada em terapêutica adjuvante em melanomas de alto risco (estadiamento em IIB-C/IIIA-C da AJCC), influenciando positivamente a sobrevivência livre de doença, embora sem benefício na sobrevivência global e à custa de efeitos secundários importantes^[292].

A IL-2 é uma citocina com propriedades estimuladoras sobre as células imunitárias efectoras, promovendo a proliferação de células B, T e NK. O seu uso terapêutico no melanoma metastático encontra-se aprovado pela FDA desde 1998, nunca tendo obtido aprovação na Europa. A taxa de respostas objectivas com este agente é de 16% (com 6% de respostas completas), mas o seu uso comporta um risco considerável de efeitos adversos graves e potencialmente fatais, nomeadamente hipotensão e edema pulmonar^[285].

A terapêutica adjuvante com vacinas no melanoma utiliza diversos tipos de antígenos (péptidos ou gangliósidos) ou células alogénicas de melanoma para elicitar respostas imunológicas com efeito antitumoral. As respostas imunológicas eficazes desencadeadas pelas vacinas peptídicas, embora duradouras, ocorrem apenas numa ínfima proporção de doentes. As vacinas baseadas em células de melanoma revelaram-se decepcionantes: não demonstraram eficácia ou até agravaram o prognóstico, possivelmente por indução de tolerância^[292].

A terapêutica com células adoptivas é outra modalidade de imunoterapia. Utiliza células imunitárias do doente estimuladas *in vitro* na presença de antígenos tumorais. Podem ser utilizadas células dendríticas autólogas, células TIL ou células T geneticamente modificadas (com receptores de células T quiméricos). A eficácia deste tipo de tratamentos, utilizados particularmente no melanoma avançado (doença irrecorrível ou metastática), nunca foi demonstrada em ensaios clínicos randomizados prospectivos^[285].

O anticorpo monoclonal ipilimumab foi a primeira aprovação em mais de uma década no que respeita ao tratamento do melanoma metastático^[293] (a IL-2 tinha sido aprovada em 1998 e a dacarbazina, ainda hoje o fármaco padrão, em 1975). Este anticorpo é dirigido contra o CTLA-4 (CD152). Esta proteína transmembranar dos linfócitos T pertence à superfamília das imunoglobulinas e é homóloga da proteína CD28. Quer o CTLA-4 quer o CD28 são ligandos das proteínas B7-1 e B7-2 (CD80 e CD86) da superfície das células apresentadoras de antígenos. Na apresentação antigénica mediada pelo CMH das células apresentadoras e pelo TCR dos linfócitos T, as proteínas B7-1 e B7-2 exercem uma função co-estimuladora quando interagem com o CD28 ou co-inibidora quando o CD28 é substituído pelo CTLA-4. A função co-estimuladora é constitucional, já que o CD28 é normalmente expresso à

superfície dos linfócitos T, enquanto a função co-inibidora é induzida, dependente da promoção da expressão de CTLA-4. Quando é expresso, o CTLA-4 desloca o CD28, ocupando o seu lugar na ligação a B7-1 e B7-2, para os quais apresenta uma afinidade 10 a 20 vezes superior. No melanoma, a expressão de CTLA-4 é geralmente promovida pelos linfócitos T reg CD4+ CD8+ FoxP3+, sendo determinante no desenvolvimento de tolerância por parte das células T periféricas^[287]. A acção do ipilimumab conduz, pois, à estimulação dos linfócitos T, que se traduz num aumento significativo da taxa de sobrevivência em comparação à vacinação peptídica com gp100 (46% *versus* 25% aos 12 meses e 24% *versus* 14% aos 24 meses). O tremelimumab é outro anticorpo anti-CTLA-4 com mecanismo de acção idêntico e com respostas objectivas de 6,6%. As respostas ao ipilimumab e ao tremelimumab tendem a ser sustentadas e duradouras^[292].

A PD-1 é igualmente uma proteína da superfamília das imunoglobulinas que tem uma função co-inibidora na apresentação antigénica. É expressa à superfície dos linfócitos T activados, linfócitos B, células NKT, monócitos activados e células dendríticas. A interacção com os seus ligandos PD-L1 ou PD-L2 leva à fosforilação de PD-1 nos resíduos de tirosina da porção intracelular da molécula, com subsequente recrutamento da fosfatase SHP-2 e inibição da sinalização desencadeada pelo TCR. A expressão aumentada de PD-L1 é comum no contexto do melanoma e parece ser induzida pelas células neoplásicas através de mecanismos não esclarecidos^[287]. Há actualmente seis inibidores de PD-1 em desenvolvimento para tratamento do melanoma avançado (doença ganglionar irressecável ou doença metastática). O primeiro a entrar num ensaio clínico multicêntrico de fase I foi o anticorpo monoclonal nivolumab (BMS-936559), tendo sido observadas respostas objectivas de longa duração em 6 a 17% dos doentes^[294].

2.3. Factores clínico-patológicos de risco no melanoma

Os factores de prognóstico de ordem clínico-patológica mais importantes variam de acordo com a fase de progressão da doença^[295].

No melanoma localizado (sem metastização ganglionar ou à distância), o prognóstico depende principalmente de:

- (i) Espessura do tumor (medida em milímetros).
- (ii) Índice mitótico (definido histologicamente como mitoses/mm²).

- (iii) Ulceração do tumor primário.

No melanoma com metastização loco-regional (metástases satélites/em trânsito e/ou metástases ganglionares), os factores que agravam o prognóstico são:

- (i) Número de gânglios linfáticos invadidos.
- (ii) Carga tumoral (micrometástases ganglionares *versus* macrometástases).
- (iii) Ulceração do tumor primário.

No melanoma metastático, o prognóstico depende essencialmente do local de metastização (gradativamente pior: metástases não viscerais *versus* metástases pulmonares *versus* outras localizações) e do nível sérico de LDH (valores elevados agravam o prognóstico).

Capítulo III

Material e Métodos

3.1. Introdução

Considerando os objectivos definidos para o presente trabalho, optou-se pela realização de dois estudos paralelos:

- (i) Análise de mutações realizada em amostras de tecido parafinado correspondentes a: (i.1.) melanomas primários e suas metástases loco-regionais provenientes de uma amostra de doentes com melanoma agrupados sob a designação de grupo A e (i.2.) nevos melanocíticos adquiridos provenientes de doentes agrupados sob a designação de grupo B.

- (ii) Estudo clínico retrospectivo que incidiu sobre a amostra de doentes com melanoma definida como grupo A.

O desenho de ambos os estudos foi delineado de acordo com o fluxograma da Figura 9. O estudo genético foi realizado em 2 amostras distintas (grupo A: doentes com melanoma; grupo B: doentes com nevos melanocíticos), enquanto o estudo clínico retrospectivo incidiu apenas numa amostra de doentes com melanoma.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética dos Hospitais da Universidade de Coimbra (actual CHUC) e autorizado por declaração do Conselho de Administração da mesma instituição datada de 30 de Junho de 2008.

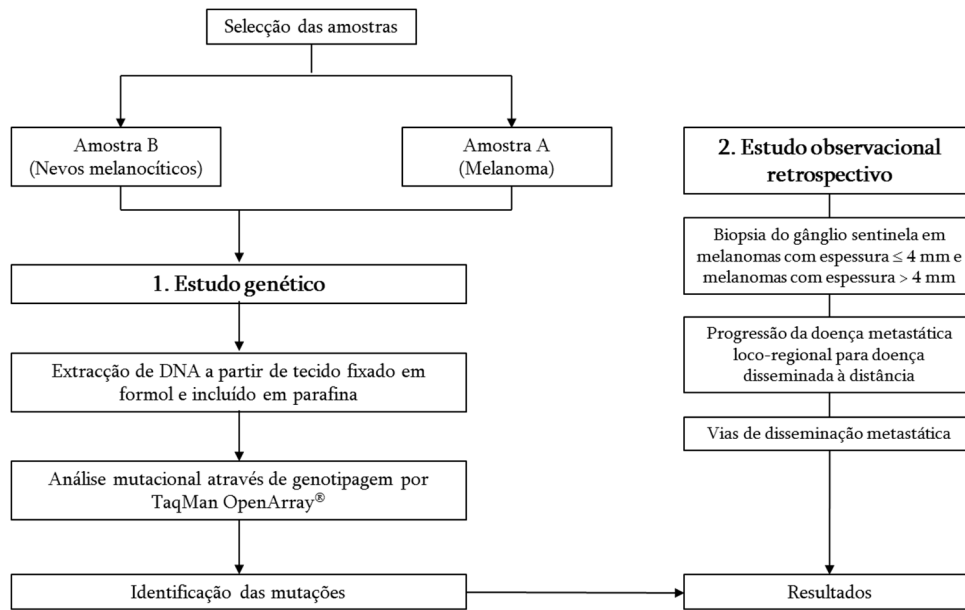


Figura 9. Estratégia global do estudo.

3.2. Selecção de amostras

3.2.1. Grupo A

Foram seleccionados doentes com melanoma admitidos no Serviço de Dermatologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra num período de 8 anos (de 1 de Janeiro de 2000 a 31 de Dezembro de 2007). O intervalo temporal do período de inclusão foi escolhido de acordo com o equilíbrio entre dois critérios: (i) haver um distanciamento razoável do momento actual, permitindo um tempo médio de seguimento suficientemente prolongado, fundamental para o conhecimento da evolução clínica da doença a longo prazo e (ii) não haver um recuo temporal excessivo, garantindo um óptimo estado das amostras incluídas em parafina e, simultaneamente, possibilitar uma extracção de DNA com parâmetros quantitativos e qualitativos adequados a uma genotipagem de boa qualidade.

Os doentes foram seleccionados através de uma pesquisa realizada por código de diagnóstico ICD.9 nos registos informáticos do Serviço de Estatística do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra dentro do período de inclusão mencionado.

Foram incluídos doentes com melanoma cutâneo primário ou com metástases loco-regionais de melanoma submetidos a tratamento durante o período de inclusão.

Foram excluídos os doentes com registo clínico omissos quanto às variáveis clínico-patológicas em avaliação ou que abandonaram o seguimento antes de cumpridos pelo menos 6 meses de observação.

Além disso, ainda foram excluídos do estudo genético os doentes cujos blocos de parafina respeitantes ao tumor primitivo não constavam da histoteca do Serviço de Dermatologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

Os doentes foram identificados através de um código alfanumérico que consistiu num número de ordem antecedido pela letra A (A1, A2, A3, etc.).

3.2.2. Grupo B

Foram seleccionados doentes com nevos melanocíticos excisados no Serviço de Dermatologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra durante o segundo semestre de 2008. A selecção destes doentes foi realizada através de pesquisa por diagnóstico (palavra-chave: “nevo melanocítico”) na base de dados de relatórios histopatológicos do Serviço de Dermatologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

Excluíram-se os doentes dos quais não se dispunha da amostra parafinada de nevo melanocítico armazenada na histoteca do Serviço de Dermatologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra.

Os doentes foram identificados através de um código alfanumérico que consistiu num número de ordem antecedido pela letra B (B1, B2, B3, etc.).

3.3. Estudo genético

3.3.1. Estratégia global

A análise mutacional baseou-se num protocolo pré-determinado que se encontra descrito no fluxograma da Figura 10.

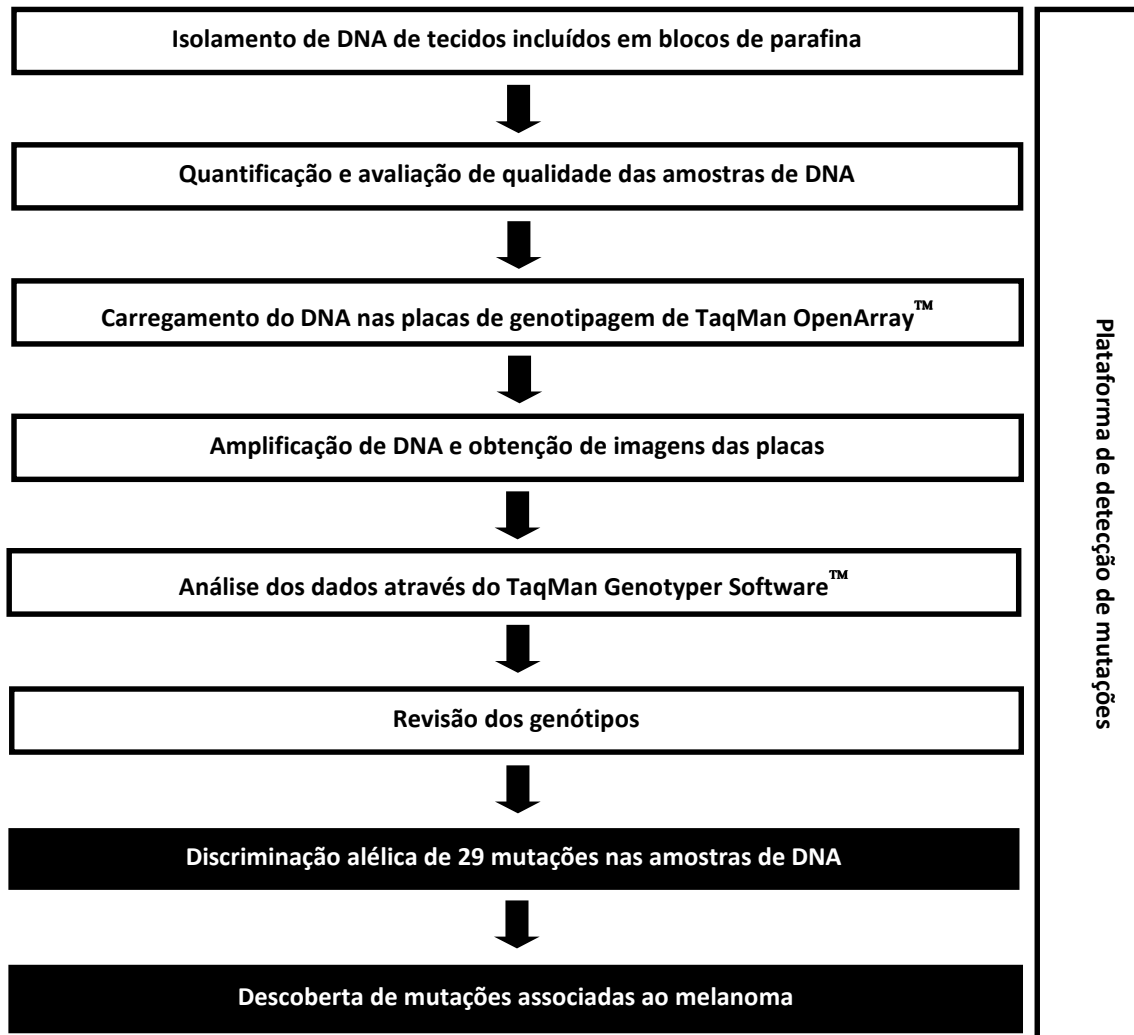


Figura 10. Estratégia da análise mutacional.

3.3.2. Selecção de mutações a testar

A selecção das mutações foi feita de acordo com um estudo de sequenciação genómica realizado por Pleasance *et al.*^[31], em que o DNA de uma linha de células neoplásicas (COLO-829) derivada de um melanoma metastático foi sequenciado usando a tecnologia de análise do genoma Illumina™ GAI. Uma linha celular linfoblastóide derivada do mesmo doente foi também sequenciada e a variante obtida foi subtraída à variante COLO-829, de modo a estabelecer um catálogo de mutações somáticas relativas à população celular neoplásica. Encontraram-se 187 mutações em regiões codificadoras que determinaram alterações na sequência de aminoácidos (mutações não sinónimas). Algumas destas mutações foram avaliadas através de sequenciação convencional de DNA, tendo 62 delas sido confirmadas na variante celular COLO-829.

Para a presente análise, foram escolhidas 29 destas mutações (Tabela III), de acordo com critérios sugeridos pela Life Technologies® Corporation, responsável pela concepção e fabrico da tecnologia de genotipagem utilizada. Esta selecção teve em consideração um critério fundamental: a obtenção previsível de boas taxas de genotipagem, evitando regiões com sequências repetitivas de bases e/ou polimorfismos que não fossem considerados alvos, factos relacionáveis com uma elevada frequência de emparelhamento com as sondas de DNA e com a ocorrência de amplificação genética inespecífica.

Tabela 3. Substituições nucleotídicas seleccionadas para estudo. São indicados o nome do teste, o gene em causa, o nucleótido de referência (Ref.), o nucleótido observado (Obs.), a posição do aminoácido e a alteração ocorrida e o código “Ensemble Transcript ID”

Nome do ensaio	Gene	Ref.	Obs.	Posição	Troca de aminoácidos	Transcript ID
ALS2 Q1303*	ALS2	C	T	202580492	Gln1303Term (CAA>TAA)	ENST00000264276
BAI3 D755N	BAI	G	A	69759168	Asp755Asn (GAT>AAT)	ENST00000370598
BTBD9 R46C	BTBD9	C	T	38565735	Arg46Cys (CGT>TGT)	ENST00000403056
CARD6 L638F	CARD6	C	T	40853346	Leu638Phe (CTC>TTC)	ENST00000254691
DLEC1 D215N	DLEC1	G	A	38101313	Asp215Asn (GAT>AAT)	ENST00000308059
DMRT2 P470S	DMRT2	C	T	1056995	Pro470Ser (CCA>TCA)	ENST00000358146
EPHB4 P346L	EPHB4	C	T	100417439	Pro346Leu (CCC>CTC)	ENST00000358173
GLI1 S11094F	GLI1	C	T	57865804	Ser1094Phe (TCC>TTC)	ENST00000228682
HRB/AGFG1 G340R	HRB/AGFG1	G	A	228398468	Gly340Arg (GGG>AGG)	ENST00000409171
IL1RL1 E294K	IL1RL1	G	A	102959785	Glu294Lys (GAA>AAA)	ENST00000233954
MADD S1561F	MADD	C	T	47350616	Ser1561Phe (TCC>TTC)	ENST00000342922
MEI1 G507E	MEI1	G	A	42141050	Gly507Glu (GGA>GAA)	ENST00000401548
MMP28 G296E	MMP28	G	A	34095359	Gly296Glu (GGA>GAA)	ENST00000338839
MYO9A G2291V	MYO9A	G	T	72122618	Gly2291Val (GGT>GTT)	ENST00000356056
NPSR1 D11H	NPSR1	G	C	34698055	Asp11His (GAT>CAT)	ENST00000359791
PKN1 R185C	PKN1	C	T	14557316	Arg185Cys (CGC>TGC)	ENST00000242783
SERPINA6 R282L	SERPINA6	G	T	94776112	Arg282Leu (CGG>CTG)	ENST00000341584
SMARCAD1 V890D	SMARCAD1	T	A	95202678	Val890Asp (GTT>GAT)	ENST00000457823
SPO11 G50S	SPO11	G	A	55908260	Gly50Ser (GGT>AGT)	ENST00000371260
STK19 D89N	STK19	G	A	31940123	Asp89Asn (GAC>AAC)	ENST00000375331
STK19 W285*	STK19	G	A	31948279	Trp285Term (TGG>TGA)	ENST00000375331
TNFRSF8 P215S	TNFRSF8	C	T	12170228	Pro215Ser (CCC>TCC)	ENST00000263932
TP63 M499I	TP63	G	T	189604330	Met499Ile (ATG>ATT)	ENST00000264731
TRAPPC10 G983D	TRAPPC10	G	A	45511881	Gly983Asp (GGT>GAT)	ENST00000291574
TTBK1 P855S	TTBK1	C	T	43251041	Pro855Ser (CCC>TCC)	ENST00000259750
UVRAG N561K	UVRAG	C	A	75852040	Asn561Lys (AAC>AAA)	ENST00000356136
XIRP2 G127R	XIRP2	G	A	167760371	Gly127Arg (GGA>AGA)	ENST00000409195
ZBTB41 F164V	ZBTB41	T	G	197169114	Phe164Val (TTT>GTT)	ENST00000367405
ZNF217 P651S	ZNF217	C	T	52193352	Pro651Ser (CCG>TCG)	ENST00000302342

3.3.3. Colheita das amostras de tecido

Os blocos de parafina correspondentes aos doentes seleccionados para o estudo, armazenados no arquivo do Serviço de Dermatologia do Centro Hospitalar e Universitário

de Coimbra, foram preparados de acordo com a premissa de garantir o envio de uma quantidade de tecido suficiente para uma extracção de DNA com qualidade e quantidade satisfatórias. Assim, foram efectuados cortes com uma espessura de 6 μm (pelo menos 10 cortes por bloco), usando-se para o efeito um micrótomo Leica[®] RM2145. Em cada uma das secções, removeu-se o excesso de parafina com uma lâmina de bisturi n.º 11. No caso de melanomas primários ou de metástases de melanoma excisadas com margem cirúrgica, usou-se o mesmo método para remover o excesso de tecido normal das margens, de modo a otimizar a proporção de células tumorais.

Os cortes foram acondicionados em tubos de microcentrifuga Eppendorf[®] de 2 mL (um tubo por amostra) que foram identificados de acordo com um código alfanumérico constituído sequencialmente por:

- (i) Letra maiúscula definidora da natureza da amostra (A para melanoma cutâneo primário, B para metástase cutânea satélite/em trânsito, C para metástase ganglionar e D para nevo melanocítico).
- (ii) Número de ordem.

Depois de colhidas, acondicionadas e identificadas, as amostras foram enviadas para o laboratório (Biocant – Centro de Inovação em Biotecnologia, Unidade de Serviços Avançados, Cantanhede).

3.3.4. Isolamento do DNA

As amostras de DNA foram isoladas através da tecnologia QIAamp DNA FFPE Tissue Kit[™] (QIAGEN[®]). Trata-se de uma tecnologia especialmente concebida para purificação de DNA a partir de peças de tecido fixadas em formol e incluídas em blocos de parafina. Esta tecnologia permite a libertação eficaz do DNA a partir de secções de tecido parafinado, promove a quebra das ligações cruzadas induzidas nos ácidos nucleicos pela fixação com formol e possibilita, em última análise, a obtenção de DNA de elevada qualidade^[296].

O processo de extração é realizado através de um protocolo (Tabela 4) que inclui diferentes passos sequenciais (lise rápida – ligação – lavagem – eluição), podendo efectuar-se manualmente ou através da plataforma robotizada automática QIAcube[™].

Tabela 4. Protocolo do processo de extracção de DNA (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit™).

1. Adição de 1 mL de xileno ao tubo de microcentrifuga e agitação vigorosa durante 10 s.
2. Centrifugação a velocidade máxima durante 2 m à temperatura ambiente.
3. Remoção do sobrenadante por pipetagem, deixando o sedimento no tubo.
4. Adição de 1 mL de etanol a 100% e mistura por agitação.
5. Centrifugação a velocidade máxima durante 2 m à temperatura ambiente.
6. Remoção do sobrenadante por pipetagem, deixando o sedimento no tubo.
7. Remoção cuidadosa do etanol residual usando uma ponta de pipeta fina.
8. Abertura do tubo e incubação a temperatura ambiente (15-25°C) durante 10 m ou até que o etanol residual evapore.
9. Adição de 180 µL de tampão ATL e 20 µL de proteinase K, misturando por agitação.
10. Incubação a 56°C durante 1 h (com o objectivo de lisar a amostra).
11. Incubação a 90°C durante 1 h (com o objectivo de reverter parcialmente as modificações dos ácidos nucleicos induzidas pelo formol da fixação).
12. Breve centrifugação para remover gotas depositadas no lado interno da tampa do tubo.
13. Adição de 2 µL de RNAase A (100 mg/mL) e incubar a temperatura ambiente durante 2 m.
14. Adição de 200 µL de tampão AL e de 200 µL de etanol e misturar por agitação.
15. Breve centrifugação para remover gotas depositadas no lado interno da tampa do tubo.
16. Transferência da totalidade da amostra lisada para a coluna QIAamp MinElute™ e centrifugação a 8000 rpm durante 1 m. Colocação da coluna QIAamp MinElute™ num tubo colector de 2 mL limpo.
17. Abertura da coluna QIAamp MinElute™, adição de 500 µL de tampão AW1 e centrifugação a 8000 rpm durante 1 m. Colocação da coluna QIAamp MinElute™ num tubo colector de 2 mL limpo.
18. Abertura da coluna QIAamp MinElute™, adição de 500 µL de tampão AW2 e centrifugação a 8000 rpm durante 1 m. Colocação da coluna QIAamp MinElute™ num tubo colector de 2 mL limpo.
19. Centrifugação a 14000 rpm durante 3 m para secar completamente a membrana.
20. Colocação da coluna QIAamp MinElute™ num tubo colector de 1,5 mL limpo. Abertura da tampa da coluna QIAamp MinElute™ e aplicação de 20-100 µL de tampão ATE no centro da membrana.
21. Encerramento da tampa e incubação à temperatura ambiente (15-25°C) durante 1 m.
22. Centrifugação a 14.000 rpm durante 1 m.

3.3.5. Preparação e controlo de qualidade das amostras de DNA

A quantificação de ácidos nucleicos purificados a partir das amostras é um processo que, através do cálculo da concentração média de DNA obtida, bem como do seu grau de pureza, visa garantir que a quantidade de ácidos nucleicos presentes é a requerida pelos métodos de análise propostos.

No presente trabalho, a quantificação de DNA foi efectuada através das análises espectrofotométrica e fluorimétrica.

A espectrofotometria baseia-se na propriedade dos ácidos nucleicos absorverem luz ultravioleta (UV). Assim, após exposição a determinada intensidade de luz UV (I_0 , ou luz incidente), quanto menor for a intensidade de luz que se mede através da amostra (I_t , ou luz transmitida), maior será a concentração de ácidos nucleicos da mesma, considerando que uma maior quantidade de ácido nucleicos provocará uma maior queda na radiação incidente que atravessa a amostra (absorvância ou densidade óptica).

A absorvância (A) dos ácidos nucleicos em relação a determinado comprimento de onda (λ) pode ser determinada através da equação:

$$A_{\lambda} = -\log_{10} \left(\frac{I_t}{I_0} \right)$$

Desta forma, sabendo-se pela lei de Beer-Lambert que a concentração de uma substância varia de forma previsível em função da absorvância, pode estimar-se com precisão a concentração de DNA.

Os rácios entre absorvâncias a diferentes comprimentos de onda podem ser preditivos de contaminação por substâncias estranhas usadas no processo de purificação ou por compostos orgânicos diferentes dos ácidos nucleicos (por exemplo, proteínas). Um rácio $A_{260/230}$ inferior a 1,7 relaciona-se geralmente com a presença de contaminantes com elevada absorvância a 230 nm. A causa habitual é a presença de resíduos de fenol utilizado no processo de extração de DNA ou, eventualmente, a presença de glicogénio usado para precipitar os ácidos nucleicos e, a ocorrer, prejudicará ou impossibilitará a amplificação e a genotipagem.

Um rácio $A_{260/280}$ inferior a 1,7 também se pode relacionar com a presença de contaminantes externos como o fenol, mas é mais frequentemente observado em amostras

com concentração de DNA muito baixa ($< 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$) e com elevada contaminação por proteínas.

As medições das absorvâncias para cálculo dos rácios $A_{260/230}$ e $A_{260/280}$ das amostras em estudo foram realizadas com recurso a um espectrofotómetro NanoDrop®.

Para garantir uma quantificação precisa do DNA e possibilitar uma normalização correcta das amostras, realizou-se uma quantificação por fluorimetria, de modo a superar a contribuição relativa de nucleótidos e de DNA de cadeia única na concentração de DNA medida por espectrofotometria e a incapacidade deste último método distinguir o DNA do RNA.

O método fluorimétrico baseia-se na utilização de corantes fluorescentes com afinidade para os ácidos nucleicos. A fluorescência das amostras pode ser avaliada através de um espectrofluorómetro ou de um leitor de fluorescência em microplacas, comparando os valores registados com curvas de fluorescência respeitantes a concentrações conhecidas de DNA.

A tecnologia usada para realizar a fluorimetria das amostras do presente trabalho foi a PicoGreen dsDNA Quantitation Reagent™ (Molecular Probes® Inc., Eugene, Oregon). Nesta técnica, a quantificação de DNA de cadeia dupla não é significativamente influenciada pela presença de DNA de cadeia simples ou de RNA, mesmo em concentrações equimolares destes tipos de ácidos nucleicos. O protocolo da quantificação de DNA foi pormenorizado na Tabela 5. As curvas-padrão para esta quantificação foram obtidas de acordo com os protocolos das Tabelas 6 e 7.

A concentração de DNA recomendada para a realização da genotipagem é de $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (num volume constante por cada placa), mas testes preliminares realizados com concentrações inferiores conduziram à observação de que valores de 15 a $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ também permitem boas taxas de sucesso na genotipagem. Assim, as amostras com concentrações de DNA inferiores a $15 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ou com rácios de absorvância inferiores a $1,7$ foram concentradas e purificadas por precipitação com glicogénio e isopropanol.

Apenas as amostras com concentração final de DNA igual ou superior a $15 \text{ ng}/\mu\text{L}$ e rácios de absorvância iguais ou superiores a $1,6$ foram consideradas para análise genotípica.

Tabela 5. Protocolo da quantificação fluorimétrica do DNA (Quant-IT PicoGreen™).

1. Preparação do tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,5): diluição de 20 vezes com água destilada.
2. Preparação do reagente Quant-IT PicoGreen™ concentrado em DMSO: diluição de 200 vezes em tampão TE.
3. Diluição da solução *DNA standard* (componente C) 100 vezes em tampão TE para criar uma solução de dsDNA a 2µg/mL, a partir da qual se podem obter as curvas-padrão de fluorescência do DNA de cadeia dupla.
4. Preparação de diferentes concentrações de dsDNA por diluição em solução de reagente Quant-IT PicoGreen™ (ver Tabelas V e VI), com o objectivo de obter as curvas-padrão de gama alta e de gama baixa (5 pontos por curva). Colocação destas soluções em *cuvettes* com caminho óptico de 10 mm.
5. Incubação à temperatura ambiente durante 2 a 5 m.
6. Fluorimetria com espectrofluorómetro usando comprimentos de onda padrão para a fluoresceína (excitação a ≈ 480 nm e emissão a ≈ 520 nm)
7. Obtenção dos valores de fluorimetria corrigidos por subtracção da fluorescência de cada uma das soluções à da solução branca.
8. Geração das curvas-padrão usando os valores fluorimétricos corrigidos.
9. Preparação das amostras de DNA purificado das peças parafinadas dos doentes, diluindo-as em tampão TE até perfazer volume de 1 mL.
10. Adição de 1mL de reagente Quant-IT PicoGreen™.
11. Incubação à temperatura ambiente durante 2 a 5 m.
12. Medição da fluorescência da amostra usando parâmetros instrumentais semelhantes aos planeados para a geração das curvas-padrão.
13. Subtracção do valor fluorimétrico da amostra ao da solução branca.
14. Determinação da concentração de DNA da amostra a partir das curvas-padrão.

DMSO: Di-metil-sulfóxido.

Tabela 6. Protocolo para obtenção da curva-padrão de alta gama da concentração de DNA.

Volume (µL) de tampão TE	Volume (µL) da solução de DNA a 2µg/mL	Volume (µL) da solução de reagente Quant-IT PicoGreen™	Concentração final de DNA
0	1000	1000	1 µL
900	100	1000	100 ng/mL
990	10	1000	10 ng/mL
999	1	1000	1 ng/mL
1000	0	1000	Branco

Tabela 7. Protocolo para obtenção da curva-padrão de baixa gama da concentração de DNA.

Volume (µL) de tampão TE	Volume (µL) da solução de DNA a 50 ng/mL	Volume (µL) da solução de reagente Quant-IT PicoGreen™	Concentração final de DNA
0	1000	1000	25 ng/mL
900	100	1000	2,5 ng/mL
990	10	1000	250 ng/mL
999	1	1000	25 pg/mL
1000	0	1000	Branco

3.3.6. Genotipagem

A genotipagem foi realizada através da plataforma TaqMan OpenArray Genotype System® (Life Technologies Corporation), que proporciona uma análise de centenas de variantes genéticas em amostras de DNA através da utilização de sondas TaqMan™ e amplificação pela reacção em cadeia da polimerase convencional (*end point PCR*). Através desta tecnologia, a PCR e a discriminação alélica são realizadas na mesma reacção.

A genotipagem por sondas TaqMan™ é um processo de discriminação alélica baseado em PCR convencional usado para determinar o genótipo, diferenciando os dois alelos de um determinado gene.

A análise genotípica por sondas TaqMan™ (nome derivado da polimerase Taq e do jogo de vídeo Pac-Man™), baseia-se na actividade da polimerase de DNA como exonuclease 5'-3', clivando sondas específicas marcadas com fluoróforos quando estas estão hibridizadas com sequências complementares de DNA. Assim, a PCR é realizada com uma sonda específica de cada um dos dois alelos (uma do alelo normal e outra do alelo mutado). Cada sonda está marcada com um fluoróforo diferente, capaz de uma discriminação bastante precisa. O

fluoróforo (repórter) está ligado à extremidade 5' da sonda e, ainda que estimulado pela fonte de luz do termociclador, não emite fluorescência enquanto estiver na proximidade (10 a 100 Å) de um extintor (*quencher*) ligado à extremidade 3' da sonda. Este fenómeno, conhecido por transferência de energia do tipo Förster ou FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), ocorre devido à transferência de energia entre o fluoróforo excitado (“dador”) e a molécula extintora (“receptor”), fazendo com que o fluoróforo regresse ao estado fundamental e não emita fluorescência^[297].

Após separação da dupla cadeia de DNA por desnaturação, a reacção de polimerização é iniciada por duas sequências oligonucleotídicas iniciadoras (*primers*) que se emparelham com a fita de DNA, uma em sentido *sense* e a outra em sentido *antissense*. Durante esta fase de emparelhamento, as sondas TaqMan™ ligam-se às respectivas sequências complementares entre os dois iniciadores. A polimerase de DNA inicia, então, a fase de extensão, sintetizando a nova molécula de DNA de cadeia dupla. No entanto, assim, que encontra as sondas TaqMan™, a polimerase exibe a sua acção de exonuclease e cliva a extremidade 5' da sonda, libertando o fluoróforo e afastando-o da substância extintora (*quencher*). Sem a possibilidade de transferir energia para o extintor, o fluoróforo excitado emite sinais fluorescentes que são detectáveis e mensuráveis, indicando que o alelo respectivo está presente na amostra.

Quanto menor a complementaridade da sonda TaqMan™ em relação à sequência alvo, menor a probabilidade de haver hibridização. No caso de não haver hibridização ou desta ser incompleta, a polimerase desloca simplesmente a sonda em vez de a clivar, evitando a geração do sinal fluorescente (Fig. 11).

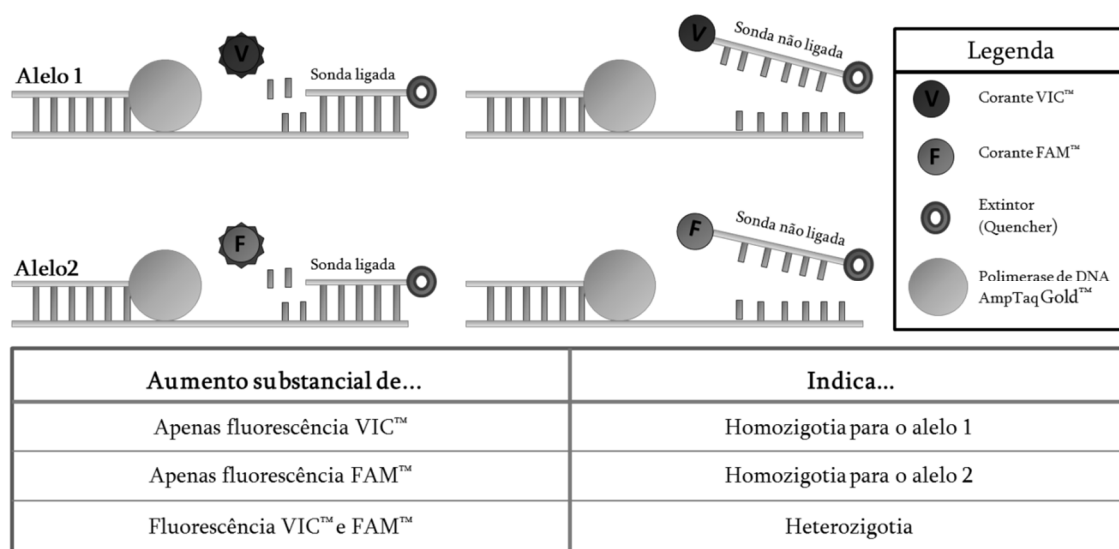


Figura 11. Hibridização das sondas durante a genotipagem. A tabela sumariza os resultados possíveis.

A plataforma TaqMan OpenArray Genotype System™ engloba duas tecnologias de alta qualidade: TaqMan Genotyping Assay™ e OpenArray™.

O processo TaqMan Genotyping Assay™ utiliza dois iniciadores (*primers*) e duas sondas MGB (*minor groove binder*, tripeptídeo de di-hidrociclopirrolo-indol). Cada uma das sondas MGB contém um repórter fluorescente distinto capaz de diferenciar cada alelo de uma forma extremamente fidedigna e precisa: VIC™ (absorvância máxima a 538 nm e emissão máxima a 554 nm) e FAM™ (5-carboxifluoresceína, absorvância máxima a 492 nm e emissão máxima a 518 nm). O ligando MGB é a porção da sonda que funciona como molécula extintora de fluorescência (*quencher*), capaz de inibir a fluorescência emitida pelo fluoróforo enquanto este se mantiver ligado à extremidade 5' da sonda.

A tecnologia OpenArray™ é uma plataforma que permite analisar volumes de solução de DNA na ordem dos nanolitros, permitindo um elevado rendimento das amostras e uma menor utilização de reagentes. Utiliza placas de genotipagem de densidade média com dimensões de 63 x 19 mm. Em cada placa existem 3072 orifícios de 33 nL para a realização de outros tantos ensaios TaqMan™.

No presente trabalho foram usadas placas de formato 32, capazes de suportar 32 reacções TaqMan™ distintas, quantidade suficiente para as 29 mutações em estudo. Os reagentes para a detecção das mutações seleccionadas (29 ensaios) foram concebidos, fabricados e pré-carregados nos orifícios das placas de genotipagem pela Life Technologies®. Puderam ser testadas 96 amostras simultaneamente em cada placa.

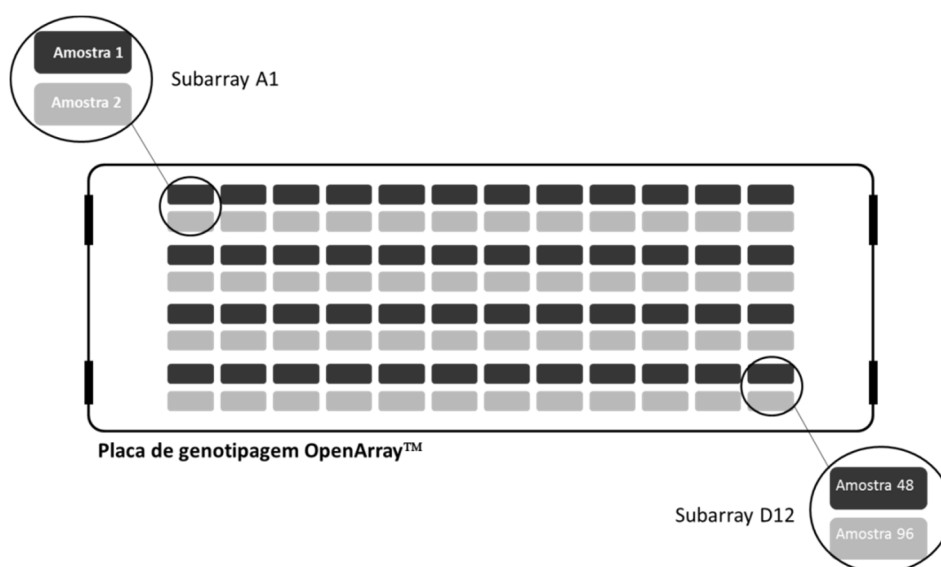


Figura 12. Carregamento das amostras na placa de genotipagem (OpenArray™).

Sempre que possível, as amostras de DNA foram normalizadas para 20 ng/ μ L. Utilizaram-se 60 ng para a genotipagem simultânea das 29 mutações e cada amostra foi genotipada pelo menos três vezes.

Foram incluídos dois controlos por placa para a determinação dos *clusters* de genotipagem e para verificar a presença de potenciais contaminantes.

Antes do carregamento das amostras, adicionou-se TaqMan OpenArray Master Mix™ às amostras normalizadas de DNA (1:1). O carregamento das amostras (Fig. 12) foi efectuado com o auxílio do dispositivo OpenArray Accuffil™ (Applied Biosystems®).

Após o carregamento, a placa foi colocada numa caixa TaqMan OpenArray™, preenchendo-se o interior com fluido de imersão TaqMan OpenArray™. A caixa foi selada com cola TaqMan OpenArray™ na plataforma Open Array Case Sealing Station™ (Applied Biosystems®), desenvolvida e validada para a realização eficiente e precisa da PCR.

A PCR decorreu de acordo com o protocolo pré-programado (Tabela 8) na plataforma automatizada Dual Flat Block GeneAmp System 9700™ (Applied Biosystems®).

Tabela 8. Protocolo da reacção em cadeia da polimerase (placas TaqMan OpenArray™ no sistema termociclador Dual Flat Block GeneAmp System 9700™).

Fase	Passo	Temp °C	Tempo (min:seg)	Δ °C/s (%)	Repetições
1. Pré-PCR	1	93,0	10:00	100	—
2. Ciclos de PCR	1	95,0	00:45	84	50 ciclos
	2	94,0	00:13	100	
	3	53,0	02:14	44	
3. Pós-PCR	1	25,0	02:00	100	—

A geração de imagens a partir das placas, ou seja, a aquisição de genótipos, foi efectuada através do OpenArray NT Imager™, com o auxílio do *software* OpenArray SNP Genotyping Analysis™ (Applied Biosystems®). Durante a aquisição de imagens, o OpenArray NT Imager™ detecta e regista a quantidade de fluorescência emitida por cada orifício da placa. Os dados recolhidos foram exibidos de forma gráfica (Fig. 13).

A análise dos dados foi efectuada através do *software* TaqMan Genotyper™ no modo automático, embora se tenha processado à revisão manual e eventual correcção de todos os genótipos.

Utilizou-se como controlo a base de dados 1000 Genomes Data™, representativa da frequência de variantes genéticas na Europa (trata-se de um catálogo de variantes genéticas humanas baseado num mapa integrado de 1092 genomas), para determinar o significado clínico das mutações encontradas. O potencial patogénico das mutações em estudo foi ainda estimado através dos *softwares* ANNOVAR™ e SIFT™, avaliando-se a probabilidade de estarem associadas a doença^[298,299]. A ferramenta informática ANNOVAR™ utiliza informação actualizada acerca de variantes genéticas do genoma, identificando aquelas que causam alterações do código proteico e quais os aminoácidos envolvidos. Adicionalmente, o *software* SIFT™ permite prever se uma determinada alteração na sequência de aminoácidos afecta a função da proteína em causa.

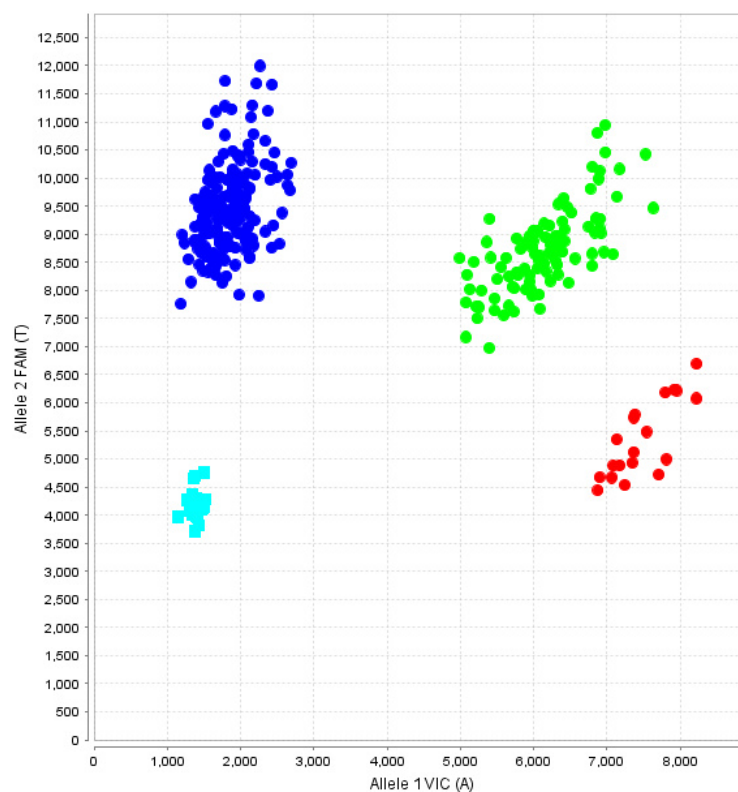


Figure 13. Resultado de um ensaio de genotipagem. Cada ponto colorido representa uma amostra. A cor de cada ponto indica o genótipo detectado pelo *software*: azul – homocigotia para o alelo detectado pelo fluoróforo FAM (TT), verde – heterocigotia para os alelos detectados pelos fluoróforos FAM e VIC (TA), vermelho – homocigotia para o alelo detectado pelo fluoróforo VIC (AA) e ciano – controlos.

Foram excluídas do estudo genético todas as amostras cuja taxa de genotipagem foi inferior a 60%, ou seja, em que não se obtiveram pelo menos 18 genotipagens nos 29 ensaios realizados. A exclusão de amostras de tumor primário (grupo A) ou de nevo melanocítico adquirido (grupo B) foi critério para a retirada desses casos do estudo.

A análise dos genótipos foi realizada de acordo com o objectivo de determinar a prevalência das mutações em estudo e de inferir se estas fazem parte de eventos mutacionais cumulativos associados à progressão da doença. A ocorrência destas mutações no grupo amostral A (melanomas) foi avaliada comparativamente com os resultados observados no grupo amostral B (nevos melanocíticos).

3.4. Estudo clínico retrospectivo

Foi realizada uma revisão retrospectiva dos registos clínicos dos doentes do grupo A (melanoma), registando-se as seguintes variáveis clínico-patológicas:

- Sexo.
- Idade (anos).
- Grupo etário (0-20 anos, 21-40 anos, 41-60 anos, 61-80 anos e >80 anos).
- Localização do melanoma (cabeça e pescoço, tronco, membro superior, membro inferior e não classificado).
- Tipo anátomo-clínico de melanoma (lêntigo maligno, melanoma de crescimento superficial, melanoma acral, melanoma nodular e outros).
- Espessura do melanoma (mm).
- Ulceração do melanoma primário.
- Realização de biopsia selectiva do gânglio sentinela.
- Estado do gânglio sentinela.
- Metastização satélite/em trânsito.
- Metastização ganglionar regional.
- Metastização à distância.
- Progressão da doença loco-regional para doença à distância.
- Primeiro foco metastático (metástases satélites/em trânsito, metástases ganglionares ou metástases distantes).

- Vias metastáticas (via A: metástases satélites/em trânsito com ou sem metastização ganglionar subsequente a anteceder a metastização distante; via B: metastização ganglionar a anteceder a metastização distante; via C: metastização distante não precedida por doença loco-regional).
- Mortalidade por melanoma.
- Tempo de evolução até ao aparecimento de metástases distantes.
- Tempo de seguimento até à morte ou à última observação.

A análise das variáveis colhidas da amostra em estudo incidiu sobre os seguintes aspectos:

- Avaliação de factores clínico-patológicos com influência no prognóstico, particularmente factores preditivos de metastização loco-regional e à distância.
- Avaliação da utilidade da biopsia do gânglio sentinela na abordagem de melanomas de espessura elevada (>4 mm).
- Avaliação de factores preditivos de progressão da doença loco-regional (definida como metastização distante nos doentes com doença loco-regional activa ou previamente ressecada).
- Avaliação do impacto da progressão da doença loco-regional na sobrevivência.
- Avaliação de factores determinantes da via de metastização do melanoma.
- Avaliação do tempo de sobrevivência livre de metástases à distância de acordo com a via de metastização.
- Avaliação do tempo de sobrevivência global de acordo com a via de metastização.

3.5. Tratamento estatístico dos dados

O tratamento estatístico dos dados foi realizado com o auxílio do *software* IBM® SPSS® Statistics, versão 20.

A frequência de variáveis nominais em 2 grupos distintos, expressa em tabelas de contingência 2x2, foi comparada pelo teste do χ^2 . O teste exacto de Fisher foi utilizado nas tabelas de contingência 2x2, quando a frequência esperada de pelo menos uma célula foi inferior a 5. A associação entre variáveis foi avaliada através do *odds ratio* (OR), calculando-se os intervalos de confiança (IC) para um nível de confiança de 95%. O teste do χ^2 foi igualmente utilizado na comparação da distribuição de variáveis nominais em mais de 2

grupos. Recorreu-se ao método de Monte Carlo sempre que, nestas circunstâncias, a frequência esperada foi inferior a 5 em pelo menos uma célula da tabela de contingência.

Na comparação de dois grupos em função de uma variável ordinal aplicou-se o teste de Mann-Whitney, tendo-se preferido o teste de Kruskal-Wallis quando se pretendeu comparar mais de dois grupos.

Para avaliar a associação entre duas variáveis, sendo uma delas de natureza ordinal, utilizou-se a correlação não linear de Spearman.

A comparação estatística da distribuição de variáveis quantitativas entre dois grupos diferentes foi realizada através do teste T de Student. No caso da distribuição da variável quantitativa não corresponder à distribuição normal, optou-se por um teste não paramétrico (teste de Mann-Whitney). Quando se pretendeu estabelecer comparações entre mais de dois grupos relativamente à distribuição de uma variável quantitativa, utilizou-se o teste ANOVA de um factor ou, na presença de variáveis com distribuição diferente da normal, preferiu-se um teste não paramétrico (teste de Kruskal-Wallis).

A avaliação da influência de variáveis dependentes sobre uma determinada variável categórica binária foi realizada com recurso à regressão logística. O OR para cada variável foi calculado com um IC de 95%. A qualidade do ajuste do modelo de regressão logística foi avaliada através do teste de Hosmer e Lemeshow.

O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para verificar a hipótese de uma determinada variável quantitativa ter distribuição normal, de modo a seleccionar o teste estatístico adequado para comparar médias entre grupos distintos.

Desenharam-se curvas de sobrevivência de acordo com o método de Kaplan-Meier. A comparação estatística entre as curvas foi realizada através do teste *log-rank* de Mantel-Cox.

A regressão de Cox foi usada na avaliação da influência de variáveis dependentes sobre as curvas de sobrevivência. O risco conferido por dada variável foi avaliado através do *hazard ratio* (HR), calculando-se os intervalos de confiança para um nível de confiança de 95%.

A sobrevivência livre de doença foi definida como a data de diagnóstico do melanoma subtraída à data de diagnóstico da primeira recorrência, independentemente de se tratar de recorrência local, regional ou distante. A sobrevivência global foi definida como a data de diagnóstico do melanoma subtraída à data de morte do doente. A sobrevivência a partir da metastização distante foi definida como a data de diagnóstico da primeira metástase distante subtraída à data de morte do doente.

O nível de significância definido para os testes estatísticos aplicados foi de 5% ($p < 0,05$).

Capítulo IV

Resultados

4.1. Estudo genético

4.1.1. Composição da amostra (grupo A)

Foram seleccionados 224 doentes com melanoma para a amostra designada por grupo A (Fig. 14), tendo-se excluído um caso por registos clínicos incompletos e 15 por abandono precoce do seguimento (<6 meses). A amostra resultante (n=208) foi alvo dos estudos genético e observacional retrospectivo (taxa de exclusão de 7,1%).

Cento e vinte e sete doentes foram excluídos do estudo genético devido a: (i) indisponibilidade de amostra de tecido do tumor primário para avaliação em virtude da biopsia excisional ter sido realizada noutra serviço hospitalar (n=97) ou por se tratar de melanoma primário oculto (n=3), (ii) obtenção de concentrações de DNA e/ou rácios de absorvância inadequados para a genotipagem a partir das amostras de tecido do melanoma primário (n=19), e (iii) menos de 18 genotipagens realizadas com êxito nos 29 ensaios, ou seja, uma taxa de genotipagens bem sucedidas inferior a 60% (n=8). Deste modo, restaram 81 doentes para a análise mutacional proposta (taxa de exclusão de 63,8%).

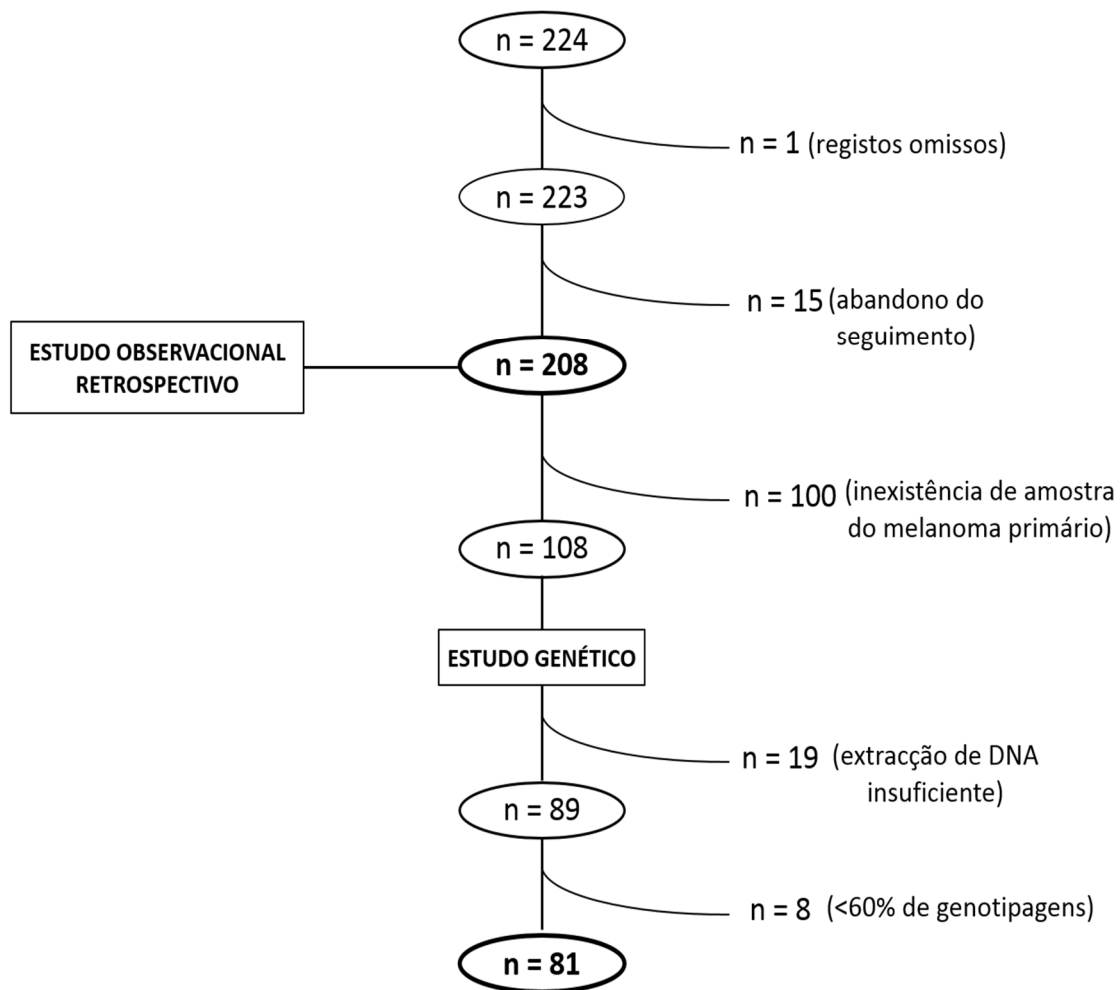


Figura 14. Grupo A (melanoma): selecção da amostra para os estudos genético e clínico retrospectivo.

4.1.2. Composição da amostra (grupo B)

Seleccionaram-se 70 doentes com nevos melanocíticos para o grupo B (Fig. 15). Foram excluídos quatro doentes em virtude do bloco de parafina da peça de excisão do nevo melanocítico não se encontrar disponível para avaliação. Excluíram-se 32 doentes devido à impossibilidade de isolar DNA em quantidade e qualidade necessárias à genotipagem das respectivas amostras de tecido. Ocorreu, ainda, a exclusão adicional de 6 casos devido à taxa de genotipagens bem sucedidas ter sido inferior a 60%. Assim, o número de casos do grupo B estabeleceu-se em 28 (taxa de exclusão de 60%).

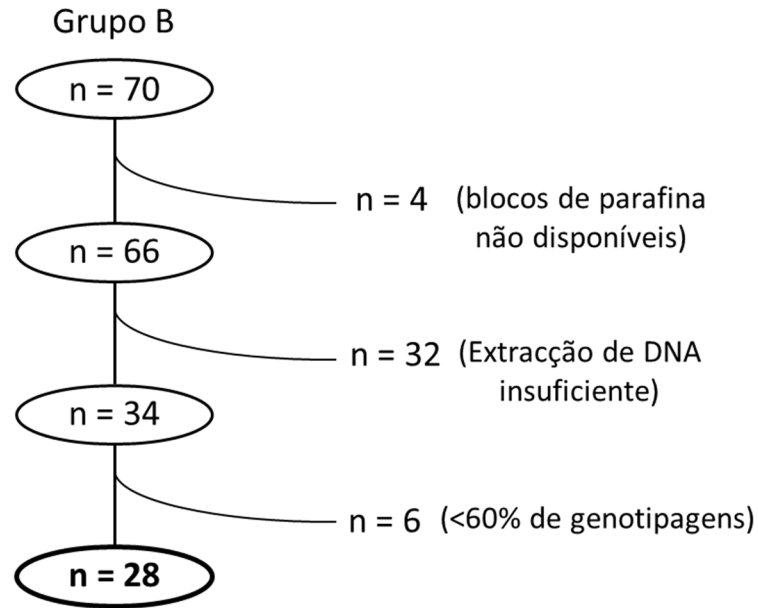


Figura 15. Grupo B (nevus melanocíticos): selecção da amostra para estudo genético.

4.1.3. Caracterização dos grupos amostrais

Houve predomínio de doentes do sexo feminino em ambos os grupos. A média etária foi de 62,6 anos (25-95 anos) nos doentes com melanoma e de 33,2 anos (4-88 anos) nos doentes com nevus melanocíticos adquiridos (Tabela 9).

Tabela 9. Distribuição grupos amostrais em função do sexo e da idade.

	SEXO		IDADE (anos)		
	Feminino	Masculino	Média	Mediana	Desvio-padrão
Grupo A	47 (58%)	34 (42%)	62,6	66,0	17,4
Grupo B	19 (67,9%)	9 (32,1%)	33,2	30,0	20,0

Nos melanomas genotipados predominaram os melanomas nodulares (38%), seguidos pelos melanomas acrais (27%) e pelos melanomas de crescimento superficial (26%). Os lântigos malignos representaram apenas 5% dos casos e outros tipos de melanoma corresponderam a 4% (Tabela 10).

Tabela 10. Localização e tipo dos melanomas submetidos a estudo genético.

	Frequência (n)	Porcentagem (%)
Localização do melanoma		
Cabeça e pescoço	16	19,8%
Tronco	16	19,8%
Membro superior	9	11,1%
Membro inferior	38	46,9%
Não classificado	2	2,5%
Total	81	100%
Tipo de melanoma		
Lêntigo maligno	4	4,9%
Melanoma crescimento superficial	21	25,9%
Melanoma acral	22	27,1%
Melanoma nodular	31	38,3%
Outros	3	3,7%
Total	81	100%

A localização mais comum dos melanomas analisados foi o membro inferior (47%), seguida respectivamente pelo tronco (20%), cabeça e pescoço (20%) e membro superior (11%). Nos casos remanescentes (2%) a localização do tumor não estava devidamente identificada nos processos clínicos consultados (Tabela 10).

Tabela 11. Localização e tipo dos nevos melanocíticos submetidos a estudo genético.

	Frequência (n)	Porcentagem (%)
Localização do nevo melanocítico		
Cabeça e pescoço	10	35,7%
Tronco	10	35,7%
Membro superior	4	14,3%
Membro inferior	4	14,3%
Total	28	100%
Tipo de nevo melanocítico		
Juncional	2	7,1%
Composto	7	25%
Dérmico	18	64,3%
Outros	1	3,6%
Total	28	100%

Os nevos melanocíticos adquiridos avaliados foram maioritariamente nevos dérmicos (64%). Os nevos compostos, juncionais e outros representaram respectivamente 25%, 7% e 4% (Tabela 11). As localizações predominantes dos nevos melanocíticos submetidos a estudo genético foram o tronco e a cabeça e pescoço. Cada uma destas áreas anatómicas correspondeu a 36% dos casos, assim como os membros inferiores e os membros superiores foram, respectivamente, as localizações de 14% das lesões (Tabela 11).

4.1.4. Amostras de tecido seleccionadas para genotipagem

Foram obtidas 135 amostras de tecido fixado em formol e incluído em parafina dos doentes do grupo A (melanoma): 107 melanomas primários emparelhados com 27 metástases satélites/em trânsito e apenas uma metástase ganglionar. A extracção de DNA em concentração e grau de pureza adequados para a genotipagem não foi possível em 24 amostras (17,8%). Em 9 das 111 amostras restantes (8,1%), obtiveram-se menos de 18 genotipagens nos 29 ensaios realizados. Assim, as amostras efectivamente genotipadas foram 102 (taxa de exclusão de 24,4%).

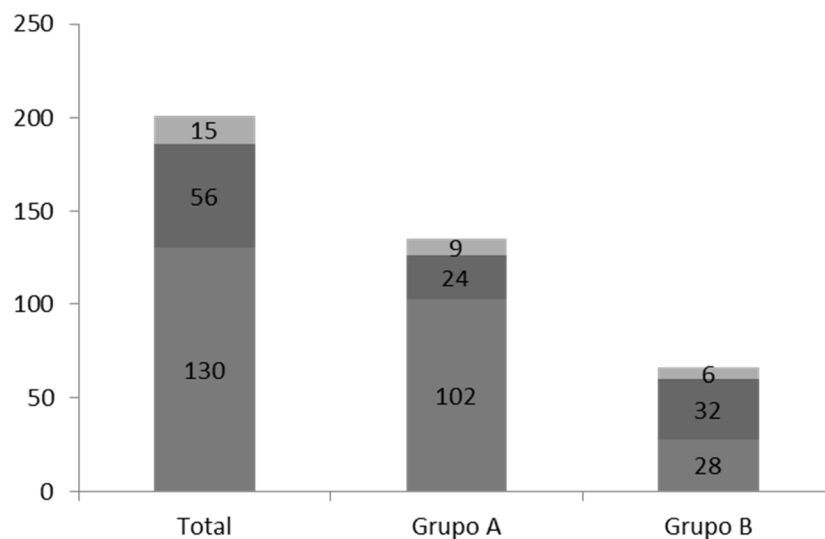


Figura 16. Distribuição relativa das amostras de tecido por cada grupo. Tom escuro: amostras excluídas por extracção insuficiente de DNA. Tom claro: amostras excluídas por não terem gerado um mínimo de 18 (60%) genotipagens bem sucedidas. Tom intermédio: amostras genotipadas.

Foram obtidas 66 amostras de tecido incluído em parafina correspondentes a nevos melanocíticos de doentes do grupo B. A extracção de DNA em concentração e grau de pureza adequados para a genotipagem não foi exequível em 32 amostras (48,5%). Das 34 restantes, houve 6 casos de exclusão (17,6%) devido à obtenção de menos de 18 genotipagens bem sucedidas nos 29 ensaios realizados. Assim, as amostras efectivamente genotipadas foram 28 (taxa de exclusão de 57,6%).

A distribuição das amostras e a comparação das taxas de exclusão entre os dois grupos encontram-se expressas respectivamente nas Fig. 16 e Tabela 12. A extracção de DNA foi significativamente mais eficaz nos blocos de parafina dos melanomas do que nos dos nevos melanocíticos ($p < 0,001$), mas não houve diferença estatística entre os grupos quanto à frequência de amostras genotipadas com êxito.

Tabela 12. Amostras excluídas por extracção de DNA em quantidade e/ou qualidade insuficientes e por genotipagem insatisfatória.

	Exclusão por extracção de DNA insuficiente [n (%)]	p	Exclusão por taxa de genotipagem <60% [n (%)]	p
Grupo A	24 (17,8%)	<0,001	9	0,119
Grupo B	32 (48,5%)		6	

As amostras provenientes dos doentes do grupo A corresponderam a peças de excisão de melanomas cutâneos primários (código A), metástases satélites/em trânsito de melanoma (código B) e metástases ganglionares de melanoma (código C). Os dados relativos à concentração do DNA extraído de cada amostra, assim como o respectivo grau de pureza (definido pelos rácios de absorvância 260/230 nm e 260/280 nm), a utilização de glicogénio para otimizar a concentração do DNA extraído, o volume da amostra e a percentagem de genotipagens em relação às 29 mutações testadas encontram-se descritos em tabela própria no Apêndice A.

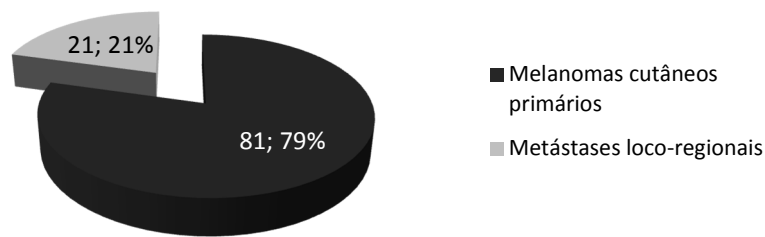


Figura 17. Amostras provenientes dos doentes do grupo A.

Das 102 amostras provenientes dos 81 doentes do grupo A, 81 (79%) corresponderam a melanomas cutâneos primários e 21 (21%) a metástases loco-regionais de melanoma (20 metástases cutâneas satélites/em trânsito e uma metástase ganglionar), conforme a Figura 17.

As amostras provenientes dos doentes do grupo B corresponderam a nevos melanocíticos adquiridos (código D). Os dados relativos à concentração do DNA extraído de cada amostra e o respectivo grau de pureza (definido pelos rácios de absorvância 260/230 nm e 260/280 nm), a utilização de glicogénio para otimizar a concentração do DNA extraído, o volume da amostra e a taxa de genotipagens em relação às 29 mutações testadas encontram-se discriminadas em tabela própria no Anexo A.

4.1.5. Genotipagem

O ensaio respeitante à mutação DMRT2 P470S foi excluído em virtude dos respectivos genótipos se terem agrupado com um nível reduzido de discriminação, comprometendo a precisão e fiabilidade dos dados. Após esta filtragem, analisaram-se os genótipos relativos às restantes 28 mutações num total de 130 amostras de DNA (102 do grupo A e 28 do grupo B). Os resultados gerais da genotipagem encontram-se sumarizados na Tabela 13.

Tabela 13. Resultados gerais da genotipagem.

Testes de genotipagem	Testes excluídos	Amostras genotipadas	Amostras excluídas
96.6% (n=28)	3.4% (n=1)	89,7% (n=130)	10,3% (n=15)

Foram detectadas 4 mutações distintas nas amostras de DNA genotipadas, respectivamente nos genes BAI3, DLEC1, MYOC e TP63, conforme a Tabela 14. Descrevem-se as respectivas frequências alélicas na Tabela 15.

A mutação BAI3 D755N corresponde a uma substituição G>A no codão 2263, resultando na troca de aspartato por asparagina na posição 755 da sequência de aminoácidos da proteína. Esta mutação foi apontada como deletéria (potencialmente patogénica) pelos *softwares* ANNOVAR[™] e SIFT[™]. Foi observada na amostra A11. Esta amostra foi genotipada 3 vezes (Tabela 15). Todavia, o estado heterozigótico foi observado em apenas duas ocasiões. A amostra mutada correspondia ao melanoma cutâneo primário do caso A11, um homem de 83 anos com um melanoma nodular do dorso, não ulcerado e com espessura de 6 mm. O doente tinha metástases ganglionares axilares no momento do diagnóstico e, posteriormente, surgiram metástases satélites e em trânsito. A doença teve um desfecho fatal após um tempo de seguimento de 8 meses.

Tabela 14. Mutações encontradas nas amostras de melanoma (Grupo A) e de nevos melanocíticos (grupo B).

Gene	Mutação	Grupo A	Grupo B
BAI3	D755N	A11	
DLEC1	D215N	A66, A74, A77	D1, D6
MYO9A	G2291V	A37	
TP63	M499I	B19	

A mutação DLEC1 D215N corresponde a uma substituição G>A no codão 643, resultando na troca de aspartato por asparagina na posição 215 da sequência de aminoácidos da proteína. Esta mutação não foi previamente descrita na população geral, de acordo com os dados do 1000 Genomes Project[™]. Foi observada no estado heterozigótico em 3 melanomas cutâneos primários (casos A66, A74 e A77). As amostras A66 e A74 foram genotipadas quatro vezes e o estado heterozigótico foi identificado em três dessas ocasiões. Na amostra A77 esta mutação ocorreu em heterozigotia nas 3 vezes que foi genotipada (Tabela 15).

O caso A66 correspondia a uma mulher de 66 anos com um melanoma de crescimento superficial da perna esquerda, não ulcerado e com 1,2 mm de espessura, estando viva e livre de doença após 35 meses de seguimento.

O caso A74 diz respeito a uma mulher de 88 anos com um melanoma nodular da face, não ulcerado, com espessura de 7,2 mm, que veio a evidenciar metastização ganglionar e, posteriormente, metastização pulmonar com desfecho fatal 20 meses após o diagnóstico.

O caso A77 correspondia a uma mulher de 67 anos com um melanoma de crescimento superficial da perna esquerda, não ulcerado, com espessura de 0,6 mm, estando viva e livre de doença após 113 meses de seguimento.

Esta mutação foi observada em dois nevos melanocíticos dérmicos, um no tronco (caso B1) e outro na face (caso B6). A mutação foi identificada sempre em estado de heterozigotia nas 3 genotipagens efectuadas em ambas as amostras (Tabela 15). Não se observou diferença estatisticamente significativa ($p=0,293$) da frequência alélica da variante DLEC1 D215N entre as amostras de nevos melanocíticos e as amostras de melanoma.

A mutação MYO9A G2291V corresponde a uma substituição G>T no codão 6872, resultando na troca de glicina por valina na posição 2291 da sequência de aminoácidos da proteína. Esta mutação foi apontada como deletéria (potencialmente patogénica) pelos *softwares* ANNOVAR™ e SIFT™. A mutação foi observada no melanoma primário do caso A37, uma mulher de 60 anos com um melanoma nodular, ulcerado, com 5,1 mm de espessura, localizado na perna direita. Esta amostra foi genotipada 3 vezes e o estado de heterozigotia só foi revelado numa das ocasiões (Tabela XV). Durante o seguimento, surgiram metástases ganglionares e metástases em trânsito. Duas destas metástases em trânsito foram analisadas e não revelaram a presença da mutação (3 genotipagens efectuadas). A doente estava viva com doença loco-regional aos 11 meses de seguimento.

A mutação TP63 M499I corresponde a uma substituição G>T no codão 1497, resultando na troca de um resíduo de metionina por outro de isoleucina na sequência de aminoácidos da proteína. Esta mutação foi apontada como deletéria (potencialmente patogénica) pelos *softwares* ANNOVAR™ e SIFT™. Foi observada em heterozigotia num único ensaio de genotipagem de uma metástase em trânsito de melanoma do caso A76, um doente do sexo masculino de 77 anos com um melanoma nodular da face, não ulcerado, com 6 mm de espessura. A mesma mutação não foi observada na amostra relativa ao melanoma primário. O doente, que veio a evidenciar metastização ganglionar regional e pulmonar, morreu por progressão da doença 66 meses após o diagnóstico.

A comparação da frequência das mutações observadas em ambos os grupos encontra-se descrita na Tabela 17. Não houve diferença estatística na frequência de mutações DLEC1 D215N entre os melanomas e os nevos melanocíticos ($p=0,601$).

Tabela 15. Frequência alélica das mutações nas amostras de melanoma e nos nevos melanocíticos. Potencial patogênico previsto pelas ferramentas bioinformáticas.

Gene	Mutação	Potencial patogênico (ANNOVAR™) (SIFT™)	Frequência alélica (melanoma) (n=102)	Frequência alélica (nevos) (n=28)	p	Frequência alélica (1000 Genomes Project™)
BAI3	D755N	Sim	0,0098	0	1,0	0
DLEC1	D215N	Não	0,0294	0,0714	0,293	0
MYO9A	G2291V	Sim	0,0098	0	1,0	0
TP63	M499I	Sim	0,0098	0	1,0	0

Tabela 16. Mutações observadas e respectivos genótipos. HT: heterozigoto. Ø: sem mutação.

Caso	Amostra	Mutação	Genótipo
A11	A11	BAI3_D755N	2 x HT + 1 x Ø
A66	A66		3 x HT + 1 x Ø
A74	A74		3 x HT + 1 x Ø
A77	A77	DLEC1_D215N	3 x HT
B1	D1		3 x HT
B6	D6		3 x HT
	A37		1 x HT + 2 x Ø
A37	B12	MYO9A_G2291V	3 x Ø
	B13		3 x Ø
A76	A76		3 x Ø
	B19	TP63_M499I	1 x HT + 3 x Ø

Tabela 17. Frequência das mutações BAI3 D755N, DLEC1 D215N, MYO9A G2291V e TP63 M499I nos doentes com melanoma (grupo A) e nos doentes com nevos melanocíticos (grupo B).

	Grupo A (n=81)	Grupo B (n=28)	P
BAI3_D755N	1 (1,2%)	0	1,0
DLEC1_D215N	3 (3,7%)	2 (7,1%)	0,601
MYO9A_G2291V	1 (1,2%)	0	1,0
TP63_M499I	1 (1,2%)	0	1,0

4.2. Estudo clínico retrospectivo

4.2.1. Distribuição das variáveis clínico-patológicas

A distribuição das variáveis clínico-patológicas avaliadas na amostra encontra-se expressa nas Tabelas 18 a 24. Todos os doentes eram de raça caucasiana. Salienta-se uma idade média de 61,2 anos (25-95 anos), com mediana de 66 anos e desvio-padrão de 16,5 anos. Houve uma clara predominância feminina (62,5%), correspondendo a uma relação masculino:feminino de 0,6.

O tempo médio de seguimento dos doentes foi de 56,7 meses (desvio-padrão de 48,1 meses; mediana de 49 meses), variando desde 1 a 372 meses.

Tabela 18. Distribuição em função do sexo e da idade.

Sexo	n (%)	Idade (anos)			
		Média	Desvio-padrão	Mediana	Intervalo Interquartil
Masculino	78 (37,5%)	62,3	15,2	66	26,25
Feminino	130 (62,5%)	60,5	17,3	63	22,75
TOTAL	208 (100%)	61,2	16,5	65,5	25,0

Tabela 19. Distribuição por grupo etário.

	0-20 anos	21-40 anos	41-60 anos	61-80 anos	>80 anos
Freq.	0	27	61	99	21
%	0	13%	29,3%	47,6%	10,1%

Tabela 20. Localização do melanoma. NC: não classificado.

	Cabeça e pescoço	Tronco	Membro superior	Membro inferior	NC
Freq.	32	59	19	92	6
%	15,4%	28,4%	9,1%	44,2%	2,9%

Tabela 21. Distribuição em função do tipo de melanoma.

	Lêntigo maligno	M. crescimento superficial	Melanoma acral	Melanoma nodular	Outros
Freq.	7	66	44	61	30
%	3,4%	31,7%	21,1%	29,3%	14,4%

Tabela 22. Distribuição em função da categoria T da classificação TNM (AJCC 2009).

T	Espessura	Frequência	Porcentagem
Tis	<i>In situ</i>	11	5,3%
T1	0-1 mm	24	11,5%
T2	1,01-2 mm	54	26%
T3	2,01-4 mm	39	18,8%
T4	>4 mm	63	30,3%
	Não classificado	17	8,2%

Tabela 23. Ulceração do tumor primário.

		Frequência	Porcentagem
Ulceração	Ausente	155	74,5%
	Presente	53	25,5%
Total		208	100%

A espessura média dos melanomas foi de 3,9 mm (desvio-padrão de 4,1 mm), variando de melanoma *in situ* até um valor máximo de 20 mm. A mediana da espessura foi de 2,4 mm (intervalo interquartil de 4,4 mm). A distribuição dos melanomas primários por categoria T da classificação TNM (Tis a T4) está exposta na Tabela 22.

A ulceração ocorreu em 25,5% dos melanomas primários (Tabela 23). As metástases satélites/em trânsito afectaram 39,9% dos doentes, tendo as metástases ganglionares regionais e as metástases à distância ocorrido em 20,2% e 31,7%, respectivamente (Tabela 24).

Aproximadamente 1/3 dos doentes (30,8%) tiveram um desfecho fatal relacionado com a progressão do melanoma (Tabela 24).

Tabela 24. Metastização em trânsito, metastização ganglionar regional, metastização à distância e morte por melanoma.

	Frequência	Porcentagem
Metástases satélites/em trânsito	83	39,9%
Metástases ganglionares regionais	42	20,2%
Metástases distantes	66	31,7%
Morte por melanoma	64	30,8%

Não se encontrou diferença estatística na distribuição etária entre homens e mulheres, quer em relação à média etária (Fig. 18), quer em relação à distribuição pelos vários grupos etários (Tabela 25).

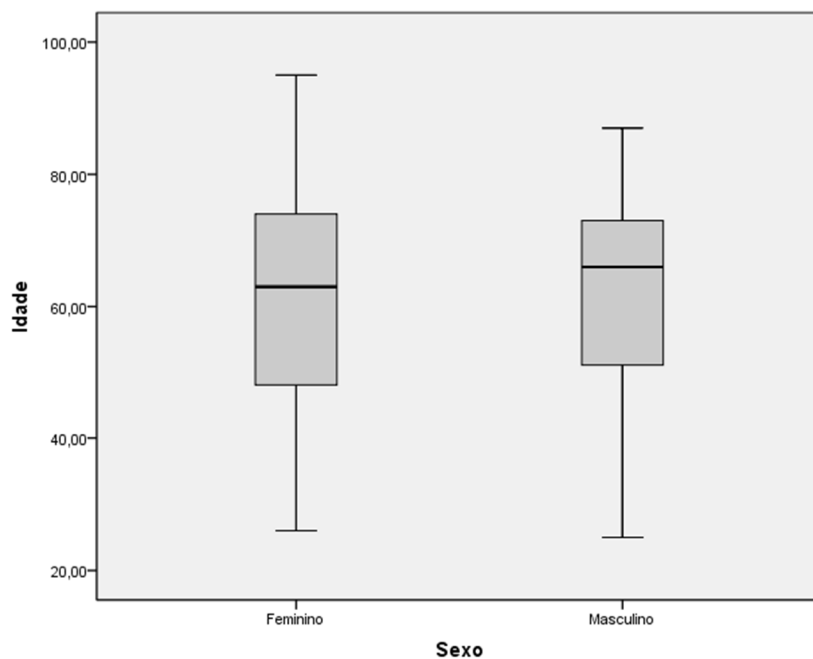


Figura 18. Idade em função do sexo ($p=0,524$).

Tabela 25. Distribuição por grupo etário em função do sexo.

		Grupo etário (anos)				P
		21-40	41-60	61-80	>80	
Sexo	Feminino	20 (74,1%)	38 (62,3%)	58 (58,6%)	14 (66,7%)	0,405
	Masculino	7 (25,9%)	23 (37,7%)	41 (41,4%)	7 (33,3%)	
Total		27 (100%)	61 (100%)	99 (100%)	21 (100%)	

O tronco foi a localização mais frequente dos melanomas no sexo masculino e o membro inferior no sexo feminino (Tabela 26), facto que teve significado estatístico ($p<0,001$).

Tabela 26. Localização do melanoma em função do sexo.

Sexo	Localização anatómica					P
	Cabeça e pescoço	Tronco	Membro superior	Membro inferior	Não classificado	
Feminino	22 (16,9%)	21 (16,2%)	14 (10,8%)	71 (54,6%)	2 (1,5%)	<0,001
Masculino	10 (12,8%)	38 (48,7%)	5 (6,4%)	21 (26,9%)	4 (5,1%)	

A frequência dos vários tipos de melanoma (Tabela 27) diferiu entre os dois sexos ($p=0,04$). O lântigo maligno e o melanoma acral foram significativamente mais comuns no sexo feminino, já que 85,7% e 72,7% dos casos, respectivamente, ocorreram em mulheres. Ao invés, os melanomas nodulares ocorreram preferencialmente nos homens.

Tabela 27. Tipo de melanoma em função do sexo.

Sexo	Localização anatómica					P
	Lântigo maligno	Melanoma crescimento superficial	Melanoma acral	Melanoma nodular	Outros	
Feminino	6 (4,6%)	40 (30,8%)	32 (24,6%)	30 (23,1%)	22 (16,9%)	0,04
Masculino	1 (1,3%)	26 (33,3%)	12 (15,4%)	31 (39,7%)	8 (10,3%)	

A espessura média do melanoma foi de 3,4 mm no sexo feminino (desvio-padrão de 3,6 mm; mediana de 2,1 mm) e de 4,8 mm no sexo masculino (desvio-padrão de 4,8 mm; mediana de 3,2 mm). Apesar de se ter documentado uma espessura média significativamente mais elevada nos doentes do sexo masculino (Fig. 23 e Tabela 28), não se observou diferença estatística entre os sexos no que respeita à distribuição por categoria T da classificação TNM (Tabela 29).

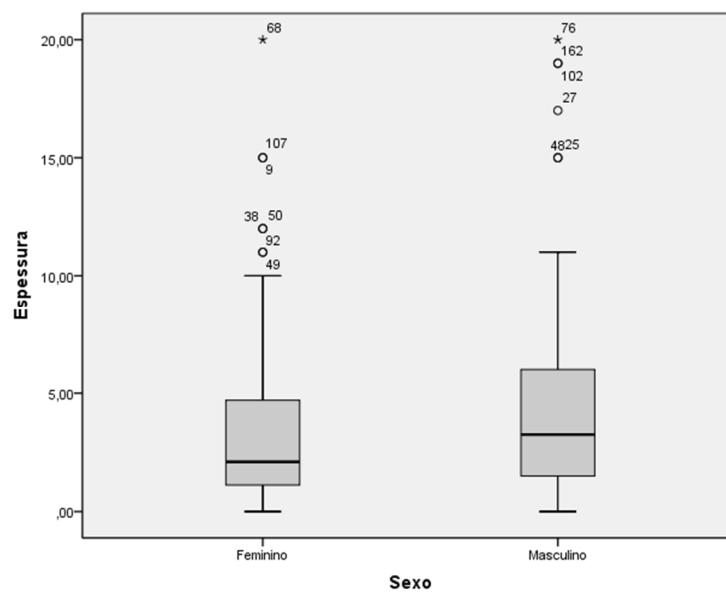


Figura 19. Espessura do tumor primário em função do sexo ($p=0,024$).

Tabela 28. Espessura do tumor primário em função do sexo.

		Espessura do tumor (mm)			P
		Média	Desvio-padrão	Mediana	
Sexo	Feminino	3,4	3,6	2,1	0,024
	Masculino	4,8	4,8	3,2	

A presença de ulceração do tumor primário foi ligeiramente superior no sexo masculino (26,9% *versus* 24,6% no sexo feminino), diferença que, no entanto, não teve significado estatístico (Tabela 30).

Tabela 29. Distribuição dos melanomas por categoria T da classificação TNM (AJCC 2009) em função do sexo.

Sexo		Espessura (categoria T)					P
		In situ	0-1 mm	1,01-2 mm	2,01-4 mm	>4 mm	
Feminino		7 (63,6%)	19 (79,2%)	32 (59,3%)	27 (69,2%)	33 (52,4%)	0,085
Masculino		4 (46,4%)	5 (20,8%)	22 (40,7%)	12 (30,8%)	30 (47,6%)	
Total		11 (100%)	24 (100%)	54 (100%)	39 (100%)	63 (100%)	

Tabela 30. Ulceração do tumor primário em função do sexo.

Sexo		Ulceração		P
		Ausente	Presente	
Feminino		98 (75,4%)	32 (24,6%)	0,712
Masculino		57 (73,1%)	21 (26,9%)	

Conforme a Tabela 31 e a Fig. 20, observou-se uma diferença estatisticamente significativa da idade média dos doentes consoante a localização do melanoma. A comparação múltipla (teste de Bonferroni) revelou que os doentes com melanoma da cabeça e pescoço eram significativamente mais velhos do que os com melanoma do tronco ($p=0,002$). Da mesma forma, os doentes com melanoma do tronco eram mais jovens do que aqueles cujo melanoma se localizava no membro inferior ($p=0,049$).

A localização do melanoma mostrou-se estatisticamente distinta nos diversos grupos etários ($p=0,042$). Porém, efectuadas comparações múltiplas pelo teste de Bonferroni, apenas

se verificou diferença estatística ($p=0,032$) entre a localização “cabeça e pescoço”, que teve frequência crescente com a idade, e a localização “tronco”, que predominou nos estratos etários mais jovens e foi diminuindo com a progressão etária (Tabela 32).

A idade média dos doentes também foi estatisticamente diferente em função do tipo de melanoma. A média etária dos doentes com lântigo maligno foi a mais elevada (69,7 anos), enquanto a dos que tiveram um melanoma de crescimento superficial (56,8 anos) foi a mais baixa (Tabela 31 e Fig. 21). As comparações múltiplas de Bonferroni permitiram evidenciar que os doentes com melanoma acral eram significativamente mais velhos do que os que tiveram outro tipo de melanoma ou melanoma de crescimento superficial ($p=0,032$ e $p=0,005$, respectivamente). A distribuição dos tipos de melanoma ao longo dos grupos etários revelou igualmente diferenças estatisticamente significativas (Tabela 33). A frequência do melanoma de crescimento superficial foi decrescendo à medida que o estrato etário foi subindo, o que diferiu significativamente do melanoma acral, cuja frequência foi aumentando de acordo com o avanço do estrato etário ($p=0,008$). Os outros tipos de melanoma, que também foram cada vez menos frequentes com o avanço etário, também se distinguiram estatisticamente dos melanomas acrais ($p=0,042$).

Tabela 31. Idade em função da localização e do tipo de melanoma. DP: desvio-padrão. Q: quartil.

	Idade (anos)				p
	Média	Desvio-padrão	Mediana	Intervalo interquartil	
Localização					
Cabeça e pescoço	68,4	12,4	71,0	19,0	0,003
Tronco	54,9	16,2	57,0	25,0	
Membro superior	61,2	19,2	65,0	32,0	
Membro inferior	62,8	15,9	65,0	23,5	
Não classificado	60,3	22,5	59,5	29,25	
Tipo anátomo-clínico					
Lântigo maligno	69,7	12,9	75,0	20,0	0,001
Mel. cresc. superf.	56,8	15,0	58,0	22,0	
Melanoma acral	67,4	14,7	71,0	22,0	
Melanoma nodular	63,2	17,5	67,0	26,5	
Outros	55,5	17,2	58,5	30,5	

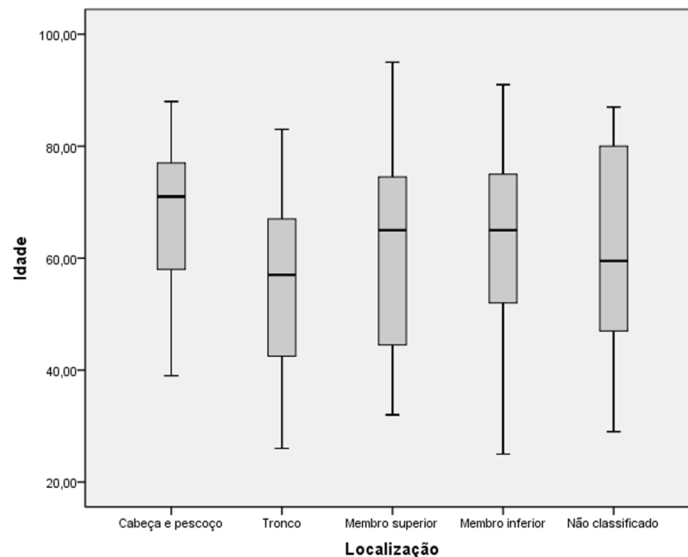


Figura 20. Idade em função da localização do melanoma ($p < 0,05$).

Tabela 32. Localização do melanoma por grupo etário.

		Grupo etário				P
		21-40 anos	41-60 anos	61-80 anos	>80 anos	
Local	Cabeça e pescoço	1 (4%)	8 (13%)	18 (18%)	5 (24%)	0,042
	Tronco	13 (48%)	18 (29%)	27 (27%)	1 (5%)	
	Membro superior	3 (11%)	4 (7%)	9 (9%)	3 (14%)	
	Membro inferior	9 (33%)	29 (48%)	43 (44%)	11 (52%)	
	Não classificado	1 (4%)	2 (3%)	2 (2%)	1 (5%)	
Total		27 (100%)	61 (100%)	99 (100%)	21 (100%)	

A espessura média aumentou gradualmente com a progressão do grupo etário ($p < 0,001$) (Tabela 34 e Fig. 22), mostrando que à medida que o estrato etário se eleva há uma tendência para encontrar tumores mais espessos. Paralelamente, a categoria T4 da classificação TNM (Tabela 35) também aumentou progressivamente desde o grupo etário dos 21-40 anos até ao grupo de doentes com idade superior a 80 anos ($p = 0,002$).

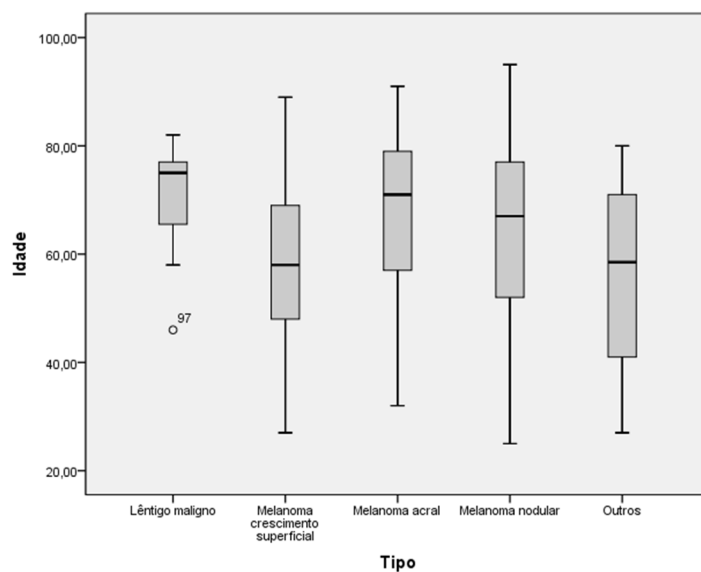


Figura 21. Idade em função do tipo de melanoma ($p < 0,05$).

Tabela 33. Tipo de melanoma por grupo etário.

		Grupo etário				
		21-40 anos	41-60 anos	61-80 anos	>80 anos	p
Tipo	Lêntigo maligno	0	2 (3%)	4 (4%)	7 (26%)	
	M. crescimento superficial	11 (41%)	24 (39%)	30 (31%)	1 (4%)	
	Melanoma acral	1 (4%)	12 (20%)	22 (22%)	9 (33%)	0,014
	Melanoma nodular	8 (29%)	15 (25%)	28 (28%)	10 (37%)	
	Outros	7 (26%)	8 (13%)	15 (15%)	0	
	Total	27 (100%)	61 (100%)	99 (100%)	21 (100%)	

Tabela 34. Espessura do tumor primário por grupo etário.

		Grupo etário				
		21-40 anos	41-60 anos	61-80 anos	>80 anos	p
Espessura	Média	2,7 mm	3,3 mm	4,2 mm	6,6 mm	<0,001
	Mediana	1,4 mm	1,8 mm	2,8 mm	6,0 mm	

A espessura média foi de 4,1 mm nos melanomas da cabeça e pescoço (mediana de 3,0 mm), 4,4 mm nos do tronco (mediana de 2,5 mm), 3,9 mm nos dos membros superiores (mediana de 1,9 mm), 3,6 mm nos dos membros inferiores (mediana de 2,0 mm) e 3,4 mm nos de localização não classificada (mediana de 3,2 mm). A diferença entre a espessura média de tumores localizados em várias regiões anatómicas não foi estatisticamente significativa (Fig. 23).

Tabela 35. Categoria T da classificação TNM (AJCC 2009) por grupo etário.

		Grupo etário				
		21-40 anos	41-60 anos	61-80 anos	>80 anos	P
T	<i>In situ</i>	5 (19%)	2 (3%)	2 (2%)	2 (10%)	
	0-1,0 mm	4 (15%)	8 (14%)	11 (13%)	1 (5%)	
	1,01-2,0 mm	8 (31%)	22 (39%)	23 (26%)	1 (5%)	
	2,01-4,0 mm	3 (12%)	13 (23%)	21 (24%)	2 (10%)	0,002
	>4,0 mm	6 (23%)	12 (21%)	31 (35%)	14 (70%)	
	Total	26 (100%)	57 (100%)	88 (100%)	20 (100%)	

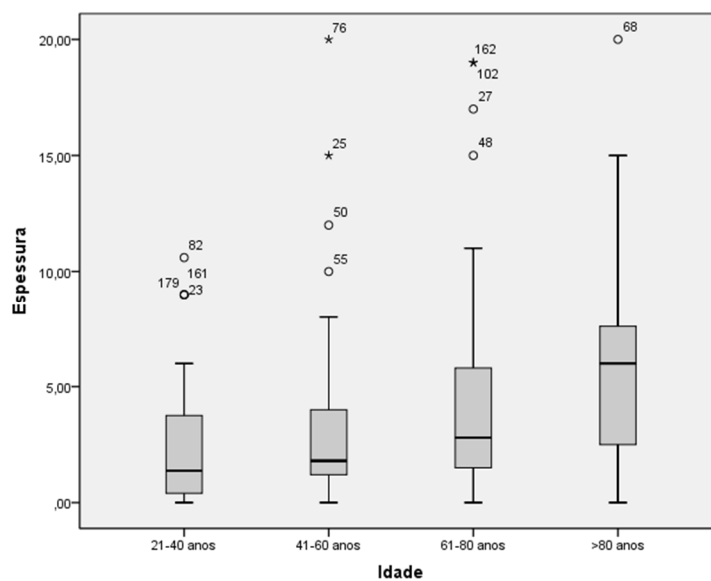


Figura 22. Espessura do tumor primário em função do grupo etário (p<0,001).

Os melanomas de crescimento superficial, melanomas acrais e melanomas nodulares tiveram, respectivamente, espessuras médias de 1,9 mm (mediana de 1,3 mm), 4,1 mm (mediana de 2,4 mm) e 6,1 mm (mediana de 5,1 mm), respectivamente. A espessura média dos lântigos malignos foi de 3,5 mm (mediana de 2,4 mm) e a de outros tipos anátomo-clínicos foi 3,7 mm (mediana de 2,0 mm). A diferença da espessura média (Fig. 23) foi estatisticamente significativa entre os vários tipos anátomo-clínicos ($p < 0,001$). As comparações múltiplas entre tipos distintos de melanoma resultaram em diferenças significativas entre melanoma de crescimento superficial e melanoma acral ($p = 0,025$), melanoma de crescimento superficial e melanoma nodular ($p < 0,001$), melanoma acral e melanoma nodular ($p = 0,002$) e, finalmente, outros tipos de melanoma e melanoma nodular ($p = 0,006$).

Observou-se que quanto mais elevado o estrato etário, maior a proporção de melanomas primários ulcerados (Tabela 36), facto que se revestiu de significado estatístico ($p < 0,001$).

A ulceração do tumor primário não foi estatisticamente diferente nas várias regiões anatómicas do tegumento (Tabela 37). Em relação aos vários tipos de melanoma, aqueles que se associaram a uma proporção significativamente maior de tumores ulcerados foram, por esta ordem, os melanomas nodulares e os melanomas acrais (Tabela 38).

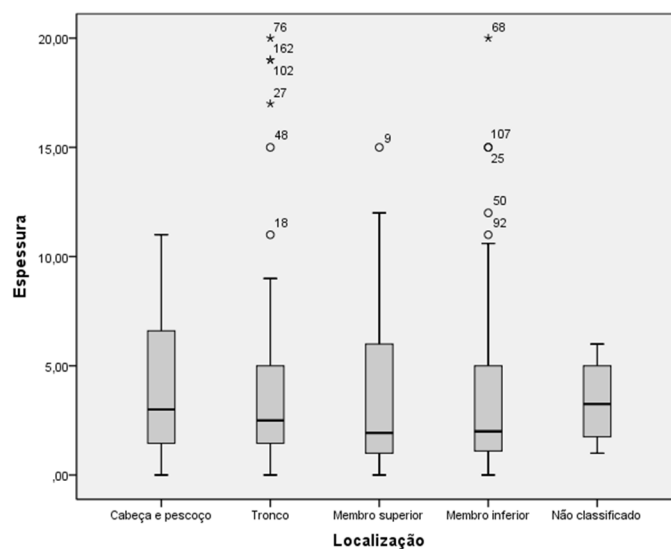


Figura 23. Espessura do tumor primário em função da localização ($p = 0,716$).

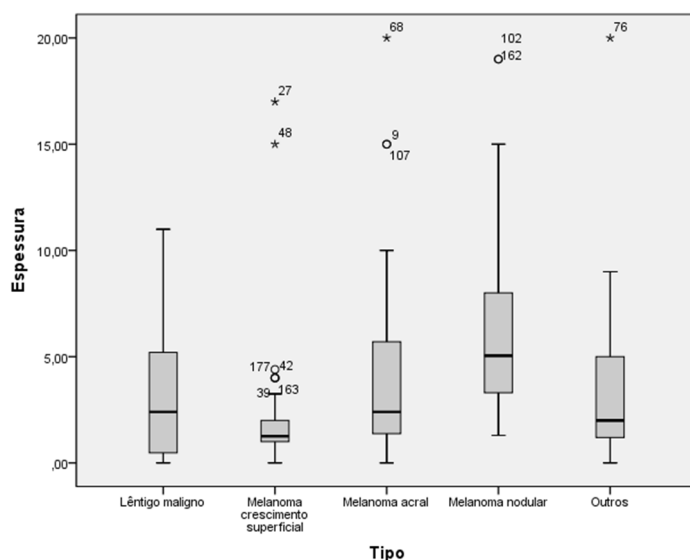


Figura 24. Espessura do tumor primário em função do tipo de melanoma ($p < 0,001$).

Tabela 36. Ulceração do tumor primário por grupo etário.

Ulceração	Grupo etário				P
	21-40 anos	41-60 anos	61-80 anos	>80 anos	
Ausente	24 (89%)	53 (87%)	69 (78%)	9 (43%)	<0,001
Presente	3 (11%)	8 (13%)	20 (22%)	12 (57%)	
Total	27 (100%)	61 (100%)	99 (100%)	21 (100%)	

Tabela 37. Ulceração do tumor primário em função da localização.

Ulceração	Localização do melanoma					P
	Cabeça e pescoço	Tronco	Membro superior	Membro inferior	Não classificado	
Ausente	28 (87%)	43 (73%)	12 (63%)	67 (73%)	5 (83%)	0,319
Presente	4 (13%)	16 (27%)	7 (37%)	25 (27%)	1 (17%)	
Total	32 (100%)	59 (100%)	19 (100%)	92 (100%)	6 (100%)	

Tabela 38. Ulceração do tumor primário em função do tipo.

Ulceração	Tipo de melanoma					p
	Lêntigo maligno	Melanoma crescimento superficial	Melanoma acral	Melanoma nodular	Outros	
Ausente	6 (86%)	60 (91%)	27 (61%)	35 (57%)	27 (90%)	<0,001
Presente	1 (14%)	6 (9%)	17 (39%)	26 (43%)	3 (10%)	
Total	7 (100%)	66 (100%)	44 (100%)	61 (100%)	30 (100%)	

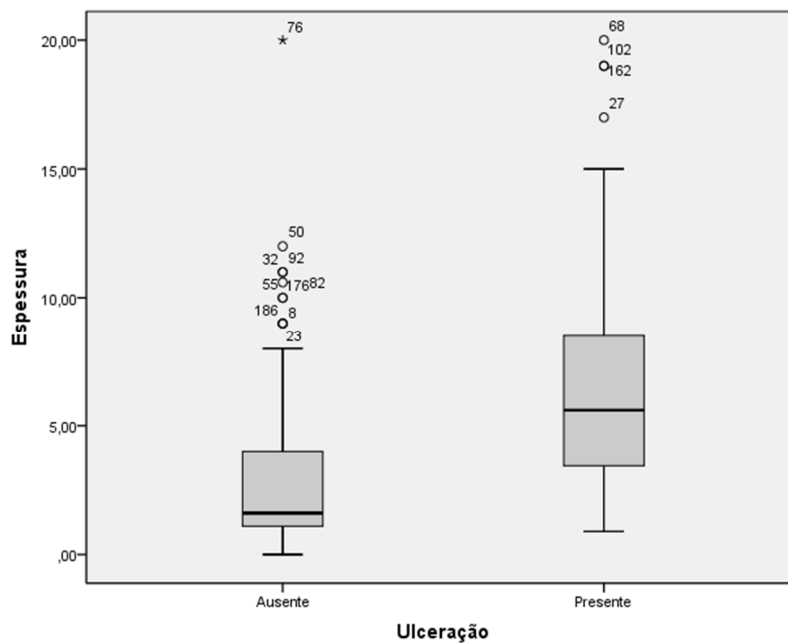


Figura 25. Espessura do tumor primário em função da ulceração ($p < 0,001$).

A espessura média dos melanomas ulcerados foi de 7,0 mm (mediana de 5,6 mm), contra os 2,9 mm dos tumores não ulcerados (mediana de 1,6 mm). Os tumores ulcerados tiveram uma espessura significativamente maior (Fig. 25). Em concordância, a proporção de melanomas ulcerados foi maior nos tumores classificados como T3 e T4 (Tabela39).

Tabela 39. Ulceração do tumor primário em função da categoria T da classificação TNM (AJCC 2009).

Ulceração	Categoria T					p
	<i>In situ</i>	0-1,0 mm	1,01-2,0 mm	2,01-4,0 mm	>4 mm	
Ausente	11 (100%)	23 (96%)	49 (91%)	26 (67%)	31 (49%)	<0,001
Presente	0	1 (4%)	5 (9%)	13 (33%)	32 (51%)	
Total	11 (100%)	24 (100%)	54 (100%)	39 (100%)	63 (100%)	

O lântigo maligno ocorreu exclusivamente na cabeça e pescoço. O melanoma de crescimento superficial predominou no tronco e no membro inferior. O melanoma acral foi mais comum no membro inferior, quando comparado com o membro superior (88,6 *versus* 11,4%) e o melanoma nodular distribuiu-se de um modo sensivelmente uniforme pelas diversas regiões anatómicas (Tabela 40).

Tabela 40. Tipo de melanoma em função da localização.

Tipo	Localização					p
	Cabeça e pescoço	Tronco	Membro superior	Membro inferior	Não classificado	
Lântigo maligno	7 (22%)	0	0	0	0	<0,001
M. cresc. superf.	4 (12%)	29 (49%)	4 (21%)	28 (30%)	1 (17%)	
Melanoma acral	0	0	5 (26%)	39 (42%)	0	
Melanoma nodular	15 (47%)	19 (32%)	8 (42%)	17 (19%)	2 (33%)	
Outros	6 (19%)	11 (19%)	2 (11%)	8 (9%)	3 (50%)	
Total	32 (100%)	59 (100%)	19 (100%)	92 (100%)	6 (100%)	

Dos factores clínico-patológicos que se relacionaram com uma maior frequência de metástases em trânsito na análise univariada, salientam-se a idade, a espessura do tumor primário, a ulceração e o tipo anátomo-clínico (Tabela 41). Assim, a idade dos doentes com metástases em trânsito (média de 66,6 anos e mediana de 69,5 anos) foi superior à daqueles que não tiveram aquele tipo de metástases (média de 59,8 anos e mediana de 63 anos), diferença que teve significado estatístico ($p=0,016$). A espessura média do tumor primário foi

de 6,5 mm (mediana de 6,0 mm) nos doentes com metástases em trânsito contra os 3,3 mm (mediana de 1,9 mm) dos tumores dos doentes que não tiveram aquele tipo de metástases ($p < 0,001$). A ulceração do tumor primário conferiu um risco de 2,5 vezes (IC 95%: 1,2-5,0) de desenvolver metástases em trânsito (avaliado pelo *odds ratio*). Os melanomas nodulares (32,8%), seguidos pelos melanomas acrais (18,2%), foram os tipos de melanoma que se associaram a maior frequência de metástases em trânsito.

Não obstante, após a realização da regressão logística, apenas a espessura permaneceu preditiva da metastização em trânsito.

Tabela 41. Metástases em trânsito em função do sexo, idade, espessura, ulceração, localização e tipo de melanoma. An. univar.: análise univariada. Reg. log.; regressão logística.

		Metástases em trânsito		An. univar.	Reg. log.
		Não	Sim	p	p
Sexo	Feminino	108 (83,1%)	22 (16,9%)	0,129	—
	Masculino	58 (74,4%)	20 (25,6%)		
Idade (anos)	Média	59,8	66,6	0,016	0,328
	Mediana	63,0	69,5		
Espessura (mm)	Média	3,3	6,5	<0,001	0,008
	Mediana	1,9	6,0		
Ulceração	Ausente	130 (83,9%)	25 (16,1%)	0,013	0,457
	Presente	36 (67,9%)	17 (32,1%)		
Localização	Cabeça e pescoço	27 (84,4%)	5 (15,6%)	0,648	—
	Tronco	47 (79,7%)	12 (20,3%)		
	Membro superior	14 (73,7%)	5 (26,3%)		
	Membro inferior	72 (78,3%)	20 (21,7%)		
	Não classificado	6 (100%)	0		
Tipo	Lêntigo maligno	7 (100%)	0	0,042	0,999
	M. cresc. superf.	57 (86,4%)	9 (13,6%)		0,753
	Melanoma acral	36 (81,8%)	8 (18,2%)		0,963
	Melanoma nodular	41 (67,2%)	20 (32,8%)		0,410
	Outros	25 (83,3%)	5 (16,7%)		—

Na análise univariada, as metástases ganglionares (Tabela 42) ocorreram mais frequentemente no sexo masculino do que no sexo feminino ($p = 0,004$), o que se traduziu num *odds ratio* de 2,3 (IC 95%: 1,3-4,1). A espessura voltou a ter influência na probabilidade de ocorrência de metastização ganglionar regional ($p < 0,001$), observável na diferença de espessura entre os que tiveram e os que não tiveram metástases ganglionares: espessura média de 6,1 mm (mediana de 5,0 mm) *versus* 2,6 mm (mediana de 1,5 mm). Relativamente à

ulceração, calculou-se um *odds ratio* de 3,1 vezes (IC 95%: 1,6-5,9). O melanoma nodular (63,9%) e, em menor proporção, o melanoma acral (38,6%) relacionaram-se com uma maior tendência de metastização ganglionar. Na regressão logística, no entanto, apenas a espessura permaneceu como factor preditivo de metastização ganglionar regional ($p=0,001$).

Tabela 42. Metástases ganglionares regionais em função do sexo, idade, espessura, ulceração, localização e tipo de melanoma. An. univar.: análise univariada. Reg. log.; regressão logística.

		Metástases ganglionares		An. univar.	Reg. log.
		Não	Sim	p	p
Sexo	Feminino	88 (67,7%)	42 (32,3%)	0,004	0,367
	Masculino	37 (47,4%)	41 (52,6%)		
Idade (anos)	Média	60,2	62,5	0,322	0,334
	Mediana	64,0	67,0		
Espessura (mm)	Média	2,6	6,1	<0,001	0,001
	Mediana	1,5	5,0		
Ulceração	Ausente	104 (67,1%)	51 (32,9%)	<0,001	0,434
	Presente	21 (39,6%)	32 (60,4%)		
Localização	Cabeça e pescoço	23 (71,9%)	9 (28,1%)	0,561	—
	Tronco	32 (54,2%)	27 (45,8%)		
	Membro superior	11 (57,9%)	8 (42,1%)		
	Membro inferior	56 (60,9%)	36 (39,1%)		
	Não classificado	3 (50%)	3 (50%)		
Tipo	Lêntigo maligno	7 (100%)	0	<0,001	0,999
	M. cresc. superf.	53 (80,3%)	13 (19,7%)		0,238
	Melanoma acral	27 (61,4%)	17 (38,6%)		0,710
	Melanoma nodular	22 (36,1%)	39 (63,9%)		0,411
	Outros	16 (53,3%)	14 (46,7%)		—

Quanto à metastização à distância (Tabela 43), os homens tiveram um risco acrescido de 2,2 vezes, avaliado pelo *odds ratio* ($p=0,011$; IC 95%: 1,9-3,9). A espessura dos melanomas que progrediram para doença distante (média de 6,2 mm e mediana de 4,6 mm) também foi significativamente maior do que a dos que não progrediram (média de 3,1 mm e mediana de 1,7 mm). A ulceração conferiu um risco de 3,1 vezes de ter metástases distantes ($p<0,001$; IC 95%: 1,6-5,9). Os melanomas nodulares (49,2%) e os outros tipos distintos de melanoma (43,3%) desenvolveram mais frequentemente metástases distantes ($p<0,001$). Na análise multivariada, apenas a espessura ($p=0,015$) e a ulceração (0,04) se associaram significativamente a maior taxa de metástases distantes, apesar do sexo ter ficado próximo do

nível de significância estatística ($p=0,06$), mostrando uma tendência aparentemente maior dos homens desenvolverem metástases distantes.

Tabela 43. Metástases distantes em função do sexo, idade, espessura, ulceração, localização e tipo de melanoma. An. univar.: análise univariada. Reg. log.; regressão logística.

		Metástases distantes		An. univar.	Reg. log.
		Não	Sim	P	p
Sexo	Feminino	97 (74,6%)	33 (25,4%)	0,011	0,06
	Masculino	45 (57,7%)	33 (42,3%)		
Idade (anos)	Média	60,8	62,1	0,656	0,226
	Mediana	65,0	66,0		
Espessura (mm)	Média	3,1	6,2	<0,001	0,015
	Mediana	1,7	4,6		
Ulceração	Ausente	116 (89,2%)	39 (10,8%)	<0,001	0,04
	Presente	26 (49,1%)	27 (50,9%)		
Localização	Cabeça e pescoço	24 (75%)	8 (25%)	0,388	—
	Tronco	39 (66,1%)	20 (33,9%)		
	Membro superior	13 (68,4%)	6 (31,6%)		
	Membro inferior	64 (69,6%)	28 (30,4%)		
	Não classificado	2 (33,3%)	4 (66,7%)		
Tipo	Lêntigo maligno	7 (100%)	0	<0,001	0,999
	M. cresc. superf.	56 (84,9%)	10 (15,1%)		0,327
	Melanoma acral	31 (70,4%)	13 (29,6%)		0,358
	Melanoma nodular	31 (50,8%)	30 (49,2%)		0,589
	Outros	17 (56,7%)	13 (43,3%)		—

Os homens tiveram um risco de morte relacionada com o melanoma de 2,1 vezes ($p=0,013$; IC 95%: 1,2-3,9), conforme avaliado pelo *odds ratio* (Tabela 44). Os doentes que morreram em consequência do melanoma tiveram uma espessura significativamente mais elevada (média de 6,1 mm; mediana de 4,7 mm) do que os doentes que permaneceram vivos durante o tempo de seguimento (média de 3,0 mm; mediana de 1,6 mm). A ulceração conferiu um risco de 2,9 vezes de morte relacionada com o melanoma ($p<0,001$; IC 95%: 1,5-5,7). Houve diferença estatística na mortalidade relacionada com o tipo de melanoma, em particular devido ao melanoma nodular (mortalidade de 47,5%) e a outros tipos distintos de melanoma (mortalidade de 40%). Após a regressão logística, a significância estatística apenas se manteve em relação à espessura.

Tabela 44. Morte por melanoma em função do sexo, idade, espessura, ulceração, localização e tipo de melanoma. An. univar.: análise univariada. Reg. log.; regressão logística.

		Morte por melanoma		An. univar. p	Reg. log. p
		Não	Sim		
Sexo	Feminino	98 (75,4%)	32 (24,6%)	0,013	0,222
	Masculino	46 (58,9%)	32 (41,1%)		
Idade (anos)	Média	60,2	63,4	0,228	0,884
	Mediana	63,5	66,5		
Espessura (mm)	Média	3,0	6,2	<0,001	0,006
	Mediana	1,6	4,7		
Ulceração	Ausente	117 (75,5%)	38 (24,5%)	0,001	0,283
	Presente	27 (50,9%)	26 (49,1%)		
Localização	Cabeça e pescoço	25 (78,1%)	7 (21,9%)	0,267	—
	Tronco	39 (66,1%)	20 (33,9%)		
	Membro superior	13 (68,4%)	6 (31,6%)		
	Membro inferior	65 (70,7%)	27 (29,3%)		
	Não classificado	2 (33,3%)	4 (66,7%)		
Tipo	Lêntigo maligno	7 (100%)	0	0,001	0,999
	M. cresc. superf.	55 (83,3%)	11 (16,7%)		0,223
	Melanoma acral	32 (72,7%)	12 (27,3%)		0,234
	Melanoma nodular	32 (52,5%)	29 (47,5)		0,910
	Outros	18 (60%)	12 (40%)		—

O risco de morte relacionada com o melanoma, avaliado pelo *odds ratio* (Tabela 45) foi de 6,3 vezes (IC 95%: 3,0-13,0) nos doentes que tiveram metástases em trânsito, 12 vezes (IC 95%: 5,9-24,4) nos que tiveram metástases ganglionares e 345 vezes nos que tiveram metástases distantes (IC 95%: 93,9-1267,1).

Tabela 45. Risco de morte por melanoma em função da presença de metástases em trânsito, ganglionares regionais e à distância.

		Morte por melanoma		p	Odds ratio
		Não	Sim		
Metástases em trânsito	Não	129 (77,7%)	37 (22,3%)	<0,001	6,3
	Sim	15 (35,7%)	27 (64,3%)		
Metástases ganglionares	Não	111 (88,8%)	14 (11,2%)	<0,001	12,0
	Sim	33 (39,8%)	50 (60,2%)		
Metástases distantes	Não	138 (97,2%)	4 (2,8%)	<0,001	345,0
	Sim	6 (9,1%)	60 (90,9%)		

Em relação à sobrevivência global (Fig. 26), o tempo médio de sobrevivência foi de 166 meses (mediana de 148 meses). A sobrevivência aos 30 meses foi de 94,1% e aos 60 meses de 87,4%.

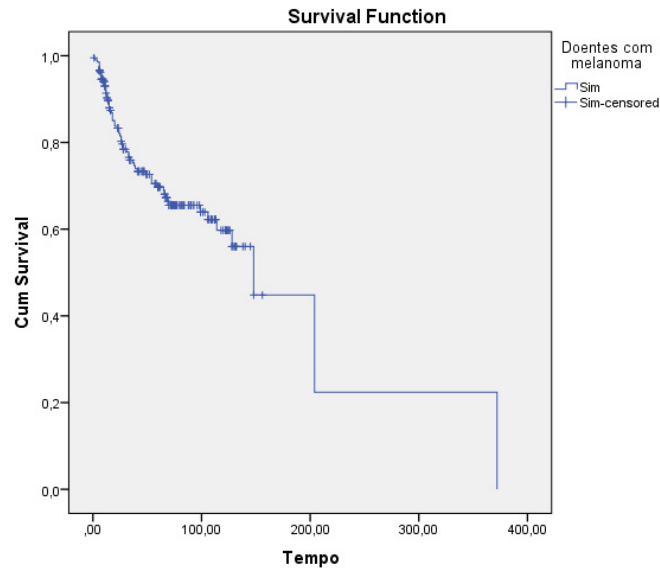


Figura 26. Sobrevivência global.

O tempo médio de sobrevivência foi significativamente maior nas mulheres (média de 227 meses e mediana de 372 meses) do que nos homens (média de 105 meses e mediana de 106 meses). A sobrevivência dos homens foi significativamente menor do que a das mulheres ($p=0,003$), conforme análise das curvas de sobrevivência (Fig. 27).

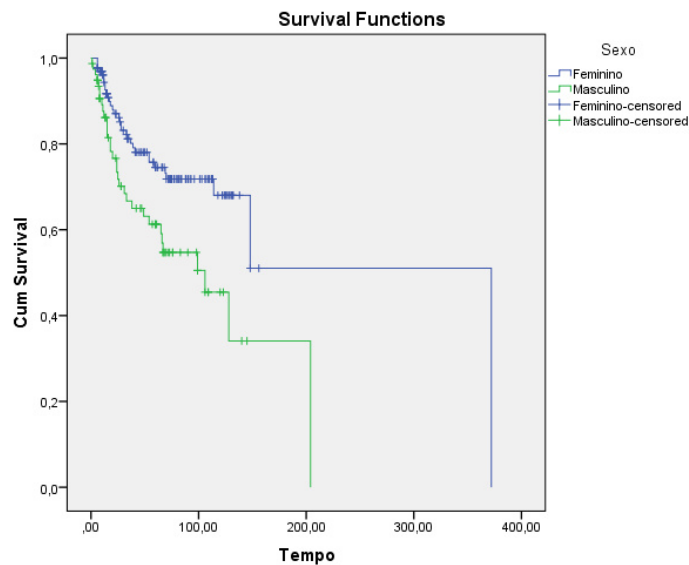


Figura 27. Sobrevivência em função do sexo ($p=0,003$).

Não se observou diferença estatisticamente significativa na sobrevivência global por grupo etário ($p=0,402$), conforme se pode verificar nas curvas de sobrevivência (Fig. 28).

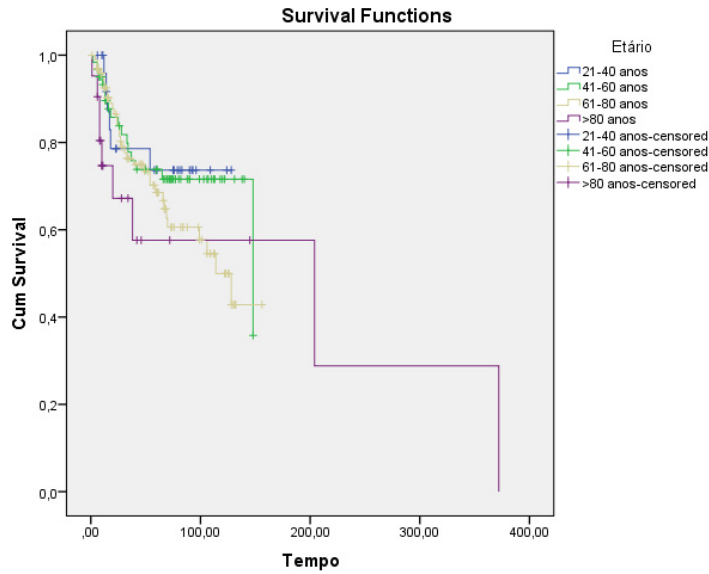


Figura 28. Sobrevivência em função do grupo etário ($p=0,402$).

A sobrevivência global por categoria T da classificação TNM da AJCC (Fig. 29) foi diminuindo progressivamente de T1 a T4 ($p<0,001$). Os melanomas *in situ* tiveram uma sobrevivência média de 131 meses, enquanto esta foi de 151 meses nos melanomas T1, 276 meses nos melanomas T2, 117 meses nos melanoms T3 e 51 meses nos melanomas T4.

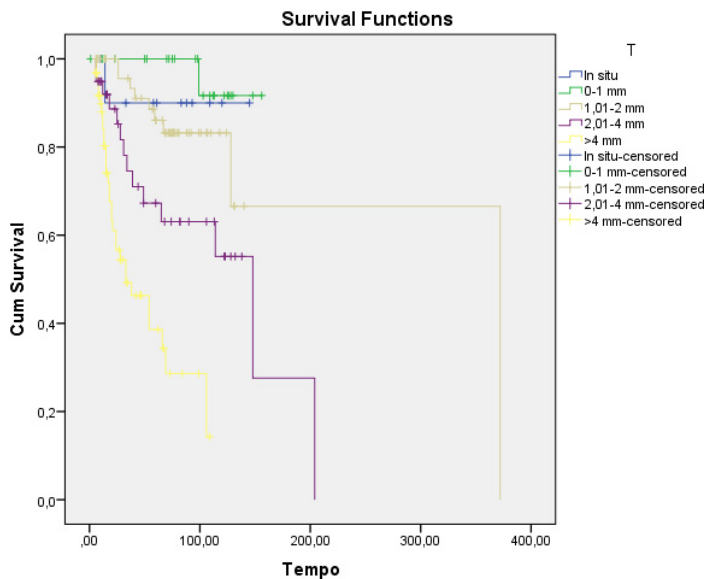


Figura 29. Sobrevivência em função da categorias T do melanoma ($p<0,001$).

A ulceração foi preditiva de uma menor sobrevivência global (Fig 30). O tempo médio de sobrevivência dos doentes com ulceração foi de 110 meses (mediana de 54 meses), enquanto o daqueles com tumores não ulcerados foi de 116 meses (mediana de 148 meses).

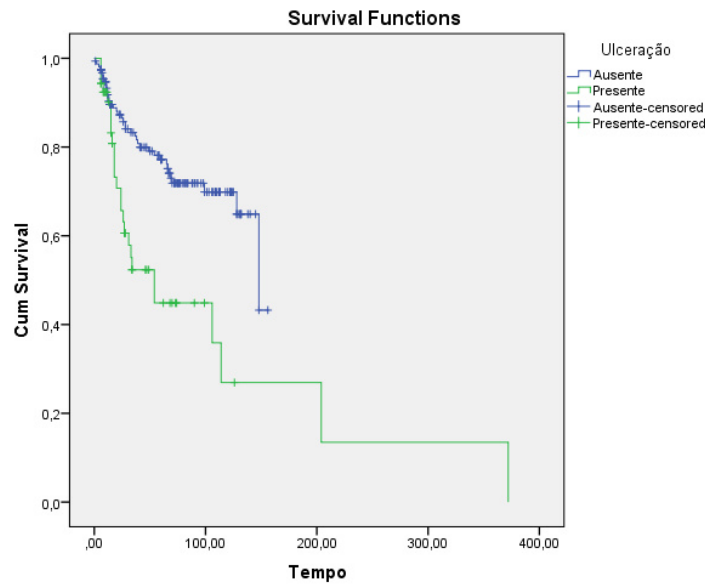


Figura 30. Sobrevivência em função da ulceração do melanoma ($p < 0,001$).

As curvas de sobrevivência global não variaram significativamente em função da localização do melanoma primário ($p = 0,073$), conforme se infere da observação da Fig. 31.

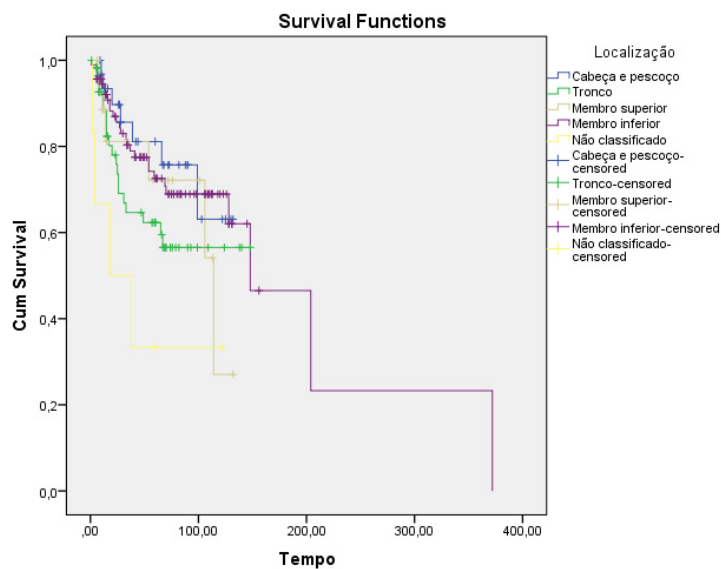


Figura 31. Sobrevivência em função da localização do melanoma ($p = 0,073$).

A sobrevivência dos doentes diferiu significativamente em função do tipo de melanoma (Fig. 32). A sobrevivência foi maior no lêntigo maligno, diminuindo sucessivamente do melanoma de crescimento superficial para o melanoma acral, outros tipos de melanoma e melanoma nodular ($p < 0,001$).

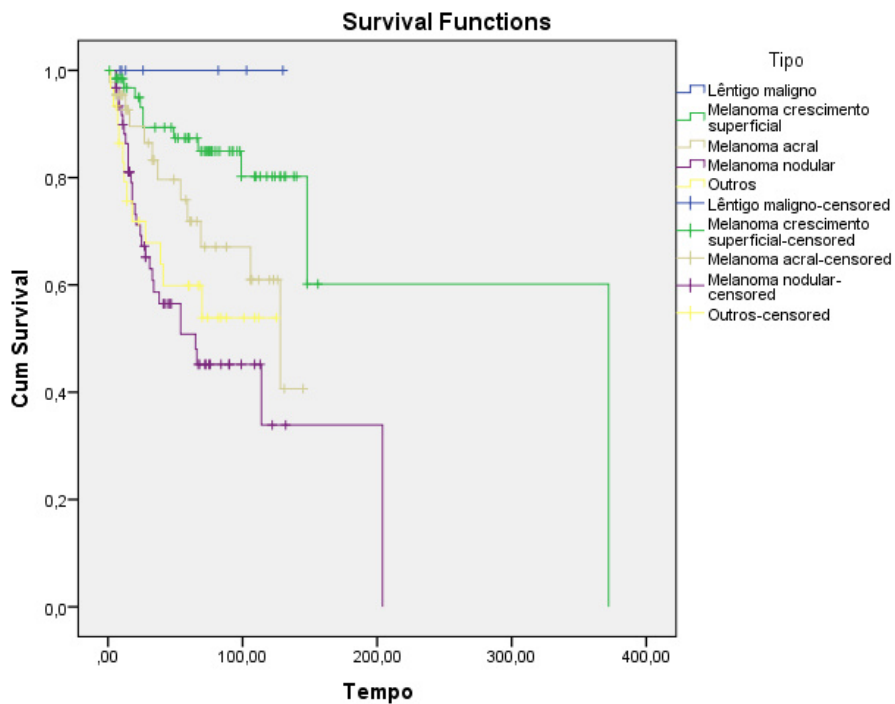


Figura 32. Sobrevivência em função do tipo de melanoma ($p < 0,001$).

Após efectuada a regressão de Cox, de modo a corrigir a influência das variáveis que tiveram impacto nas curvas de sobrevivência (sexo, categoria T, ulceração e tipo), verificou-se que apenas a categoria T manteve um impacto pejorativo na sobrevivência ($p < 0,001$), demonstrando-se um agravamento do prognóstico em função do aumento da espessura (Tabela 46).

Tabela 46. Regressão de Cox das variáveis que influenciaram as curvas de sobrevivência.

	Sexo	Categoria T	Ulceração	Lêntigo mal.	M. cresc. sup.	M. acral	M. nodular
P	0,372	<0,001	0,418	0,971	0,349	0,203	0,397

A diferença das curvas de sobrevivência em função da ocorrência de metástases em trânsito ($p < 0,001$) pode ser observada na Fig. 33. A sobrevivência global dos doentes com metástases em trânsito (média de 85,9 meses, mediana de 59 meses) foi significativamente menor do que a dos doentes sem metástases em trânsito (média de 153,8 meses, mediana de 204 meses).

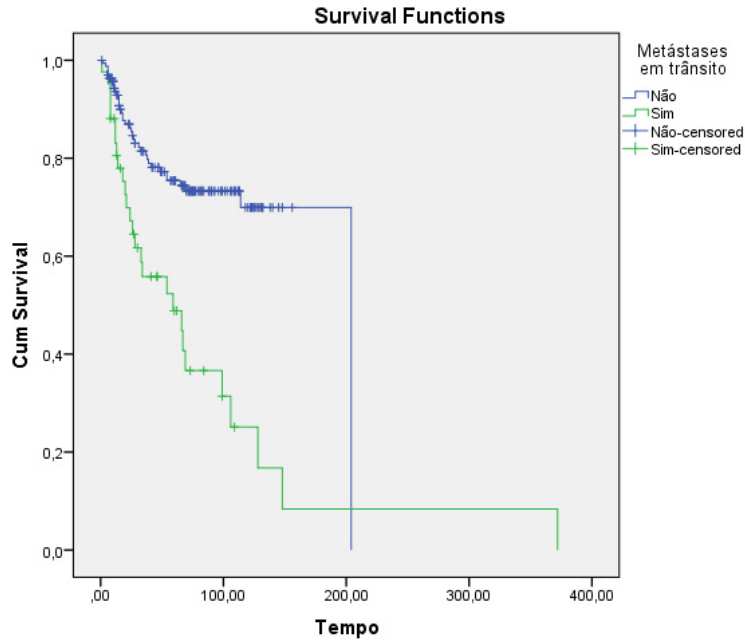


Figura 33. Sobrevivência em função da presença de metástases em trânsito ($p < 0,001$).

A diferença das curvas de sobrevivência em função da ocorrência de metástases ganglionares regionais ($p < 0,001$) pode ser observada na Fig. 34. A sobrevivência global dos doentes com ganglionares regionais (média de 42,1 meses, mediana de 59 meses) foi significativamente menor do que a dos doentes sem metástases em trânsito (média de 139,1 meses, mediana de 204 meses).

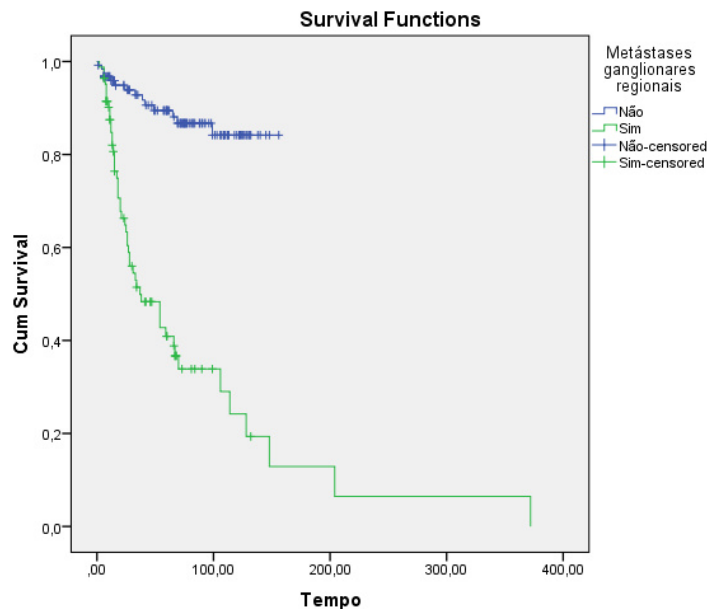


Figura 34. Sobrevivência em função da presença de metástases ganglionares regionais ($p < 0,001$). Mgg: metástases ganglionares regionais.

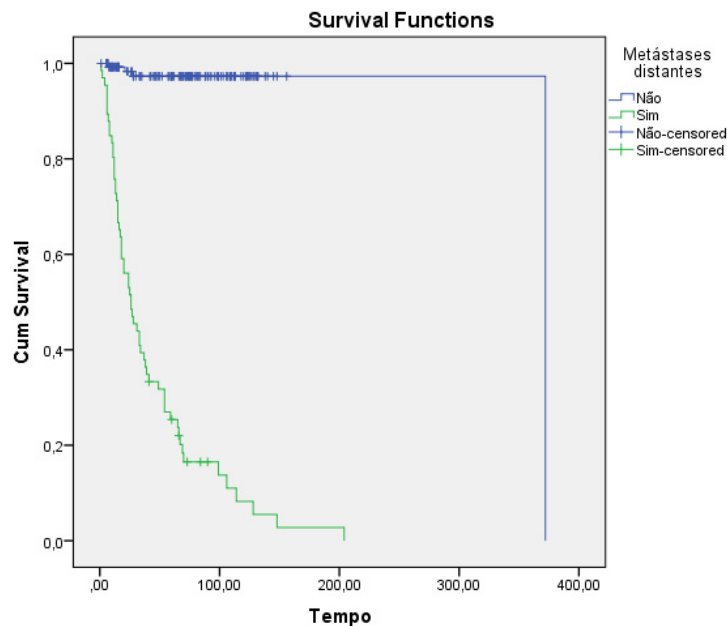


Figura 35. Sobrevivência em função da presença de metástases distantes ($p < 0,001$). Md: metástases distantes.

A diferença das curvas de sobrevivência em função da ocorrência de metástases distantes ($p < 0,001$) pode ser observada na Fig. 35. A sobrevivência global dos doentes com metástases ganglionares regionais (média de 44,3 meses, mediana de 26 meses) foi significativamente menor do que a dos doentes sem metástases distantes (média de 362,5 meses, mediana de 372 meses).

4.2.2. Biopsia selectiva do gânglio sentinela

Cento e trinta e quatro doentes (47 mulheres e 87 homens) foram submetidos a biopsia do gânglio sentinela. A média etária foi de 59 anos (desvio-padrão de 14,5 anos) e a mediana foi de 63 anos (intervalo interquartil de 21,25 anos), variando de 27 a 85 anos. A espessura média dos melanomas foi de 3,5 mm (desvio-padrão de 3,7 mm), com mediana de 2,0 mm (intervalo interquartil de 3,25 mm).

A biopsia do gânglio sentinela foi positiva em 21,6% dos doentes (Tabela 47), tendo sido a percentagem de positividade significativamente superior nos indivíduos do sexo masculino (36,2%) em relação aos do sexo feminino (13,8%), conferindo aos homens um risco de 3,5 vezes (IC 95%: 1,5-8,3) de terem micrometástases no gânglio sentinela, conforme resultado do *odds ratio* ($p = 0,003$).

Tabela 47. Estado do gânglio sentinela em função do sexo.

		Gânglio sentinela		Odds		
		Negativo	Positivo	p	ratio	Total
Sexo	Masculino	30 (63,8%)	17 (36,2%)	0,003	3,5	47 (35,1%)
	Feminino	75 (86,2%)	12 (13,8%)			87 (64,9%)
Total		105 (78,4%)	29 (21,6%)			134 (100%)

A idade dos doentes com gânglio sentinela positivo (média de 58,6 anos e mediana de 63 anos) foi sensivelmente idêntica à dos que tiveram gânglio sentinela negativo (média de 59,1 anos, mediana de 61 anos), conforme ilustrado na Fig. 36.

A espessura do tumor primário influenciou o resultado da biopsia do gânglio sentinela (Fig. 36), tendo sido significativamente mais elevada nos doentes com gânglio sentinela positivo (média de 7,0 mm e mediana de 6,0 mm *versus* média de 2,6 mm e mediana de 1,7 mm nos doentes com gânglio sentinela negativo).

A percentagem de doentes com micrometástases no gânglio sentinela, que foi nula nos doentes com tumores de espessura menor que 1,0 mm e inferior a 15% nos doentes classificados nas categorias T2 e T3 (espessura entre 1,01 e 4,0 mm), aumentou radicalmente a partir dos 4,0 mm de espessura (Tabela 48), onde se verificou uma taxa de 51,5% de doentes com pelo menos um gânglio sentinela positivo ($p < 0,001$).

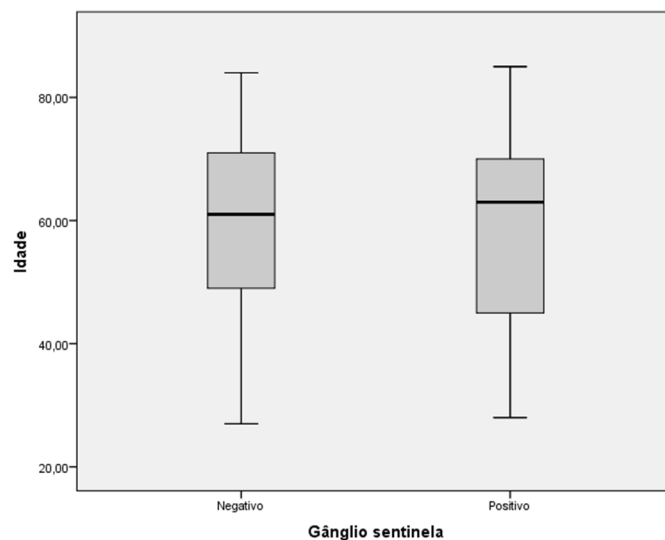


Figura 36. Idade em função do estado do gânglio sentinela (negativo: média de 59,1 anos, mediana de 61 anos; positivo: média de 58,6 anos, mediana de 63 anos) ($p=0,873$).

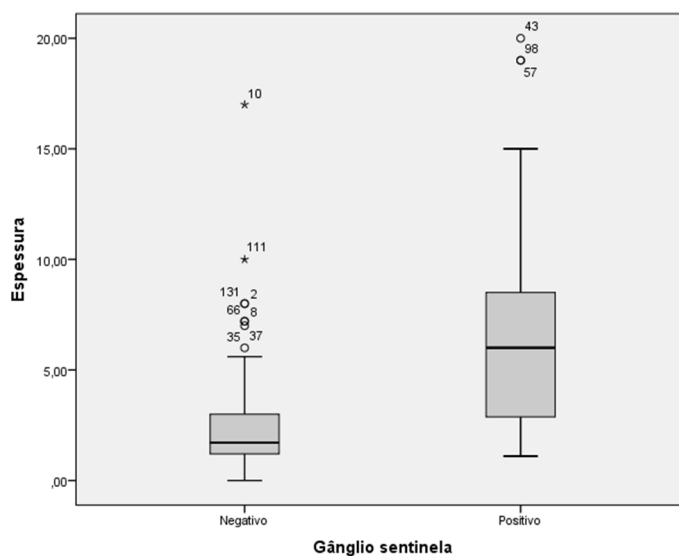


Figura 37. Espessura do melanoma em função do estado do gânglio sentinela (negativo: média de 2,6 mm e mediana de 1,7 mm; positivo: média de 7,0 mm e mediana de 6,0 mm) ($p < 0,001$).

Tabela 48. Estado do gânglio sentinela em função da categoria T.

Gânglio sentinela	Categoria T					p
	<i>In situ</i>	0-1,0 mm	1,01-2,0 mm	2,01-4,0 mm	>4,0 mm	
Negativo	2 (100%)	13 (100%)	45 (88,2%)	24 (85,7%)	16 (48,5%)	<0,001
Positivo	0	0	6 (11,8%)	4 (14,3%)	17 (51,5%)	

A percentagem de doentes com gânglio sentinela positivo foi de 34,4% nos que tinham tumores primários ulcerados e de 18,2% nos que não tinham ulceração do tumor primário (Tabela 49), diferença que esteve próxima da significância estatística ($p = 0,06$).

Tabela 49. Estado do gânglio sentinela em função da ulceração do melanoma.

		Gânglio sentinela		P
		Negativo	Positivo	
Ulceração	Ausente	81 (81,8%)	21 (65,6%)	0,06
	Presente	18 (18,2%)	11 (34,4%)	
Total		99 (100%)	32 (100%)	

O resultado da biópsia do gânglio sentinela não foi estatisticamente influenciado pela localização do melanoma primário (Tabela 50).

Tabela 50. Estado do gânglio sentinela em função da localização do melanoma.

G. sentinela	Tipo de melanoma					p
	Cabeça e pescoço	Tronco	Membro superior	Membro inferior	Não classificado	
Negativo	13 (86,7%)	35 (71,4%)	9 (90%)	47 (81%)	1 (50%)	0,379
Positivo	2 (13,3%)	14 (28,6%)	1 (10%)	11 (19%)	1 (50%)	
Total	15 (11,1%)	49 (36,1%)	10 (7,5%)	58 (43,3%)	2 (1,5%)	

Apesar da tendência observada dos melanomas nodulares estarem associados a uma proporção mais elevada de micrometástases no gânglio sentinela (Tabela 51), não se obteve significado estatístico nesta observação ($p=0,06$).

Após a regressão logística, o sexo ($p=0,004$) e a categoria T ($p<0,001$) continuaram a ter significado estatístico como preditores do estado do gânglio sentinela. O *odds ratio* ajustado do sexo foi de 4,4 (IC 95%: 1,6-11,9) e o da categoria T foi de 3,3 (IC 95%: 1,9-5,9).

Tabela 51. Estado do gânglio sentinela em função do tipo de melanoma.

G. sentinela	Tipo de melanoma					p
	Lêntigo maligno	Melanoma crescimento superficial	Melanoma acral	Melanoma nodular	Outros	
Negativo	1 (100%)	47 (87%)	21 (84%)	21 (61,8%)	15 (75%)	0,06
Positivo	0	7 (13%)	4 (16%)	13 (38,2%)	5 (25%)	
Total	1 (0,7%)	54 (40,3%)	25 (18,7%)	34 (25,4%)	20 (14,9%)	

A biopsia do gânglio sentinela foi preditiva do risco de metastização (Tabela 52). Assim, os doentes com gânglio sentinela metastático tiveram um risco de 5,2 vezes (IC 95%: 1,9-13,9) de metastização em trânsito, 5,9 vezes (IC 95%: 2,4-14,7) de metastização distante e de 7,4 vezes (IC 95%: 2,9-18,4) de morte relacionada com o melanoma ($p < 0,001$).

Tabela 52. Risco de metastização em trânsito, metastização à distância e morte por melanoma em função do estado do gânglio sentinela.

		Gânglio sentinela		p	Odds Ratio
		Negativo	Positivo		
Metástases em trânsito	Não	94 (89,5%)	11 (10,5%)	<0,001	5,2
	Sim	18 (62,1%)	11 (37,9%)		
	Total	112 (83,6%)	22 (16,4%)		
Metástases distantes	Não	89 (84,8%)	16 (15,2%)	<0,001	5,9
	Sim	14 (48,3%)	15 (51,7%)		
	Total	103 (76,9%)	31 (23,1%)		
Morte por melanoma	Não	90 (85,7%)	15 (14,3%)	<0,001	7,4
	Sim	13 (46,8%)	16 (55,2%)		
	Total	103 (76,9%)	31 (23,1%)		

A sobrevivência livre de doença (Fig. 38) foi significativamente mais curta em doentes com biopsia de gânglio sentinela positiva (3 meses *versus* 119 meses, em média, $p < 0,001$).

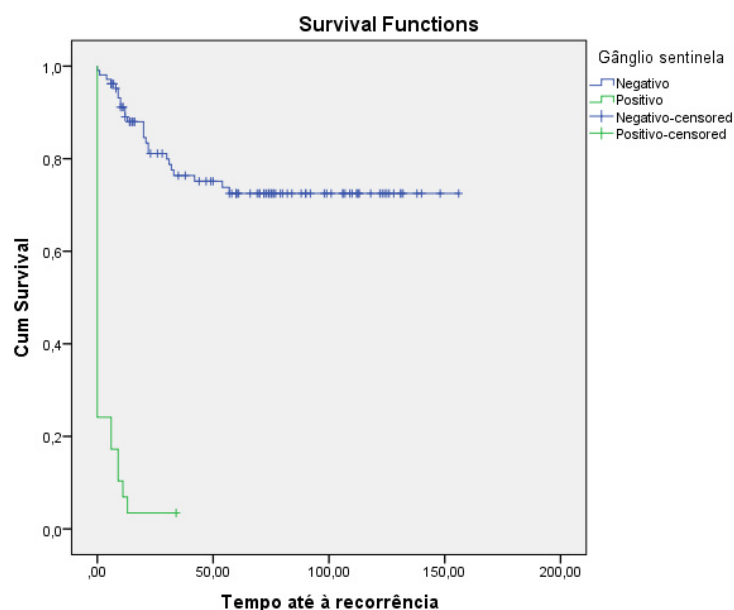


Figura 38. Sobrevivência livre de doença em função do estado do gânglio sentinela.

A sobrevivência global (Fig. 39) foi igualmente mais curta em doentes com biopsia do gânglio sentinela positivo ($p < 0,001$). A sobrevivência aos 30 meses (2,5 anos) foi de 94,6% nos doentes com gânglio sentinela negativo e de 44,4% nos que tiveram gânglio sentinela positivo ($p < 0,001$), o que traduz um risco de morte de 31,3 vezes (IC 95%: 10,2-96,6) nos doentes com gânglio sentinela positivo. Aos 60 meses (5 anos), estas percentagens foram de respectivamente 85,7% e 33,6% ($p < 0,001$), significando um risco de morte de 11,4 vezes (IC 95%: 4,6-29,2) nos doentes com gânglio sentinela positivo.

Trinta e três doentes submetidos a biopsia do gânglio sentinela, 15 do sexo masculino (45,5%) e 18 do sexo feminino (54,5%), tinham melanomas espessos ($> 4,0$ mm). A idade média destes doentes foi de 63,4 anos (mediana de 67 anos e desvio-padrão de 14,1 anos), tendo variado de 28 a 85 anos. A espessura média dos melanomas deste subgrupo foi de 8,3 mm (mediana de 7,0 mm e desvio-padrão de 4,5 mm), tendo variado de 4,4 a 20 mm. A ulceração estava presente em 51,5% dos tumores e a localização anatómica mais comum foi o membro inferior (51,5%), seguido pelo tronco (39,4%), cabeça e pescoço (6,1%) e membro superior (3%). O tipo de melanoma mais comum foi o melanoma nodular (54,5%), seguido pelo melanoma acral (24,2%), outros tipos de melanoma (12,1%) e melanoma de crescimento superficial (9,1%). O tempo médio de seguimento foi de 35,6 meses (mediana de 28 meses, desvio-padrão de 27,7 meses), tendo variado entre 6 e 109 meses.

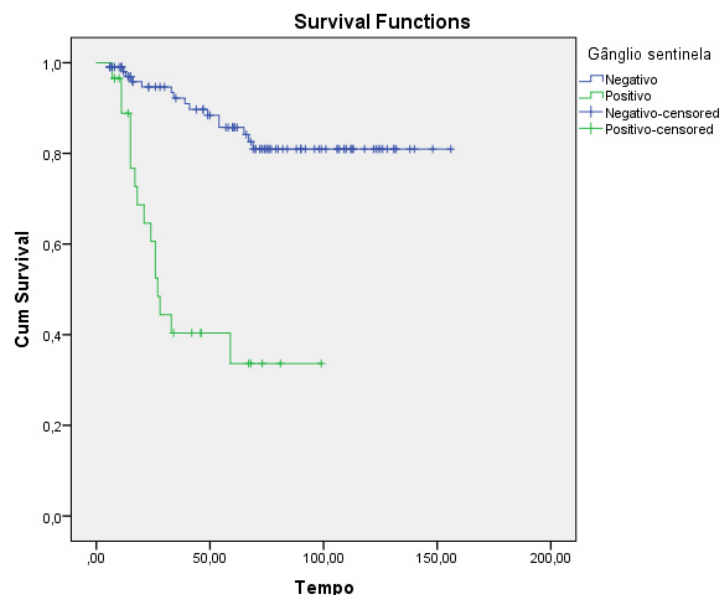


Figura 39. Sobrevivência em função do estado do gânglio sentinela.

A taxa de positividade da biopsia de gânglio sentinela foi significativamente mais elevada nos doentes com tumores espessos (51,5%) do que nos tumores com espessura igual ou inferior a 4,0 mm (10,6%) ($p < 0,001$). Deste modo, ter um melanoma com mais de 4,0 mm

de espessura acarretou um risco de 8,9 vezes (IC 95%: 3,5-23,0) de ter metástases no gânglio sentinela (Tabela 53).

Tabela 53. Estado do gânglio sentinela em função da espessura do melanoma (inferior ou igual a 4 mm versus superior a 4 mm).

		Gânglio sentinela		p	Odds Ratio
		Negativo	Positivo		
Espessura	≤4 mm	84 (89,4%)	10 (10,6%)	<0,001	8,9
	>4 mm	16 (48,5%)	17 (51,5%)		
Total		100	27		

No grupo “tumores espessos (>4,0 mm)” não se observou diferença estatística entre os doentes com gânglio sentinela positivo e doentes com gânglio sentinela negativo relativamente às taxas de metastização em trânsito, metastização à distância e morte relacionada com o melanoma (Tabela 54).

Tabela 54. Risco de metastização em trânsito, metastização à distância e morte por melanoma em função do resultado da biopsia do gânglio sentinela em doentes com melanoma espesso (>4 mm).

		Gânglio sentinela		p
		Negativo	Positivo	
Metástases em trânsito	Não	9	9	0,849
	Sim	7	8	
Total		16	17	
Metástases distantes	Não	11	8	0,208
	Sim	5	9	
Total		16	17	
Morte por melanoma	Não	11	7	0,112
	Sim	5	10	
Total		16	17	

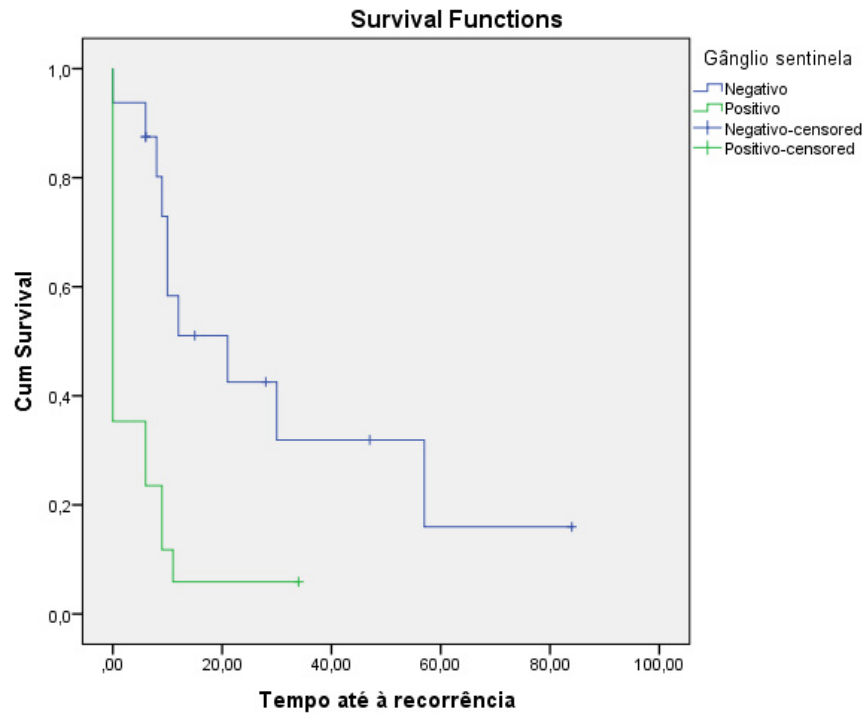


Figura 40. Sobrevivência livre de doença em função do estado do gânglio sentinela no subgrupo de melanomas espessos (>4,0 mm).

Nestes doentes com tumores espessos, a sobrevivência livre de doença foi significativamente mais curta nos doentes com metástases no gânglio sentinela (31,4 meses *versus* 4,4 meses, em média) ($p < 0,001$). A diferença entre as curvas de sobrevivência livre de doença dos doentes com gânglio sentinela positivo e com gânglio sentinela negativo (Fig. 40) foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

Em relação aos melanomas espessos (>4,0 mm), não se observou diferença estatística entre as curvas de sobrevivência global dos doentes com gânglio sentinela positivo e com gânglio sentinela negativo (Fig. 41) ($p = 0,194$).

A sobrevivência global aos 60 meses (5 anos) foi de 57% nos doentes com gânglio sentinela negativo e de 37,8% nos que tiveram gânglio sentinela positivo, diferença que não teve significado estatístico ($p = 0,387$). No entanto, a sobrevivência a curto prazo, avaliada aos 30 meses (2,5 anos) foi significativamente maior nos doentes com gânglio sentinela negativo (83,1% *versus* 44,1%, $p = 0,008$), correspondendo a um risco de morte de 7,9 vezes (IC 95%: 1,6-39,4) nos doentes com gânglio sentinela positivo.

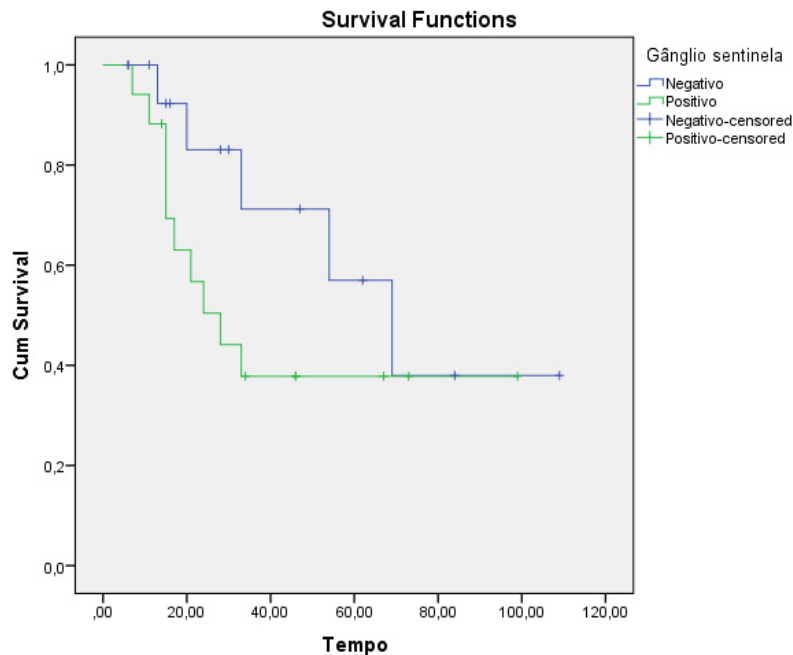


Figura 41. Sobrevivência global em função do estado do gânglio sentinela no subgrupo de melanomas espessos (>4,0 mm).

4.2.3. Progressão da doença loco-regional

Dos 208 doentes, 88 (42,3%) tiveram metastização loco-regional (metástases satélites, em trânsito e/ou ganglionares regionais).

Houve progressão para metastização à distância em 54 destes doentes (61,4%). A comparação entre as variáveis clínico-patológicas dos doentes com doença loco-regional que progrediu para metastização à distância é discriminada na Tabela 55. Nenhuma variável foi significativamente distinta entre os grupos com e sem progressão, à exceção da morte relacionada com o melanoma, uma vez que aqueles cuja doença loco-regional teve progressão metastática à distância tiveram um risco de morte por melanoma estimado em 60 vezes ($p < 0,001$; IC 95%: 15,6-230,3). No entanto, o *odds ratio* ajustado à idade foi ainda mais elevado: 82,6 (IC 95%: 17,8-382,2).

A sobrevivência livre de doença foi, em média, de 7,9 meses nos doentes com progressão para doença metastática à distância e de 9,6 meses naqueles que cuja doença loco-regional não progrediu. Estes dados corresponderam a curvas de sobrevivência praticamente sobreponíveis entre os 2 grupos (Fig. 42), entre as quais não se observou diferença estatisticamente significativa ($p = 165$).

Tabela 55. Progressão da doença loco-regional para doença à distância em função do sexo, idade, espessura, ulceração, tipo, localização do melanoma e morte por melanoma.

Melanoma com metástases					
loco-regionais					
		Sem progressão (n = 34)	Com progressão (n = 54)	P	OR
Sexo	Masculino	16 (36,4%)	28 (63,6%)	0,661	—
	Feminino	18 (40,9%)	26 (59,1%)		
Idade (anos)	Média	66,8	61,2	0,069	—
	Mediana	70,5	66,0		
Espessura (mm)	Média	5,3	6,9	0,223	—
	Mediana	5,0	6,0		
Ulceração	Ausente	20	26	0,638	—
	Presente	13	21		
Tipo	Lêntigo maligno	0	0	0,156	—
	Mel. cresc. Superficial	9 (56,2%)	7 (43,8%)		
	Melanoma acral	9 (50%)	9 (50%)		
	Melanoma nodular	13 (31,7%)	28 (68,3%)		
	Outros	3 (23,1%)	10 (76,9%)		
Localização	Cabeça e pescoço	4 (36,4%)	7 (63,6%)	0,491	—
	Tronco	10 (37,1%)	17 (62,9%)		
	Membro superior	2 (25%)	6 (75%)		
	Membro inferior	18 (46,2%)	21 (53,8%)		
	Não classificado	0	3 (100%)		
Morte por melanoma	Não	30 (83,3%)	6 (16,7%)	<0,001	60,0
	Sim	4 (7,7%)	48 (92,3%)		

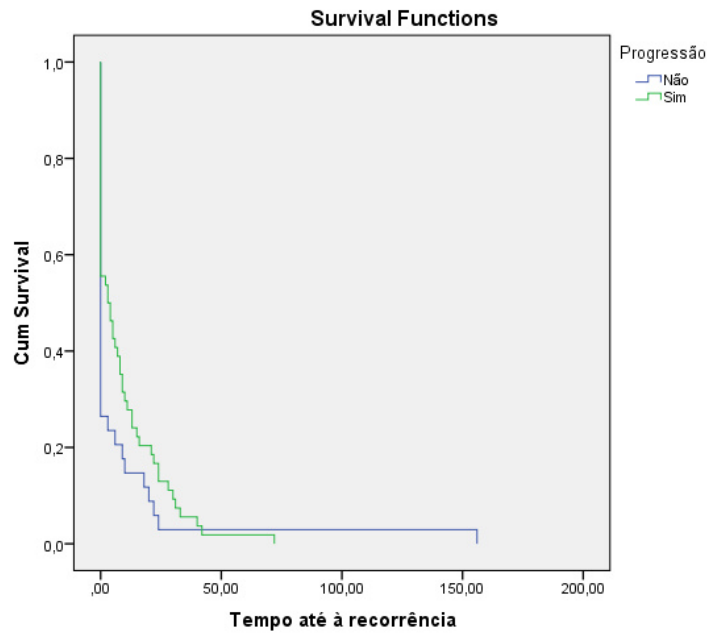


Figura 42. Sobrevivência livre de doença nos casos com doença loco-regional em função da progressão para metastização distante ($p=0,165$).

A sobrevivência global dos doentes com doença loco-regional foi significativamente menor no grupo em que houve progressão para metastização à distância (48 meses) do que no grupo em que a metastização à distância não ocorreu (326,8 meses). Desta forma, as curvas de sobrevivência global (Fig. 43) diferenciam-se com um forte significado estatístico ($p<0,001$).

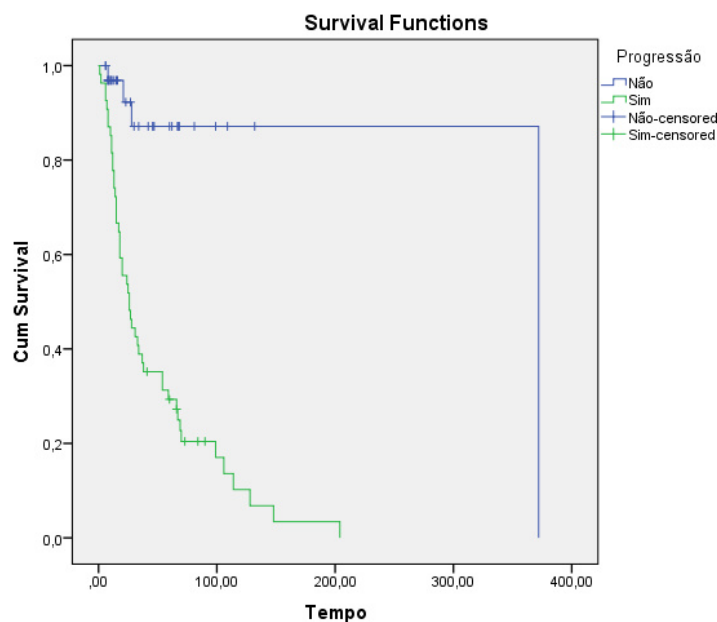


Figura 43. Sobrevivência global nos casos com doença loco-regional em função da progressão para metastização distante ($p<0,001$).

4.2.4. Vias metastáticas

Dos 208 doentes, 66 (31,7%) desenvolveram doença metastática distante. As vias metastáticas através das quais se verificou a disseminação da doença encontram-se descritas na Fig. 44. As metástases ganglionares regionais ocorreram como foco metastático inaugural (via B) em 35 doentes (53,0%), as metástases em trânsito (via A) em 20 casos (30,3%) e as metástases distantes em 11 (16,7%).

Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre os doentes das distintas vias metastáticas no que concerne às variáveis clínico-patológicas em estudo, conforme o exposto na tabela 56, com excepção da idade ($p=0,042$). Porém, no teste de comparações múltiplas de Bonferroni, a diferença da média etária não evidenciou significado estatístico quando se compararam as várias vias metastáticas entre si (B-A: $p=0,66$; B-C: $p=280$ e C-A: $p=0,870$).

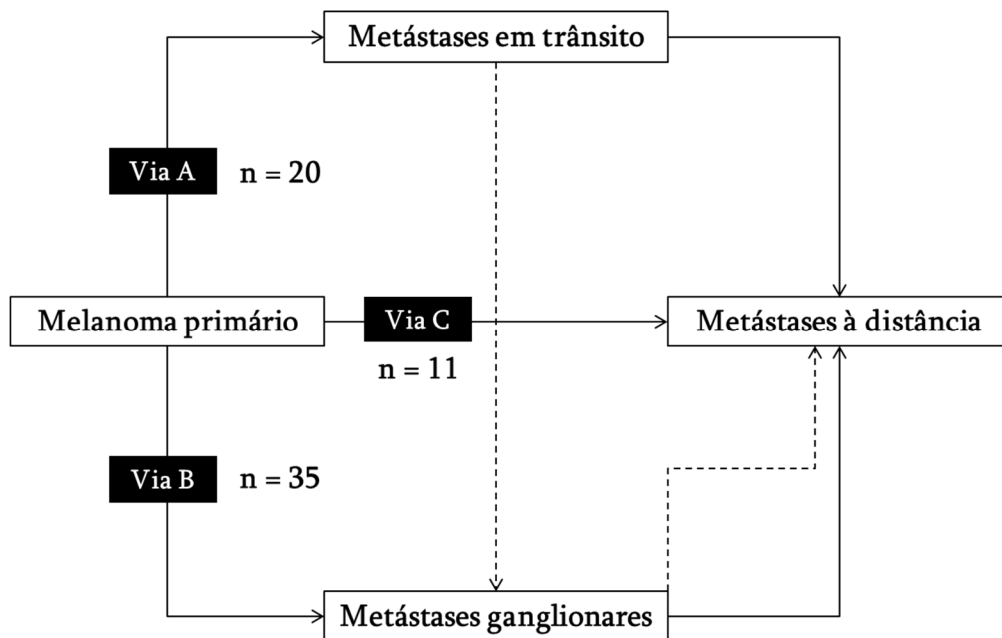


Figura 44. Distribuição dos casos (n=66) em função da via metastática.

Tabela 56. Vias metastáticas do melanoma.

		Via metastática			
		A	B	C	P
Sexo	Masculino	9 (27,3%)	19 (57,6%)	5 (15,1%)	0,760
	Feminino	11 (33,3%)	16 (48,5%)	6 (18,2%)	
Idade (anos)	Média	67,3	57,5	67,3	0,042
	Mediana	69,5	62,0	71,0	
Espessura (mm)	Média	6,9	6,7	4,1	0,316
	Mediana	6,0	4,8	4,0	
Ulceração	Ausente	9 (22,5%)	17 (42,5%)	14 (35%)	0,723
	Presente	8 (29,6%)	13 (48,2%)	6 (22,2%)	
Tipo	Lêntigo maligno	0	0	0	0,129
	Mel. cresc. superficial	5 (50%)	2 (20%)	3 (30%)	
	Melanoma acral	4 (30,8%)	5 (38,4%)	4 (30,8%)	
	Melanoma nodular	8 (26,7%)	20 (66,7%)	2 (6,6%)	
	Outros	3 (23,1%)	8 (61,5%)	2 (15,4%)	
Localização	Cabeça e pescoço	4 (44,4%)	4 (44,4%)	1 (11,2%)	0,791
	Tronco	5 (25%)	12 (60%)	3 (15%)	
	Membro superior	3 (50%)	3 (50%)	0	
	Membro inferior	8 (28,6%)	14 (50%)	6 (21,4%)	
	Não classificado	0	2 (66,7%)	1 (33,3%)	
Morte por melanoma	Não	3	3	0	0,386
	Sim	17	32	11	

A sobrevivência livre de doença (Fig. 45), a sobrevivência livre de metástases distantes (Fig. 46 e Tabela 57) e a sobrevivência global (Fig. 47), conforme pode ser avaliado pela comparação das respectivas curvas de sobrevivência, foram estatisticamente idênticas entre as três vias metastáticas estudadas.

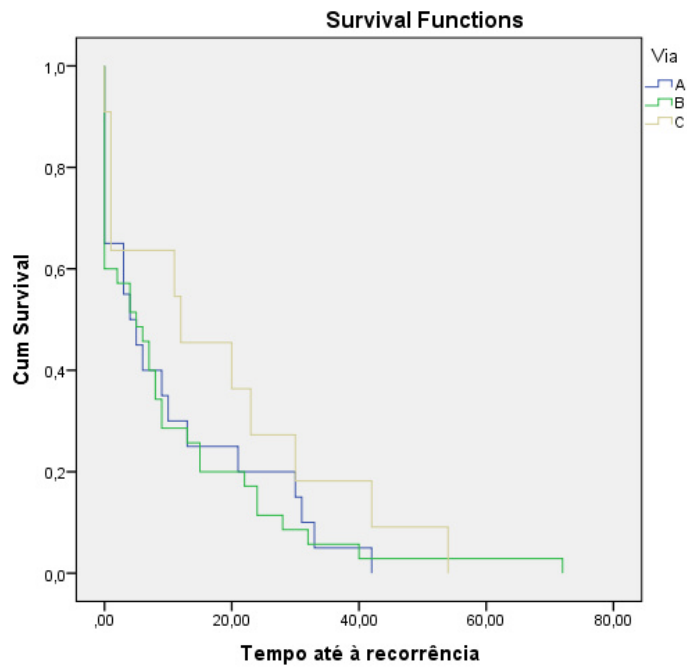


Figura 45. Sobrevivência livre de doença em função da via metastática (p=0,428).

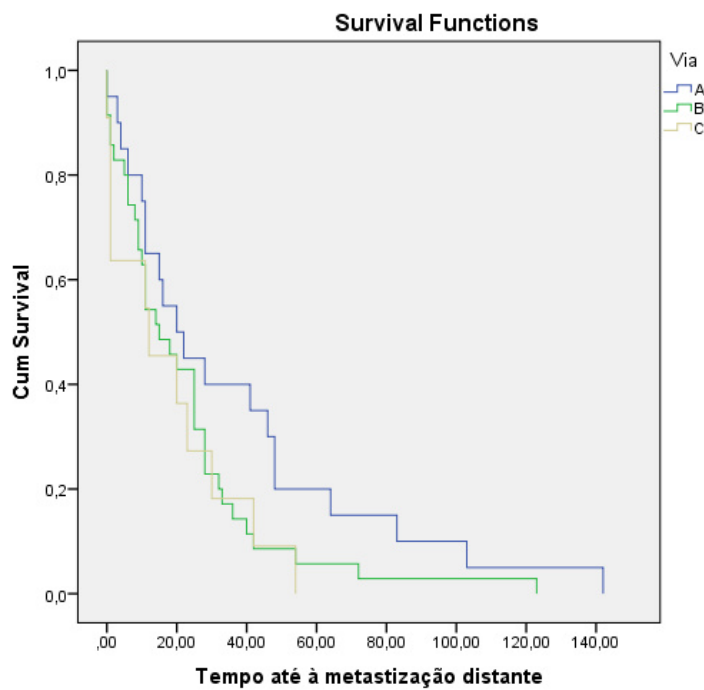


Figura 46. Sobrevivência livre de metástases distantes em função da via metastática (p=0,170).

Tabela 57. Sobrevivência livre de metástases distantes (Tmd).

		Tmd (meses)	p
Sexo	Masculino	21,8	0,404
	Feminino	29,4	
Grupo etário	21-40 anos	22,6	0,363
	41-60 anos	26,4	
	61-80 anos	27,9	
	>80 anos	15,4	
Espessura (T)	0-1,0 mm (T1)	—	0,12
	1,01-2,0 mm (T2)	46,4	
	2,01-4,0 mm (T3)	32,3	
	>4 mm (T4)	20,1	
Ulceração	Ausente	31,9	0,522
	Presente	22,6	
Tipo	Lêntigo maligno	—	0,376
	Melanoma cresc. superf.	40,5	
	Melanoma acral	32,5	
	Melanoma nodular	21,8	
	Outros	16,1	
Localização	Cabeça e pescoço	29,0	0,180
	Tronco	19,9	
	Membro superior	38,7	
	Membro inferior	28,3	
	Não classificado	2,3	
Morte por melanoma	Não	19,7	0,836
	Sim	26,2	

Também não houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas de sobrevivência a partir da metastização distante dos doentes das três vias metastáticas ($p=0,620$ no teste *log-rank* de Mantel-Cox). Assim, desde que foi diagnosticada a doença metastática, a sobrevivência média foi de 19,6 meses (mediana de 6 meses) na totalidade da amostra. Em relação a cada uma das vias, foi de 16,5 meses (mediana de 6 meses) nos doentes da via A, 22,6 meses (mediana de 5 meses) nos doentes da via B e 10,3 meses (mediana de 5 meses) nos doentes da via C.

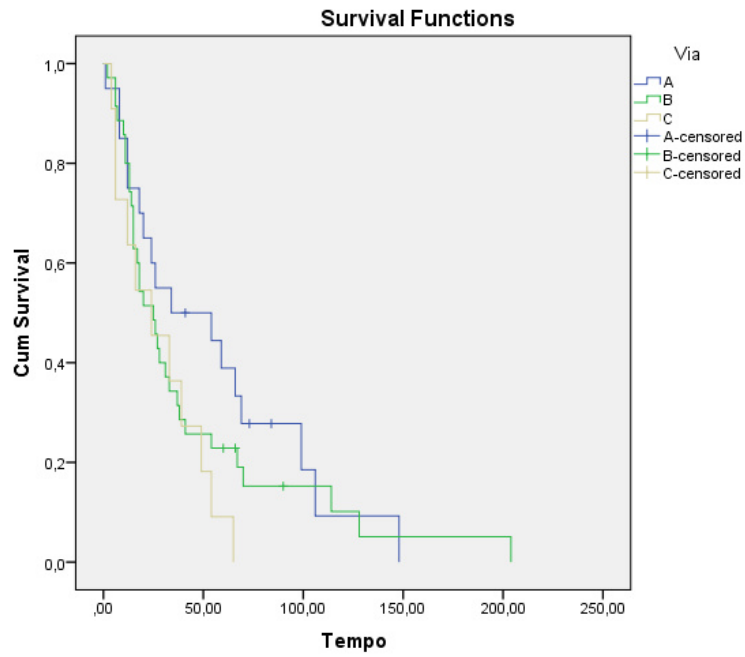


Figura 47. Sobrevivência global em função da via metastática ($p=0,210$).

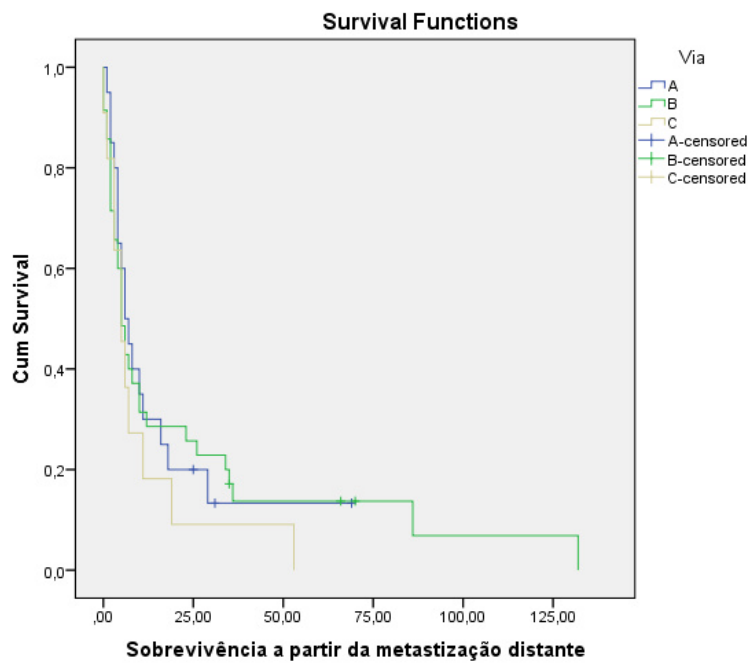


Figura 48. Sobrevivência a partir do diagnóstico de metastização distante em função da via metastática ($p=0,620$).

Capítulo V

Discussão

2.1. Aspectos metodológicos

2.1.1. Selecção da amostra

A amostragem estratificada foi o método utilizado para seleccionar os casos integrantes dos grupos A e B. Para tal, definiu-se um intervalo temporal considerado adequado em função dos objectivos do estudo e incluíram-se todos os indivíduos contidos nessa subdivisão. A adopção desta técnica de amostragem residiu na previsibilidade de uma relativa constância das variáveis em distintas subdivisões temporais, facto importante para a evicção de um viés de selecção.

Houve, no entanto, uma limitação relacionada com os critérios de exclusão que teve uma possível influência na composição dos grupos. Por necessidade do próprio estudo, apenas se consideraram os indivíduos com seguimento clínico suficientemente prolongado (essencial para a análise dos factores de prognóstico clínico-patológicos e de uma eventual relação de mutações encontradas com a progressão da doença) e aqueles em relação aos quais havia disponibilidade de peças de tecido para a análise genética (um dos objectivos centrais do trabalho). Se no grupo B esta limitação condicionou a exclusão de um número relativamente baixo de casos ($n=4$; 5,7%), no grupo A levou à exclusão de 115 casos (51,3%). Contudo, este facto não influenciou o estudo clínico retrospectivo, uma vez que a indisponibilidade de

amostras de tecido não foi considerada um critério de exclusão para este estudo. Dessa forma, apenas foram retirados 16 doentes (7,1%) desta vertente do trabalho.

A razão da elevada taxa de exclusão de doentes a incluir na análise mutacional deveu-se ao grande número de casos de melanoma referenciados ao Serviço de Dermatologia do CHUC a partir de outras unidades hospitalares (n=97). Muitos destes doentes foram aceites para tratamento já depois da biopsia excisional do tumor primário ter sido realizada nos hospitais de origem. Por isso, em relação a estes casos, não havia disponibilidade de nenhuma peça parafinada relativa a amostras de tecido tumoral. Além disso, alguns desses doentes, considerados de menor risco, voltaram para seguimento no hospital de origem após terem sido submetidos a tratamento adequado, pelo que não havia registos clínicos ulteriores que permitissem conhecer a evolução da doença.

O impacto deste viés de selecção pode ser apreciado na distribuição dos tipos anatómo-clínicos de melanoma submetidos a estudo genético: o melanoma nodular foi predominante (38,3%), seguido respectivamente pelos melanoma acral (27,1%), melanoma de crescimento superficial (25,9%) e lântigo maligno (4,9%). Em contraste, e apesar de alguma discrepância entre diferentes séries, o melanoma de crescimento superficial surge na literatura como o mais comum (70-75%), secundado pelos melanoma nodular (20-25%), lântigo maligno (5-10%) e melanoma acral (5%)^[307]. Por isso, o facto dos doentes de menor risco terem sido devolvidos ao hospital de origem produziu uma sobre-valorização dos melanomas nodulares e acrais, bem como da espessura média dos tumores desta série (5,0 mm).

O impacto dos critérios de exclusão na composição do grupo B foi aparentemente menor. No entanto, há a ressaltar um viés importante na selecção dos nevos melanocíticos, uma vez que esta decorreu da decisão prévia de efectuar a sua excisão cirúrgica, resultado de critérios diversificados e heterogéneos (atipia clínica, razões cosméticas, ou outras). Considerando questões éticas relacionadas com uma potencial excisão desnecessária de nevos melanocíticos, inevitavelmente inerente a uma selecção aleatória de lesões, a escolha deste método de selecção pareceu adequar-se aos propósitos de se obter um grupo de lesões melanocíticas benignas a ser utilizado como controlo.

2.1.2. Mutações seleccionadas

As mutações foram seleccionadas por critérios científicos (mutações previamente detectadas numa linha celular de melanoma submetida a sequenciação genómica^[31]) e

técnicos (mutações em regiões genéticas sem sequências repetitivas de bases e sem polimorfismos além das variantes pesquisadas, de forma a garantir uma boa taxa de genotipagem, considerando o tipo de amostras e a tecnologia utilizada).

As mutações em causa foram previamente identificadas através da sequenciação genómica de uma linha celular derivada de uma metástase de melanoma, mas a sua ocorrência em melanomas primários e nas suas metástases era desconhecida, daí que se tenha pretendido avaliá-la, na perspectiva de identificar novos genes influentes na oncogénese ou na progressão do melanoma.

2.1.3. Isolamento do DNA

A natureza das amostras de tecido disponíveis para a genotipagem (amostras fixadas em formol e incluídas em parafina) acrescentou algumas dificuldades. Estas amostras preservam eficazmente os detalhes citológicos e a arquitectura tecidual e permitem um armazenamento simples à temperatura ambiente durante períodos de tempo bastante longos. Todavia, o processo de fixação e inclusão prejudica a eficácia da extração e a qualidade do DNA, limitando a possibilidade de realizar análises moleculares e afectando potencialmente os resultados da genotipagem^[301]. A influência que os processos de fixação e inclusão exercem na fragmentação dos ácidos nucleicos e no conseqüente aparecimento de mutações artefactuais e de falsos negativos foi previamente demonstrada^[302]. As mutações artefactuais do tipo C>T/G ou A>G/T e a desaminação da citosina ou da adenosina, levando respectivamente à formação de uracilo ou hipoxantina, aparecem com relativa frequência em isolamentos de DNA provenientes de amostras de tecido parafinado. O risco destes artefactos pode ser prevenido usando grande quantidade de DNA de cadeia dupla, realizando múltiplas amplificações ou recorrendo a métodos apropriados de extração que tenham a capacidade de reverter parcialmente as modificações que o formol induz nos ácidos nucleicos, factos tidos em consideração no decurso do presente trabalho.

As dificuldades referidas resultaram na exclusão de 24 (17,8%) amostras do grupo A e 32 (48,5%) do grupo B. A taxa de exclusão foi significativamente mais elevada no grupo B ($p < 0,001$), o que pode ser explicado por um menor volume das amostras provenientes destes doentes, que correspondiam a peças relativamente pequenas resultantes da excisão de nevos melanocíticos. Pode extrapolar-se que a uma menor disponibilidade de tecido correspondeu, assim, uma menor quantidade de DNA extraído. Em função disso, o tamanho da amostra

parece ser um factor limitante da extracção de DNA a partir de blocos de parafina através desta técnica.

2.1.4. Genotipagem

Apesar da utilização de DNA abaixo dos níveis recomendados e da ausência de normalização das amostras, em virtude das limitações resultantes da heterogeneidade das concentrações iniciais de DNA, foram genotipadas 130 amostras (89,7%) para mais de 60% das mutações em estudo. Dada a natureza das amostras (peças fixadas com formol e incluídas em parafina), esta taxa traduz resultados de boa qualidade. Pela ausência de um padrão comum nas 21 amostras cuja genotipagem não foi bem sucedida, não foi possível concluir acerca de eventuais factores que determinaram os insucessos pontuais.

Estes resultados sugerem que a genotipagem por sondas TaqMan™ é aplicável a tecidos incluídos em parafina. Todavia, os resultados das diversas genotipagens realizadas numa mesma amostra nem sempre foram reprodutíveis (ora detectaram certas mutações em heterozigotia, ora revelaram homozigotia para a variante selvagem do gene em causa). Esta falta de sensibilidade e robustez não ocorre geralmente noutros materiais biológicos e pode explicar-se por uma grande heterogeneidade dos tecidos em estudo, constituídos por células neoplásicas e células normais. Nesse caso, a ocorrência de falsos negativos por amplificação do DNA de células normais pode ter sido um problema central, revelando um genótipo heterozigótico em amostras com os dois alelos mutados ou uma incapacidade de identificar uma mutação em heterozigotia. Em virtude disso, parece ser altamente recomendável incluir na genotipagem apenas os espécimes cuja população de células tumorais seja superior a 50%, facto nem sempre controlável, dada a natureza das peças. Assim, a frequência alélica das variantes mutadas e a existência de outras mutações pode ter sido subestimada nas amostras estudadas, particularmente naquelas em que a heterogeneidade celular é previsivelmente maior, como é o caso do grupo A.

2.2. Análise mutacional

2.2.1. Considerações gerais

A frequência alélica das 4 mutações observadas foi muito baixa, quer nos melanomas quer nos controlos (0,0098 a 0,0714), o que impossibilitou, desde logo, uma avaliação do seu impacto prognóstico através da análise estatística com estudo multivariado, considerando a influência de factores como a espessura e a ulceração do tumor primário. Este facto, dependente de resultados que eram à partida imprevisíveis, constitui um objectivo incumprido do trabalho.

Apenas a variante DLEC1 D215N não foi apontada como deletérea pelos *softwares* ANNOVARTM e SIFTTM, embora se possa admitir um provável carácter patológico, considerando que, de acordo com a base de dados 1000 Genomes DataTM, se trata de uma mutação que não foi observada previamente na população geral.

2.2.2. BAI3 D755N

O gene BAI3 (*brain-specific angiogenesis inhibitor 3*), situado no cromossoma 6q12 foi clonado e caracterizado em 1997 por Shiratsuchi *et al.*^[303]. Tem cerca de 745 kb e exhibe certa homologia com os genes BAI1 (8q24) e BAI2 (1p35). Estes genes codificam proteínas transmembranares da família dos receptores acoplados a proteína G. A proteína BAI3, de 171 kDa, tem uma sequência de 1.522 aminoácidos e, à semelhança das homólogas BAI1 e BAI2, encontra-se expressa no cérebro normal (córtex e hipocampo), onde parece regular a quantidade de sinapses excitatórias^[304]. Funciona igualmente como inibidor angiogénico^[308], estando a sua perda de expressão relacionada com a angiogénese cerebral induzida pela isquémia e com a progressão dos gliomas malignos^[304].

O promotor do gene BAI3 tem sítios com afinidade para diversos factores de transcrição (STAT5B, NRSF-1, NRSF-2, Pax-2, Pax-2a, E47, S8, AP2 γ e E2F1). É um gene alvo da proteína p53, contendo pelo menos um sítio de ligação funcional daquela proteína num dos intrões. A ligação de p53 promove a expressão de BAI3^[303].

No que concerne à sua relação com a oncogénese, o gene BAI3 funciona como onco-supressor, tendo-se observado mutações neste *locus* em vários tipos de neoplasias (gliomas^[304],

carcinomas da mama, pulmão, ovário e próstata^[30]). Outras 10 variantes mutadas foram descritas em estudos de sequenciação genómica, estando potencialmente envolvidas no melanoma^[31,67,139].

A perda de expressão de p53, quer ocorra por mutações genéticas quer por fenómenos epigenéticos, pode condicionar uma diminuição da expressão de BAI3, sendo mais um mecanismo teórico da carcinogénese induzida por perda funcional de TP53.

A mutação BAI3 D755N foi observada no tumor primitivo do doente A13 (sexo masculino, 83 anos). Esta mutação verificou-se em heterozigotia em 2 das 3 genotipagens efectuadas, uma discrepância possivelmente condicionada pela heterogeneidade do tecido estudado.

O tumor com a variante mutada de BAI3 ocorreu no dorso, uma região anatómica não submetida a exposição crónica à radiação UV, embora alvo potencial de padrões intermitentes de exposição. No sexo masculino, o dorso é a localização de maior risco para a ocorrência de melanoma^[305], particularmente quando se considera o melanoma de crescimento superficial. No entanto, o melanoma observado no doente A13 é do tipo nodular e este tipo anátomo-clínico não tem predilecção por área anatómica, havendo um risco relativamente uniforme de surgir em diferentes regiões do tegumento^[306]. Não é possível, portanto, estabelecer relações epidemiológicas com a exposição actínica. Adicionalmente, a mutação D755N em BAI3 corresponde a uma substituição G>A, que, não sendo uma troca C>T numa sequência dipirimidínica, não pode ser relacionada com a acção mutagénica directa da radiação UV.

O doente em causa teve progressão loco-regional da doença, facto para o qual já tinha elevado risco, em virtude do estadiamento inicial do tumor primário (T4a), não se podendo, com os dados disponíveis, evocar qualquer papel pejorativo da mutação observada. Não foi excisada nenhuma metástase em trânsito ou ganglionar deste doente, pelo que não se pôde estudar a expressão da variante mutada na doença metastática.

A mutação ocorreu em apenas um doente da série e, dada a baixa frequência da mutação (1,1%), seria necessário estudar um elevado número de indivíduos para investigar eventuais correlações etiopatogénicas com a exposição à radiação UV e com o prognóstico da doença.

2.2.3. DLEC1 D215N

O gene DLEC1 (*deleted in lung and esophageal cancer 1*), situado no cromossoma 3p22, foi clonado e caracterizado em 1999 por Daigo *et al.*^[307]. Tem aproximadamente 59 kb e compreende 37 exões. Codifica uma proteína de 195 kDa com 1.755 aminoácidos que pode ser encontrada em localização citoplasmática.

O gene DLEC1 é um gene onco-supressor. Antes da sua sequenciação e caracterização, vários autores descreveram perdas do braço curto do cromossoma 3 em carcinomas de diversas origens (pulmão, esófago e rim)^[307]. Ao longo da última década, têm surgido relatos que relacionam mutações inativadoras deste gene ou a sua repressão por fenómenos epigenéticos (metilação CpG do promotor ou hipo-acetilação das histonas) com neoplasias malignas (carcinomas do pulmão^[308], esófago^[307], rim^[309], estômago^[310], cólon^[310], mama^[311], espinhocelulares da cabeça e pescoço^[312], assim como linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin^[313]) e benignas (leiomiomas uterinos^[314]). A inactivação de DLEC1 pode influenciar negativamente o prognóstico da doença, conforme foi demonstrado em relação aos carcinomas do pulmão^[315], rim^[316] e ovário^[317]. Além da substituição nucleotídica D215N, outras 3 mutações foram descritas em estudos de sequenciação genómica como potencialmente envolvidas no melanoma^[31,139,140].

Na série estudada, a mutação DLEC_D215N foi observada em três melanomas cutâneos primários, verificando-se heterozigotia em 3 genotipagens, com dois tumores a resultarem homozigóticos para a variante normal do gene numa quarta genotipagem, corroborando a discrepância causada pela heterogeneidade dos tecidos. Os doentes com tumores mutados no *locus* DLEC1 eram todos do sexo feminino. Dois melanomas (A77 e A88) eram melanomas de crescimento superficial localizados na perna (região anatómica com maior risco de melanomas deste tipo no sexo feminino^[305]) e um era um melanoma nodular da face (A85). Apenas ocorreu metastização loco-regional e à distância neste último caso, de acordo com o risco conferido pelo estadiamento inicial (T4a). Os melanomas de crescimento superficial, no entanto, tinham espessuras de 1,2 (T2a) e 0,6 mm (T1a), respectivamente, e não metastizaram durante o tempo de seguimento das doentes. Assim, a inactivação de DLEC1, apesar de pouco comum (surgiu apenas em 3,7% dos casos), parece ser um acontecimento precoce na oncogénese do melanoma. No entanto, por razões idênticas às referidas em relação ao gene BAI3, não existe nenhuma evidência de que esta mutação possa ter ocorrido por acção mutagénica directa da radiação UV.

A mutação DLEC1_D215N também se observou em heterozigotia (resultado sobreponível em 3 genotipagens) em 2 nevos melanocíticos dérmicos (um no tronco e outro na face), o que corresponde a 7,1% dos nevos melanocíticos genotipados. Uma vez que esta mutação não está descrita na população geral, admite-se a sua participação na nevogénese ou como factor genético de susceptibilidade. Uma questão interessante que este achado levanta é se a perda de heterozigotia do *locus* DLEC1 num nevo melanocítico pode contribuir para a transformação maligna.

Requerem-se estudos adicionais para esclarecer o posicionamento das mutações de DLEC1 na oncogénese do melanoma.

2.2.4. MYO9A G2291V

O gene MYO9A (miosina IXA), situado no cromossoma 15q22-q23 foi clonado e caracterizado em 1999 por Gorman *et al.*^[318]. Tem aproximadamente 296 kb e compreende 37 exões. Codifica uma proteína de cerca de 293 kDa com 2548 aminoácidos que pertence à superfamília da miosina. Esta proteína (miosina IXA) é uma miosina não convencional, que partilha estruturalmente os domínios básicos da miosina convencional. Como outras miosinas não convencionais, a miosina IXA funciona como um motor molecular que intervém nos movimentos intracelulares. Esta acção depende da activação da GTPase Rho, um importante regulador do esqueleto de actina das células, fundamental para a migração celular e para o estabelecimento de uniões intercelulares^[319]. No sistema nervoso, a GTPase Rho influencia a morfologia e função neuronais.

Mutações deste gene foram associadas à síndrome de Bardet-Biedl, entidade de transmissão autossómica recessiva, de expressividade variável, caracterizada por atraso mental, obesidade, retinite pigmentosa, sindactilia, polidactilia, baixa estatura e hipogenitalismo^[318].

Além da mutação G2291V^[31], outra mutação somática de MYO9A foi indicada como potencialmente patogénica no melanoma^[139]. Uma expressão reduzida do gene MYO9A foi observada em amostras de carcinomas da mama^[320]. Num modelo de células epiteliais brônquicas em cultura, demonstrou-se que a depleção de miosina IXA nas células em migração leva à desorganização do citoesqueleto de actina e à disrupção das uniões intercelulares, conduzindo a dispersão celular^[319]. Esta evidência levanta a possibilidade da

perda funcional da miosina IXA ser um contributo para a progressão tumoral, facilitando a metastização.

Esta mutação foi encontrada apenas numa genotipagem do tumor primário do doente A43, um melanoma nodular da perna direita. Este melanoma metastizou por via linfática, condicionando o aparecimento de metástases em trânsito e ganglionares. Contudo, a mutação não foi encontrada nas duas metástases em trânsito estudadas. As explicações possíveis para esta discrepância são: (i) o resultado da genotipagem das metástases foi falsamente negativo devido a uma sub-representação de tecido tumoral nessas amostras, (ii) o resultado da genotipagem do tumor primário foi falsamente positivo ou (iii) houve uma nova mutação com perda de material genético em 15q, incluindo o gene MYO9A, durante a progressão tumoral.

Apesar da mutação ser apontada como deletérea pelos softwares ANNOVARTM e SIFTTM, a aparente falta de reprodutibilidade dos resultados coloca muitas reservas na interpretação dos mesmos.

2.2.5. TP63 M499I

O gene TP63, situado no cromossoma 3q28 foi clonado e caracterizado em 1998 por Yang *et al.*^[321]. Tem aproximadamente 266 kb e codifica uma proteína de cerca de 77 kDa com 680 aminoácidos que pertence à família da p53. Este gene, através de *splicing* alternativo ou pela presença de dois promotores, codifica diferentes isoformas de TP63 (TAp63 e ΔNp63)^[132]. Conforme sublinhado no Capítulo II, a proteína TAp63 é um factor de transcrição com funções anti-proliferativas e pró-apoptóticas, enquanto a proteína ΔNp63, exercendo uma actividade dominante-negativa sobre a p53, promove a proliferação e a sobrevivência das células.

Diversas mutações de TP63 estão relacionadas com displasias ectodérmicas (síndrome EEC, síndrome ADULT, síndrome de Rap-Hodgkin, fenda palatina, etc.)^[322].

Além da mutação TP63 M499I^[31], foram descritas na literatura cinco outras mutações somáticas em células de melanoma^[67,139,140], todas identificadas em estudos de sequenciação genómica.

No presente trabalho, a mutação TP63 M499I foi observada numa metástase satélite de um melanoma nodular da face (espessura de 6 mm, T4a), cujo tumor primário era homocigótico para a variante selvagem. Este resultado pode ter diversas explicações

hipotéticas: (i) o tecido tumoral estava sub-representado na amostra do tumor primário, conduzindo a um resultado falso negativo, (ii) o resultado da genotipagem na metástase é um falso positivo e (iii) a mutação está relacionada com o processo de invasão tumoral e com a metastização, tendo surgido *de novo* durante a evolução da doença. Neste último caso, a mutação poderia ter impacto no prognóstico, requerendo-se mais estudos para testar essa possibilidade.

2.2.6. Outras mutações

Não se observou nenhuma das restantes 24 mutações pesquisadas. Tratam-se genericamente de mutações descritas em estudos de sequenciação genómica de linhas celulares de melanoma^[31,67,139,140], cuja frequência alélica na população de doentes com melanoma é desconhecida. Apesar da possibilidade incrementada de resultados falsos negativos, os achados do presente trabalho permitem presumir que estas mutações são pouco prevalentes. A sua influência na oncogénese e na progressão tumoral (passagem da fase de crescimento radial para a fase de crescimento vertical e metastização) continua, portanto, por elucidar.

2.3. Estudo clínico retrospectivo

2.3.1. Caracterização das variáveis clínico-patológicas

Os resultados observados relativamente à distribuição das diversas variáveis clínico-patológicas e às correlações entre elas são discutidos em paralelo com alguns relatos da literatura, em particular com uma série que, além de incluir um número amplo de doentes (n=1.571), é representativa de uma população mediterrânica (Nagore *et al.*)^[323].

Embora diversos estudos epidemiológicos americanos, australianos e sul-africanos refiram uma frequência maior de melanoma no sexo masculino^[324], o presente trabalho revela uma tendência oposta (rácio masculino:feminino de 0,6), o que é consistente com outros estudos europeus^[323,324]. Desconhecem-se, todavia, os factores que determinam estas diferenças regionais. Na presente série, a grande frequência de melanomas acrais, apontados por

diversos estudos epidemiológicos como mais comuns no sexo feminino^[325,326], foi certamente um dos factores que contribuiu para esta diferença. Em concordância, refira-se que 72,7% dos melanomas acrais observados ocorreu em mulheres.

A idade média no momento do diagnóstico foi ligeiramente superior à da série de Nagore *et al.* (61,2 *versus* 56 anos), à custa de um predomínio de casos no estrato etário dos 61 aos 80 anos (47,6% dos casos). Mais uma vez, salienta-se o impacto dos melanomas acrais (21,1% dos casos) e dos melanomas da cabeça e pescoço (15,4% dos casos), associados classicamente a doentes de idade mais avançada^[323]. Os resultados deste estudo evidenciam uma idade média de 68,4 anos (mediana de 71 anos) nos doentes com melanomas da cabeça e pescoço contra 54,9 anos (mediana de 57 anos) nos melanomas do tronco.

A idade média e a distribuição por grupo etário não tiveram diferença estatística entre os dois sexos.

Os melanomas dos membros inferiores (44,2%) foram bastante mais frequentes que os do tronco (28,4%), o que não é concordante com o esperado, já que o tronco é a localização mais comum da generalidade das grandes séries. Este resultado pode ter sido novamente influenciado pelo grande número de melanomas acrais.

A localização mais comum nas mulheres foi o membro inferior (54,6%), enquanto nos homens foi o tronco (48,7%), à semelhança dos dados da literatura^[305,323]. O melanoma de crescimento superficial predominou no tronco e, à excepção dos melanomas acrais, foi igualmente o tipo predominante nos membros inferiores. Este tipo de melanoma, que é a variante anátomo-clínica mais frequente, tem sido epidemiologicamente relacionado com a exposição solar intermitente e com a presença de mutações em BRAF no cromossoma 7^[22]. O lântigo maligno e o melanoma desmoplásico encontram uma relação firme com a radiação UV^[327], em virtude de serem tipos de melanoma mais comuns em indivíduos com evidência de exposição crónica a esta radiação. Porém, os efeitos deletérios da radiação UV não se esgotam na sua acção cumulativa. Provavelmente, os melanomas de crescimento superficial encontram na exposição solar esporádica o factor de risco preponderante. A este factor ambiental acresce a susceptibilidade individual, geneticamente determinada, conforme descrita por Whiteman *et al.* na proposta de um modelo de progressão de lesões melanocíticas^[151]. Estes argumentos explicam, à luz dos conhecimentos actuais, as possíveis razões da distribuição anatómica do melanoma e a sua discrepância entre os sexos.

Um estudo retrospectivo norte-americano, que comparou uma série da década de 1970 com outra de 2004^[328], evidenciou que o risco das mulheres desenvolverem um melanoma do tronco aumentou simultaneamente com a diminuição do risco de melanoma da perna. Assim,

as diferenças de distribuição anatómica entre sexos não são estanques e estão sujeitas a variações ao longo do tempo, sendo este facto sugestivo de uma influência de factores ambientais (como a radiação UV) que actuam de forma distinta consoante os estilos de vida e hábitos de vestuário em voga.

A distribuição dos tipos de melanoma foi relativamente singular na nossa série. Embora se tenha mantido um predomínio de melanomas de crescimento superficial, estes representaram cerca de um terço dos casos (31,7%), contrastando com uma proporção esperada na ordem dos dois terços. Este resultado deveu-se a uma frequência elevada de melanomas nodulares (29,3%) e, particularmente, de um número invulgarmente alto de melanomas acrais, traduzido por uma percentagem de 21,1%. Note-se que a série de Nagore *et al.* registou apenas 5,3% destes melanomas^[323]. Trata-se do tipo anátomo-clínico mais frequente nos grupos étnicos em que os restantes tipos são extremamente raros (negros, hispânicos e orientais)^[329]. A série, no entanto, incluiu apenas doentes de etnia caucasiana. Não encontramos explicação para a frequência inesperadamente alta deste tipo de melanoma, a maioria deles afectando mulheres (72,7%) e preferindo largamente a localização no membro inferior (88,6%) em detrimento do membro superior, estando estes últimos resultados de acordo com grandes séries publicadas^[325,326].

A espessura média dos melanomas da amostra foi bastante elevada (3,9 mm), considerando a série de Nagore *et al.* (1,3 mm) e, muito particularmente, uma série americana que comparou a espessura média dos melanomas identificados por dermatologistas com a dos melanomas detectados pelos doentes, registando-se uma média de 0,73 mm e 0,79 mm, respectivamente^[330]. Nas regiões geográficas em que a espessura do tumor primário é geralmente baixa no momento de detecção, os melanomas nodulares são a principal preocupação, já que este subtipo, em virtude da tendência para o crescimento vertical desde o início da evolução, tende a ser diagnosticado em fase mais tardia^[331]. Porém, apesar da espessura média dos melanomas nodulares ter sido significativamente mais elevada no presente estudo (6,1 mm), todos os restantes tipos anátomo-clínicos evidenciaram espessuras médias uniformemente iguais ou superiores a 1,9 mm. Apesar da referenciação a partir de outros centros tender a seleccionar lesões mais espessas e constituir, por isso, um factor de enviesamento, estes resultados são extremamente preocupantes, revelando uma tendência para a detecção tardia do melanoma na população servida pelo CHUC, com as devidas consequências na mortalidade por esta neoplasia. Podem advogar-se diversas razões que contribuem em conjunto para esta situação, como um baixo nível educacional da população acerca do melanoma, uma baixa suspeição clínica dos técnicos de saúde não diferenciados,

particularmente em relação a lesões amelanóticas ou acrais, e dificuldades no acesso atempado a consultas de Dermatologia, em especial nas regiões mais afastadas dos centros urbanos. Estes factos realçam a importância de um investimento na prevenção secundária, sem descurar campanhas informativas e de prevenção primária dirigidas à população em geral.

A espessura foi mais elevada nos doentes do sexo masculino (5,7 mm *versus* 4,7 mm no sexo feminino, com significância estatística), um resultado sobreponível ao de outras séries^[323,332]. É de salientar que os melanomas nodulares, associados a uma espessura média significativamente maior (6,1 mm), corresponderam a 39,7% dos melanomas ocorridos no sexo masculino e somente a 23,1% dos melanomas observados no sexo feminino, influenciando a diferença de espessura entre os dois sexos.

A idade avançada também tem sido referida na literatura como um factor preditivo de uma espessura mais elevada^[332]. Pôde observar-se na amostra estudada uma elevação progressiva e com significado estatístico da espessura à medida que a idade aumenta. Os melanomas acrais e nodulares, que representaram no seu conjunto 70% dos casos ocorridos em doentes com mais de 80 anos e 50% dos casos diagnosticados em doentes de idade entre 61 e 80 anos, contribuíram para este resultado, tendo em conta que foram os tipos anátomo-clínicos associados a maior espessura média (respectivamente 4,1 e 6,1 mm). Quer os melanomas nodulares^[323,331,332], quer os melanomas acrais^[323,333] têm sido associados a espessuras mais elevadas e a um pior prognóstico, apesar de não se ter encontrado diferença estatisticamente significativa entre as diversas regiões anatómicas consideradas.

A frequência de tumores primários ulcerados (33,7%) foi mais elevada do que na série de Nagore *et al.* (20,6%), acompanhando a espessura mais elevada dos melanomas em estudo. É apreciável uma forte correlação da ulceração com a espessura, pois enquanto nos tumores ulcerados se observou uma espessura média de 7 mm, esta foi de apenas 2,9 mm nos tumores não ulcerados ($p < 0,001$). Em concordância, a elevação da categoria T da classificação TNM correspondeu a um aumento significativo da taxa de melanomas ulcerados ($p < 0,001$), dados que são sobreponíveis aos descritos na literatura^[295]. Estes resultados podem ser explicados com base na biologia tumoral, considerando que uma massa tumoral de maior volume tem necessidades nutritivas mais exigentes que requerem o transporte de oxigénio e nutrientes essenciais através de neovasos, cuja proliferação é estimulada pelo tumor (angiogénese tumoral)^[260]. Por isso, a ulceração resultante da necrose de células tumorais é mais comum nos melanomas de maior volume e, conseqüentemente, a sua frequência aumenta em função da espessura. Considerando que a espessura foi maior nos

doentes de idade mais avançada, também se verificou uma frequência crescente de tumores ulcerados desde o grupo etário mais jovem até ao grupo de doentes com mais de 80 anos ($p < 0,001$). No entanto, apesar da espessura média ter sido mais elevada no sexo masculino, a taxa de tumores ulcerados (26,9%) não foi significativamente diferente da observada no sexo feminino (24,6%). Os melanomas nodulares e os melanomas acrais foram os tipos em que a ulceração se observou com maior frequência, facto que acompanha igualmente a maior espessura observada nestas lesões^[326,331].

Na análise univariada, os factores preditivos de metastização em trânsito foram a idade (doentes com metástases em trânsito tiveram idade significativamente mais avançada), a espessura do melanoma, a presença de ulceração (risco de 2,5 vezes) e o tipo anátomo-clínico (maior tendência revelada pelos melanomas nodulares e, em segundo lugar, pelos melanomas acrais). Após a remoção da influência das outras variáveis em causa através da regressão logística, apenas a espessura manteve significado estatístico. Note-se que um estudo que avaliou prospectivamente o risco de metastização em trânsito em 1.327 doentes constatou que os factores independentes que influenciaram o aparecimento daquele tipo de metástases foram a espessura do tumor primário e a localização (membros inferiores, cabeça e pescoço e localizações acrais)^[334]. Em contraste, a presente série não revelou diferenças significativas na frequência de metastização em trânsito nas várias localizações anatómicas estudadas.

Os factores que influenciaram a ocorrência de metástases ganglionares regionais no estudo univariado foram o sexo masculino, a espessura elevada, a ulceração e o tipo de melanoma (nodular e acral). A espessura voltou a ser o único factor com significado estatístico após a realização da análise multivariada. Este sólido carácter preditivo da espessura sobre a invasão ganglionar vem reforçar que a mesma seja o principal critério utilizado na selecção de candidatos à biopsia selectiva do gânglio sentinela. No entanto, um estudo que incluiu 3.463 doentes demonstrou que, além da espessura, houve outras variáveis que puderam ser consideradas como factores independentes na predição da presença de metástases ganglionares microscópicas: a idade jovem, a ulceração, a localização no tronco e a invasão linfovascular^[335]. O índice mitótico foi o factor mais recentemente considerado como factor de prognóstico e critério para a realização de biopsia do gânglio sentinela em melanomas com espessura inferior a 1,0 mm, em virtude da demonstração do seu papel preditivo de invasão ganglionar regional^[336]. Contudo, não foi objecto de estudo nesta série.

De modo semelhante, o sexo masculino, a espessura, a ulceração e o tipo de melanoma (particularmente a variante nodular) foram os factores relacionados com a ocorrência de metastização distante e com a morte relacionada com o melanoma, embora a análise

multivariada demonstrasse que apenas a espessura e a ulceração do tumor primário se tenham revelado capazes de predizer a metastização distante e somente a espessura tenha restado como factor de risco de morte por melanoma. Os resultados obtidos conferem à espessura do tumor primário um valor prognóstico preponderante, preditivo da evolução metastática loco-regional, da metastização distante e da sobrevivência, estando de acordo com a generalidade das revisões retrospectivas e prospectivas. A espessura pode considerar-se o mais potente factor de prognóstico na doença localizada^[295,337].

Os factores que influenciaram pejorativamente as curvas de sobrevivência foram o sexo masculino, a espessura (avaliada através dos níveis da categoria T da classificação TNM da AJCC), a ulceração e o tipo anátomo-clínico (pior sobrevivência dos doentes com melanoma nodular). Após a análise multivariada realizada através da regressão de Cox, apenas a espessura se manteve como factor independente com impacto na sobrevivência global.

Apesar de nesta série a ulceração apenas encontrar significado estatístico como factor preditivo de metastização distante, os dados de grandes séries da literatura apontam-na como um factor de prognóstico com grande relevância^[295,337]. Por isso, não seria expectável que esta variável carecesse de significado estatístico como indicador de sobrevivência na análise multivariada. Não se evidenciam as razões desta discrepância, advogando-se que a tendência demonstrada pela ulceração na análise univariada pudesse revelar uma importância prognóstica independente se a amostra fosse ampliada.

A metastização loco-regional, resultante de disseminação linfática do tumor, afectou mais de 1/3 dos doentes (metastização em trânsito em 35,7% dos casos e metastização ganglionar em 39,8%). A metastização distante veio a ocorrer em 9,1% dos casos. A presença de metástases em trânsito ou de metástases ganglionares regionais teve influência prognóstica objectiva, levando a uma diminuição significativa da sobrevivência média de, respectivamente, 153,8 para 85,9 meses e de 139,1 para 42,1 meses. Este efeito pejorativo na sobrevivência relacionou-se certamente com a propensão para a ocorrência de metástases distantes nos doentes com afecção loco-regional, facto que revela uma tendência da metastização linfática se associar à metastização hemática, quer esta ocorra de um modo sequencial ou simultâneo. Como seria previsível, a influência das metástases distantes na sobrevivência foi marcada. O risco de morte nos doentes com metástases distantes reflectiu-se de modo muito significativo nas curvas de sobrevivência, demonstrando que a disseminação da doença é a principal causa de morte relacionada com o melanoma.

2.3.2. Biopsia selectiva do gânglio sentinela

De acordo com os resultados do ensaio randomizado multicêntrico MSLT-I, a probabilidade de um doente com critérios para a realização de biopsia do gânglio sentinela ter micrometástases ganglionares é de cerca de 20%^[165]. Os resultados do presente estudo demonstraram 21,6% de gânglios sentinela metastáticos nos 134 doentes submetidos a biopsia selectiva do gânglio sentinela. Nestes doentes, o sexo masculino e o aumento da espessura correlacionaram-se com o risco de ter um gânglio sentinela positivo, mantendo forte relação com esta ocorrência mesmo após a regressão logística. Não se conhece a razão do risco acrescido no sexo masculino. Contudo, há estudos que corroboram uma pior sobrevivência aos 5 e 10 anos nos homens, mantendo-se esta tendência quando existe invasão ganglionar regional^[337].

A ulceração voltou a carecer de valor preditivo sobre o estado do gânglio sentinela. Apesar deste dado ser inesperado, considerando os estudos publicados^[335], a presença de ulceração esteve muito perto de atingir significado estatístico ($p=0,06$), o que permite colocar a hipótese da significância estatística poder vir a ser obtida em amostra de maior grandeza.

A idade jovem e a localização do melanoma no tronco também foram previamente descritos como factores preditivos de positividade do gânglio sentinela^[335]. No entanto, a média etária e a distribuição dos melanomas por região anatómica não se revelaram estatisticamente distintos entre os doentes que tiveram gânglio sentinela positivo e aqueles cujo gânglio estava livre de metástases.

A positividade da biopsia do gânglio sentinela conferiu um risco significativo de metastização em trânsito, metastização distante e de morte relacionada com o melanoma, corroborando o valor prognóstico que tem sido amplamente reconhecido a este procedimento^[165,336].

De acordo com o esperado, a taxa de metastização do gânglio sentinela foi crescendo com a progressão da categoria T da classificação da AJCC, começando numa taxa de 0% nos tumores com espessura inferior a 1,0 mm e subindo progressivamente até aos 51,5% observados nos tumores espessos (>4,0 mm). Nestes doentes com melanoma de alto risco a biopsia do gânglio sentinela não conseguiu prever a ocorrência de metástases em trânsito nem de metástases distantes, cuja frequência foi sensivelmente idêntica nos casos em que o gânglio sentinela foi positivo e naqueles em que foi negativo. Este resultado permite evocar a suposição de que o estado do gânglio sentinela perde valor neste contexto, considerando que o prognóstico passa a ser determinado mais pela alta taxa de disseminação à distância do que

pelo estado do gânglio sentinela. No entanto, verificou-se uma clara diferença nas curvas de sobrevivência livre de doença nos doentes com invasão do gânglio sentinela, registando-se uma sobrevivência global média de 4,4 meses, francamente inferior aos 31,4 meses dos doentes com gânglio sentinela negativo. Já as curvas de sobrevivência global em função do estado do gânglio sentinela não foram estatisticamente distintas neste subgrupo de doentes com tumores espessos. Porém, neste caso concreto, as curvas de sobrevivência adquirem a clássica forma de banana, típica dos eventos que determinam uma vantagem de sobrevivência inicial, mas que culminam num desfecho semelhante, previsivelmente condicionado pela taxa elevada de metastização à distância. Analisando, por isso, a proporção de doentes vivos aos 2,5 anos, encontra-se uma diferença estatística entre os doentes com gânglio positivo (44,1%) e com gânglio sentinela negativo (83,1%), conferindo aos primeiros um risco de morte com magnitude de 7,9 vezes. Este notório valor preditivo que o estado do gânglio sentinela apresenta sobre a sobrevivência a curto prazo esgota-se, no entanto, a partir dos 5 anos, quando a diferença estatística deixa de ser observada e as curvas de sobrevivência passam a caminhar de forma paralela. Estes resultados são apoiados por alguns estudos retrospectivos que também não conseguiram demonstrar um benefício da biopsia do gânglio sentinela na predição da sobrevivência global ou no estabelecimento do risco de morte. Colidem, no entanto, com a maioria dos estudos retrospectivos e com uma importante meta-análise^[166-170], que apontam para a manutenção do impacto do estado do gânglio sentinela na sobrevivência livre de doença e na sobrevivência global destes doentes de alto risco.

Apesar dos resultados obtidos na nossa série, o tamanho da amostra, que incluiu apenas 33 doentes com melanoma de espessura superior a 4,0 mm, aliado ao carácter retrospectivo da análise e à revisão da literatura, não invocam uma mudança de atitude com bases sólidas. Assim, parece prudente a continuidade da realização da biopsia selectiva do gânglio sentinela, recomendação que está patente em relevantes normas de orientação clínica (NCCN)^[163], na ausência de estudos prospectivos, controlados e randomizados neste conjunto de doentes.

2.3.3. Progressão da doença loco-regional

Das variáveis avaliadas no intuito de verificar um possível impacto no risco de metastização distante nos doentes com metástases loco-regionais (metástases em trânsito e/ou metástases ganglionares regionais), nenhuma revelou qualquer valor preditivo, nem mesmo a espessura do tumor primário, que tivera um claro interesse prognóstico nas fases

mais precoces da doença. Não se encontraram estudos publicados que tivessem avaliado de uma forma comparável o risco de metastização distante na doença loco-regional. No entanto, existe uma grande série de Balch *et al.* (n=2313), que estudou retrospectivamente doentes com metástases ganglionares quanto a factores de prognóstico com potencial impacto na sobrevivência global^[338]. Este estudo definiu uma influência pejorativa *ab initio* das macrometástases ganglionares quando comparadas com as micrometástases, facto que sugere um potencial benefício da biopsia do gânglio sentinela na sobrevivência do subgrupo de doentes com micrometástases ganglionares, permitindo uma actuação terapêutica (linfadenectomia radical) numa fase em que o risco de metastização distante é provavelmente menor. De acordo com o ensaio MSLT-I, os doentes de risco intermédio (definidos, neste contexto, como doentes com melanoma de espessura compreendida entre 1,2 e 3,5 mm) tiveram metástases ganglionares em 16% dos casos. Este valor, somado a uma taxa de falsos negativos de 3,4%, igualou sensivelmente a percentagem de doentes não submetidos à biopsia do gânglio sentinela que desenvolveram macrometástases ganglionares, sugerindo que a doença ganglionar microscópica tende a evoluir para macrometástases^[339]. No entanto, a biopsia do gânglio sentinela não trouxe qualquer benefício da sobrevivência global ao grupo ao qual foi instituída, limitando-se a determinar um modesto incremento na sobrevivência livre de doença aos 5 anos (78,3% *versus* 73,1%). Porém, a sobrevivência global aos 5 anos do subgrupo de doentes com micrometástases ganglionares submetidos a linfadenectomia imediata foi significativamente mais elevada que a dos doentes do grupo de observação, submetidos a linfadenectomia apenas quando a doença ganglionar se tornou clinicamente evidente (72,3% *versus* 52,4%). A controvérsia sobre este assunto tem persistido, na medida em que também existem estudos que demonstram uma falência da linfadenectomia na melhoria do prognóstico dos doentes com micrometástases ganglionares, como é o caso de uma revisão retrospectiva de 1.113 doentes realizada na Europa por van der Ploeg *et al.*^[340]. As razões para estas discrepâncias prendem-se provavelmente com um facto decorrente dos resultados do trabalho de Balch *et al.*^[338]: o grupo de doentes com doença ganglionar microscópica não é homogéneo quanto ao prognóstico, ou seja, a propensão para progredir para metastização distante e consequentemente morrer devido ao melanoma é ainda determinada por outros factores adicionais, como a espessura do tumor primário, a idade (pior sobrevivência a partir dos 50 anos de idade), a presença de ulceração, a localização do melanoma (pior sobrevivência nos melanomas de localização axial) e o índice mitótico. Da mesma forma, nos doentes com macrometástases ganglionares, o

número de gânglios afectados, a ulceração e a idade (pior sobrevivência a partir dos 70 anos) tiveram impacto na sobrevivência.

Apesar das variáveis estudadas na nossa série não terem conseguido prever a ocorrência de metastização à distância em doentes com doença loco-regional, a elevada taxa de metastização à distância observada neste subgrupo (61,4%) corrobora o risco elevado de disseminação por via hemática (sequencial ou simultânea em relação à progressão loco-regional).

A sobrevivência livre de doença, tendo sido igual nos doentes com doença loco-regional quer tenham progredido ou não para doença distante, também não se revelou capaz de prever o risco de progressão para metastização distante, o que quer dizer que a metastização à distância ocorre independentemente da precocidade do aparecimento das metástases em trânsito ou da invasão ganglionar regional. Estes resultados foram idênticos aos relatados por Tejera-Vaquerizo *et al.*^[160] num estudo retrospectivo realizado na Andaluzia, Espanha.

Salienta-se que o risco de morte por melanoma ajustado à idade conferido pelo aparecimento de metástases à distância nos doentes com doença loco-regional foi estimado em 82,6 vezes. As curvas de sobrevivência dos doentes com doença loco-regional foram claramente diferentes entre os doentes que desenvolveram metástases à distância e os doentes que nunca tiveram este tipo de metástases, o que está de acordo com o facto da grande maioria das mortes por melanoma ocorrerem nos doentes classificados no estágio IV da AJCC.

A existência de um grupo de cerca de 1/3 de doentes com doença loco-regional que não progredem para disseminação distante e a inexistência de factores capazes de prever o risco de progressão, a recomendação de oferecer a linfadenectomia radical aos doentes com metastização ganglionar deve ser mantida, muito embora esta técnica cirúrgica não tenha influenciado a sobrevivência global dos doentes com metastização ganglionar regional.

2.3.4. Vias metastáticas

Perto de 1/3 dos doentes (n=66; 31,7%) desenvolveram metastização à distância. Considerando este grupo, as metástases ganglionares (via metastática B) foram o primeiro local de disseminação da doença em cerca de metade dos casos (53%), seguidas pelas metástases em trânsito (via metastática A) em 30,3% e pelas metástases distantes directas (via metastática C) em 16,7%. Estes resultados são praticamente sobreponíveis aos observados

por Tejera-Vaquerizo *et al.* numa amostra de dimensão idêntica (n=67)^[160] e ligeiramente discrepantes com uma série de Meier *et al.*^[341] (n=466), que revelou uma proporção ligeiramente superior de metástases distantes directas (28,1%) em detrimento do início da disseminação da doença pela metastização em trânsito (21,7%).

Dentro das variáveis consideradas (sexo, idade, espessura, ulceração, tipo de melanoma, e localização do melanoma), nenhuma demonstrou ter relação estatisticamente significativa com qualquer das vias metastáticas. Também não houve diferença estatística entre as distintas vias metastáticas quanto à sobrevivência livre de doença, à sobrevivência livre de metástases distantes e à sobrevivência global. A sobrevivência livre de metástases distantes também não se mostrou influenciável pelas variáveis clínico-patológicas em estudo, nem mesmo pela espessura ou pela ulceração. Estes resultados apoiam inteiramente os trabalhos de Tejera-Vaquerizo *et al.*^[160] e Meier *et al.*^[341], que também não conseguiram determinar marcadores preditivos da via de disseminação metastática do melanoma e que concluem que o tempo de aparecimento de metástases distantes é o mesmo independentemente da via metastática em causa. Estes factos sugerem que a disseminação hemática tende a acompanhar a disseminação linfática, o que é uma explicação coerente da ausência de impacto da biopsia do gânglio sentinela e da linfadenectomia radical na sobrevivência global dos doentes com melanoma.

Capítulo VI

Conclusões

6.1. Conclusões gerais

6.1.1. Análise mutacional

Relativamente à genotipagem realizada, salientam-se as seguintes conclusões:

- (i) A genotipagem com sondas TaqMan™ em amostras de tecido fixadas em formol e incluídas em parafina é um método que permite obter resultados de boa qualidade, mesmo limitando a concentração do DNA a 15 ng/μL (inferior à concentração recomendada de 50 ng/μL) e colocando o limiar dos rácios de absorvância ($A_{260/230}$ e $A_{260/280}$) em 1,6 (abaixo do valor recomendado de 1,7).
- (ii) A extracção de DNA em concentração e qualidade adequadas à genotipagem foi mais eficaz nas amostras de melanoma do que nas de nevos melanocíticos, possivelmente devido à influência pejorativa do menor volume de tecido destas últimas.
- (iii) Apesar da boa qualidade da genotipagem, a falta de sensibilidade e robustez parece ser um problema inerente à aplicação da pesquisa de mutações por sondas TaqMan™ em peças incluídas em parafina, particularmente quando a amostra em estudo apresenta heterogeneidade na composição do tecido (células tumorais e células normais), conforme verificado no presente trabalho.

- (iv) As quatro mutações observadas (BAI3 D755N, DLEC1 D215N, MYO9A G2291V e TP63 M499I) ocorreram com uma frequência extremamente baixa, quer nos melanomas quer nos nevos melanocíticos.
- (v) Independentemente da sua frequência, o papel patogénico das quatro mutações é extremamente provável, considerando as ferramentas bioinformáticas utilizadas.
- (vi) A mutação DLEC1 D215N foi a única que coexistiu em melanomas e nevos melanocíticos, o que sucedeu com uma frequência indistinguível do ponto de vista estatístico. Este facto levanta a hipótese da sua intervenção na nevogénese, além do contributo aparente na patogénese do melanoma.
- (vii) A mutação TP63 M499I, verificada numa metástase em trânsito de um doente com tumor primário não mutado, pode, por esta razão, ser um factor interventivo na progressão da doença, conforme previamente postulado^[137]. A confirmação de tal facto, dependente de estudos posteriores, poderá antever a determinação de um novo biomarcador de prognóstico.
- (viii) Novos trabalhos, com ponto de partida nestes resultados, poderão esclarecer a suposição de que os genes BAI3, DLEC1 e MYO9A actuam como genes onco-suppressores no melanoma cutâneo primário.
- (ix) Do mesmo modo, será importante o esclarecimento do papel do gene TP63 que, ao contrário do análogo TP53, pode intervir como oncogene ou como gene onco-supressor.

6.1.2. Estudo clínico retrospectivo

Acerca da caracterização clínico-patológica retrospectiva dos doentes da série, enumeram-se as seguintes conclusões:

- (i) O melanoma cutâneo primário teve um predomínio de casos no sexo feminino, à semelhança de outros estudos europeus.
- (ii) Os melanomas acrais ocorreram numa proporção inesperadamente elevada de doentes, facto para o qual não se encontrou uma explicação plausível.
- (iii) Os melanomas acrais foram mais comuns em mulheres, apareceram mais frequentemente em indivíduos de idade avançada e ocorreram com uma

frequência significativamente mais elevada no membro inferior do que no membro superior.

- (iv) A espessura média dos melanomas acrais no momento do diagnóstico foi mais elevada que a dos restantes tipos anátomo-clínicos, à excepção do melanoma nodular.
- (v) Os melanomas nodulares ocorreram com uma frequência mais elevada do que a esperada (29,3%), muito provavelmente devido ao enviesamento decorrente da referenciação de casos mais graves a partir de outros centros hospitalares.
- (vi) Embora sujeita ao mesmo tipo de viés, a espessura média dos melanomas foi bastante elevada na série, sublinhando a necessidade de implementar medidas de prevenção primária e secundária ao nível da população e dos cuidados de saúde primários.
- (vii) A ulceração aumentou de modo proporcional à elevação da espessura do tumor primário, pelo que a ulceração foi mais comum em tipos de melanoma com tendência a terem maior espessura no momento do diagnóstico (melanoma nodular e melanoma acral).
- (viii) O tipo anátomo-clínico de melanoma careceu de valor prognóstico, corrigida a influência da espessura.
- (ix) O melanoma nodular ocorreu de modo relativamente transversal nas diferentes regiões do tegumento e nos vários estratos etários.
- (x) A localização do melanoma variou em função do sexo (o tronco foi a localização predominante nos homens e o membro inferior nas mulheres).
- (xi) A localização do melanoma não teve impacto no prognóstico.
- (xii) A espessura do tumor primário foi o factor de prognóstico independente com maior expressão, conseguindo-se evidenciar o seu efeito preditivo sobre a metastização em trânsito, a metastização ganglionar, a metastização distante, a sobrevivência livre de doença e a sobrevivência global.
- (xiii) Inesperadamente, a ulceração apenas obteve valor preditivo sobre a metastização ganglionar.
- (xiv) O aparecimento de metástases loco-regionais ou à distância relacionou-se com uma menor sobrevivência global.

- (xv) Na amostra em estudo, apenas a espessura elevada e o sexo masculino foram preditivos da positividade do gânglio sentinela, ficando a ulceração muito perto da significância estatística.
- (xvi) O estado do gânglio sentinela foi preditivo de metastização em trânsito, de metastização distante e de morte relacionada com melanoma, excepto nos doentes com melanomas espessos (>4,0 mm).
- (xvii) O estado do gânglio sentinela foi preditivo da sobrevivência livre de doença, mesmo nos doentes com tumores espessos (>4,0 mm).
- (xviii) O estado do gânglio sentinela foi preditivo da sobrevivência global, excepto nos doentes com melanomas espessos (>4,0 mm).
- (xix) Em termos de sobrevivência global, os doentes com melanomas espessos (>4,0 mm) que tiveram gânglio sentinela positivo apenas diferiram dos que tiveram gânglio sentinela negativo no que se refere à sobrevivência a curto prazo (até aos 2,5 anos). A longo prazo (5 anos), em virtude da elevada frequência de metástases à distância ocultas, mais dependentes da espessura elevada do tumor primário do que do estado do gânglio sentinela, a sobrevivência não foi influenciada pela presença de metástases ganglionares microscópicas.
- (xx) Nos doentes com doença metastática loco-regional, a metastização à distância ocorreu independentemente de quaisquer factores conhecidos, incluindo o tempo livre de doença, o que demonstra a tendência destes doentes apresentarem em simultâneo disseminação por via hemática.
- (xxi) Não se identificaram factores preditivos da via de disseminação metastática do melanoma.
- (xxii) O tempo até ao aparecimento de metástases distantes foi sobreponível nos doentes que progrediram directamente para doença metastática à distância e naqueles em que a disseminação para órgãos distantes foi precedida por metastização loco-regional.
- (xxiii) Pela aparente falta de valor preditivo da sobrevivência aos 5 anos, a utilidade da biopsia do gânglio sentinela nos doentes com melanomas espessos (>4,0 mm) permanece controversa.
- (xxiv) Apesar da elevada tendência para os doentes com invasão linfática apresentarem disseminação hemática, tornando a biopsia do gânglio sentinela e a linfadenectomia electiva incapazes de influenciar a sobrevivência global, o

potente valor preditivo do estado do gânglio sentinela sobre a sobrevivência livre de doença e a sobrevivência global, bem como a possibilidade da linfadenectomia evitar a progressão metastática em cerca de 1/3 dos casos, leva a que estes procedimentos continuem a ser actualmente recomendáveis.

6.2. Aplicações e contribuições do trabalho realizado

Os estudos de sequenciação genómica em linhas celulares de melanoma encontrados na literatura referem novas mutações potencialmente importantes na oncogénese. Uma das formas de avaliar a relevância dessas mutações é através da genotipagem de amostras de tecido tumoral de um dado grupo de doentes. Deste modo, é possível estimar a frequência com que ocorrem e a sua eventual implicação prognóstica. A actualidade destes estudos é reforçada pela tendência cada vez maior de encontrar biomarcadores capazes de definir subgrupos de doentes com maior risco ou eventuais candidatos para terapêuticas adjuvantes.

O advento de novas terapêuticas baseadas em alvos moleculares também tem estimulado a investigação dos mecanismos moleculares subjacentes à transformação maligna e à aquisição de fenótipos invasivos pelas células de melanoma, já que a compreensão destes fenómenos pode ser determinante no estabelecimento de novos alvos moleculares. Foi neste contexto que se enquadrou e que se releva a análise mutacional realizada.

A revisão clínico-patológica dos doentes, orientada para a investigação da progressão tumoral, permitiu pesquisar retrospectivamente factores com possível interferência na disseminação da doença. Assim, discutiram-se as principais vantagens e limitações da biopsia do gânglio sentinela na avaliação do risco de progressão do melanoma. Neste âmbito, procurou-se avaliar o benefício desta técnica quando utilizada em doentes com melanomas espessos.

A análise da evolução clínica dos doentes de acordo com as vias através das quais o tumor se dissemina, aponta-se como outro contributo relevante para a compreensão dos padrões de disseminação tumoral: a via linfática parece revelar-se como aquela que mais frequentemente inaugura o processo de metastização, mas é provável que as células que adquirem a capacidade de invasão linfática associem tendencialmente uma capacidade de migração hemática, quer esta ocorra de um modo simultâneo ou sequencial.

6.3. Recomendações para investigações futuras

Perante as limitações apontadas à baixa sensibilidade (possível ocorrência de mutações não detectadas) e à fraca reprodutibilidade (discrepância nos resultados de diferentes genotipagens da mesma amostra) da genotipagem com sondas TaqMan™ em amostras de tecido fixadas em formol e incluídas em parafina, impõe-se a enumeração de sugestões para melhorar a detecção de mutações:

- a) Para otimizar a robustez dos resultados da genotipagem de amostras de tecido tumoral, é recomendável incluir amostras de tecido em que a população de células neoplásicas seja maioritária (mais de 50%). Para este fim, a dissecação cuidadosa dos cortes parafinados, extraíndo o remanescente de tecido normal deve ser sempre otimizada, por difícil e morosa que se afigure em peças de menor dimensão.
- b) Como o objectivo de responder a um dos desafios mais importantes da investigação oncológica, que é a identificação de biomarcadores em amostras heterogéneas de tecido tumoral, foi desenvolvida muito recentemente a tecnologia castPCR™ (Life Technologies® Corporation) que realiza a genotipagem através de sondas TaqMan™ competitivas e específicas de alelo^[342]. A detecção da mutação baseia-se na utilização de um *primer* específico do alelo mutado, enquanto o alelo selvagem é suprimido através da ligação de uma sequência oligonucleotídica bloqueadora acoplada a um ligando MGB (extintor de fluorescência), conforme exemplificado na Fig. 49. Este método permite a detecção de 0,1% de alelos mutantes na presença de um fundo de alelos normais, consistindo na tecnologia mais sensível e robusta para determinar o perfil mutacional de amostras heterogéneas de tecido tumoral.

Com base no exposto, as principais linhas de investigação que este trabalho deixa em aberto para o futuro baseiam-se na aplicação da tecnologia castPCR™ na genotipagem das amostras de melanoma.

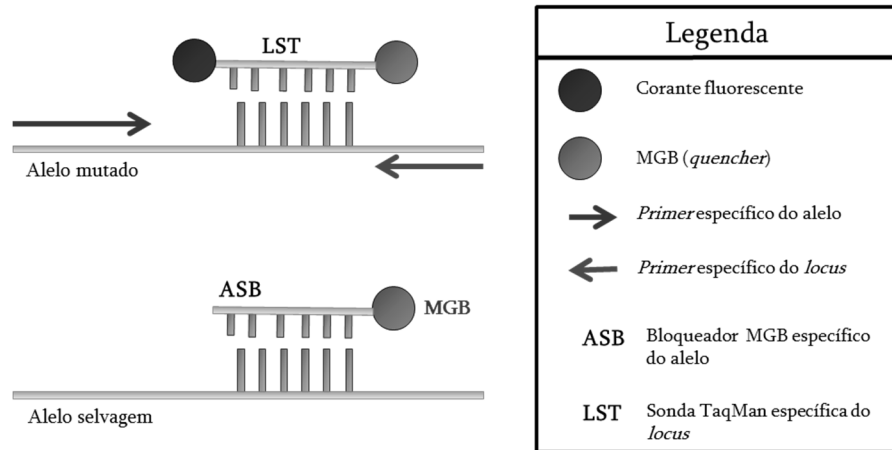


Figura 49. Reacção em cadeia da polimerase (PCR) com sondas competitivas e específicas de alelo (castPCR™).

Esta abordagem permitiria uma avaliação precisa e sensível da frequência dos alelos mutados dos genes em causa e poderia dar resposta a algumas questões levantadas pelo trabalho desenvolvido até à data:

- (i) Que impacto é que a heterogeneidade das amostras teve na determinação da frequência alélica das mutações observadas?
- (ii) Qual a razão da mutação MYO9A G2291V não ter sido observada nas metástases em trânsito do caso A37 quando já tinha sido identificada no tumor primário: trata-se de um falso negativo na metástase, de um falso positivo no tumor primário ou de uma perda de material genético sofrida pelo tumor durante o processo de metastização?
- (iii) Qual a razão para a mutação TP63 M499I apenas ter sido observada na metástase em trânsito do doente A76 quando não havia sido identificada no tumor primário: trata-se de um falso negativo no tumor primário, de um falso positivo na metástase ou de uma mutação adquirida durante a progressão do melanoma? Se assim for, na perspectiva de identificar um biomarcador de prognóstico, qual a sua correlação com o desfecho?

O objectivo de responder a estas questões exige a genotipagem das mesmas amostras com a tecnologia castPCR™, mas, tendo em conta a frequência alélica previsivelmente baixa, conduz também à necessidade de alargar substancialmente a amostra.

Adicionalmente, sugere-se uma avaliação prospectiva da presença de células tumorais mutadas em circulação, recorrendo à mesma tecnologia. Os dados obtidos poderiam permitir correlações prognósticas importantes.

Finalmente, dado ser um assunto ainda sob intenso debate, sugere-se uma investigação dirigida ao estabelecimento de recomendações baseadas em evidência quanto à realização da biopsia do gânglio sentinela em doentes com melanomas espessos (>4,0 mm). A forma que se afigura como mais adequada para atingir este fim é o desenho de um estudo prospectivo randomizado e controlado com a inclusão de uma amostra consistente de doentes com melanomas espessos, criando dois braços: (i) doentes submetidos a alargamento de margens do tumor primário e biopsia selectiva do gânglio sentinela *versus* (ii) alargamento de margens do tumor primário e observação, com linfadenectomia oferecida apenas se surgirem metástases ganglionares clinicamente evidentes. A avaliação da sobrevivência livre de doença e da sobrevivência global aos 5 anos, comparando igualmente os doentes com micrometástases sujeitos a linfadenectomia com os que foram alvo deste tratamento apenas no caso de terem surgido metástases ganglionares clinicamente evidentes, seria uma forma fidedigna de aferir o real valor da biopsia do gânglio sentinela em doentes de alto risco.

Referências

1. Nestle F, Halpern A. Melanoma. In: *Dermatology*. Bologna J, Jorizzo J, Rapini R (Eds). Elsevier, 2008; 1745-1769.
2. Thingnes J, Lavelly T, Hovig E, Omholt S. Understanding the melanocyte distribution in human epidermis: an agent-based computational model approach. *PLoS One* 2012; 7: e40377.
3. Paek S, Sober A, Tsao H, Mihm M, Johnson T. Cutaneous melanoma. In: *Fitzpatrick's Dermatology in Internal Medicine*. Wolff K, Goldsmith L, Katz S, Gilchrest B, Paller A, Lefell D (Eds). McGraw Hill, 2008: 1134-1157.
4. Nichols S, Reams W. The occurrence and morphogenesis of melanocytes in the connective tissues of the PET/MCV mouse strain. *J Embryol Exp Morphol* 1960; 8: 24-32.
5. Gola M, Czajkowski R, Bajek A, Dura A, Drewa T. Melanocyte stem cells: biology and current aspects. *Med Sci Monit* 2012; 18: RA155-159.
6. Hoerter J, Bradley P, Casillas A, Chambers D, Weisswasser B, Clements L, Gilbert S, Jiao A. Does melanoma begin in a melanocyte stem cell? *J Skin Cancer* 2012; 2012: 571087.
7. Franco-Lie I, Iversen T, Robsahm E, Abdelnoor M. Incidence trends of melanoma of the skin compared with other localisations, in the Norwegian population, 1956-2005. *Ann Oncol* 2010; 22: 1443-1450.
8. Leyvraz S, Keilholz U. Ocular melanoma: what's new? *Curr Opin Oncol* 2012; 24: 162-169.
9. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Altekruse SF, et al. (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations)*, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/, based on November 2011 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2012.
10. Avilés J, Lázaro P. Predisposición genética en el melanoma cutáneo. *Actas Dermosifilogr* 2006; 97: 229-240.

11. McDonald E. Malignant melanoma in Connecticut. Special publication of the New York Academy of Sciences 1948; IV: 71-81.
12. Weinstock MA. Epidemiology, etiology, and control of melanoma. *Med Health R I* 2001; 84: 234-236.
13. Erdmann F, Lortet-Tieulent J, Schüz J, Zeeb H, Greinert R, Eckhard W, et al. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008 – Are recent generations at higher or lower risk? *Int J Cancer* 2013; 132: 385-400.
14. Lens M, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2004; 150: 179-185.
15. 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.
16. Naldi L, Altieri A, Imberti GL, Gallus S, Bosetti C, La Vecchia C. Sun exposure, phenotypic characteristics, and cutaneous malignant melanoma. An analysis according to different clinico-pathological variants and anatomic locations (Italy). *Cancer Causes Control* 2005; 16: 893-899.
17. Newton-Bishop J, Chang Y, Elliot F, Chan M, Leake S, Karpavicius B, et al. Relationship between sun exposure and melanoma risk for tumours in different body sites in a large case-control study in a temperate climate. *Eur J Cancer* 2011; 47: 732-741.
18. Major J, Kiruthu C, Weinstein S, Horst R, Snyder K, Virtamo J, et al. Pre-diagnostic circulating vitamin D and melanoma in men. *PLoS ONE* 2012; 7: e35112.
19. Ogbah Z, Visa L, Badenas C, Ríos J, Puig-Butille J, Bonifaci N, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D3 levels and vitamin D receptor variants in melanoma patients from the Mediterranean area of Barcelona: 25-hydroxyvitamin D3 levels and VDR variants in melanoma patients from Barcelona. *BMC Med Genet.* 2013; 14: 26.
20. Rivers JK. Is there more than one road to melanoma? *Lancet* 2004; 363: 728-730.
21. Greenwald H, Friedman E, Osman I. Superficial spreading and nodular melanoma are distinct biological entities: A Challenge to the Linear Progression Model. *Melanoma Res* 2012; 22: 1-8.
22. Maldonado J, Fridlyand J, Patel H, Jain A, Busam K, Kageshita T, et al. Determinants of BRAF mutation in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1878-1890.
23. Davies H, Bignell G, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2012; 417: 949-954.

24. Volkovova K, Bilanicova D, Bartonova A, Letasiova S, Dusinska M. Associations between environmental factors and incidence of cutaneous melanoma. Review. *Environmental Health* 2012; 11: S12.
25. Vieira R, Tellechea O, Figueiredo A. The genetic bases of cutaneous melanoma. *Skin Cancer* 2006; 21: 79-87.
26. Okamoto I, Pirker C, Bilban M, Berger W, Losert D, Marosi C, et al. Seven novel and stable translocations associated with oncogenic gene expression in malignant melanoma. *Neoplasia* 2005; 7: 303-311.
27. Unamuno P, Sarmiento R, Mallo S. Métodos moleculares de detección de mutaciones en dermatología. *Piel* 2004; 19: 107-114.
28. Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor supressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 2000; 60: 6788-6793.
29. Wangari-Talbot J, Chen S. Genetics of Melanoma. *Front Genet* 2012; 3: 330.
30. Kan ZZ, Jaiswal B, Stinson J, Janakiraman V, Bhatt D, Stern H, et al. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* 2010; 466: 869-875.
31. Pleasance ED, Cheetham RK, Stephens PJ, McBride DJ, Humphray SJ, Greenman CD, et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* 2010; 463: 191-196.
32. Ikehata H, Ono T. The mechanisms of UV mutagenesis. *J Radiat Res* 2011; 52: 115-125.
33. Tyson J, Csikasz-Nagy A, Novak B. The dynamics of cell cycle regulation. *Bioessays* 2002; 24: 1095-1109.
34. Haluska FG, Tsao H, Wu H, Haluska FS, Lazar A, Goel V. Genetic alterations in signalling pathways in melanoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2301s-2307s.
35. Ruggiero R, Kale A, Thomas B, Baker N. Mitosis in neurons: roughex and APC/C maintain cell cycle exit to prevent cytokinetic and axonal defects in *Drosophila* photoreceptor neurons. *PloS Genet* 2012; 8: e1003049.
36. Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cell Cycle and Cancer. The G1 restriction point and the G1/S transition. *Current Genomics* 2002; 3: 245-263.
37. Puntervoll HE, Yang XR, Vetti HH, Bachmann IM, Avril MF, Benfodda M, et al. Melanoma prone families with CDK4 germline mutation: phenotypic profile and associations with MC1R variants. *J Med Genet* 2013; 50: 264-270.

38. Sauter E, Un-Cheol Y, von Stemm A, Zhu W, Litwin S, Tichansky DN, et al. Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer Res* 2002; 62: 3200-3206.
39. Bloethner S, Chen B, Hemminki K, Müller-Berghaus J, Ugurel S, Schadendorf D, et al. Effect of common B-RAF and N-RAS mutations on global gene expression in melanoma cell lines. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1224-2332.
40. Lesueur F, de Lichy M, Barrois M, Durand G, Bombléd J, Avril M-F. The contribution of large genomic deletions at the CDKN2A locus to the burden of familial melanoma. *Br J Cancer* 2008; 99: 364-370.
41. Harper JW, Elledge SJ. Cdk inhibitors in development and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6: 56-64.
42. Tsao H, Benoit E, Sober AJ, Thiele C, Haluska F. Novel mutations in the p16^{INK4a} binding region of the cyclin-dependent kinase-4 gene. *Cancer Res* 1998; 58: 109-113.
43. van Leeuwen I, Higgins M, Campbell J, McCarthy AR, Sachwehh MC, Navarro A, et al. Modulation of p53 C-terminal acetylation by mdm2, p14ARF and cytoplasmic SirT2. *Mol Cancer Ther* 2013; 12: 471-480.
44. Tophkhane C, Yang S-H, Jiang Y, Ma Z, Subramaniam D, Anant S. p53 inactivation upregulates p73 expression through E2F-1 mediated transcription. *PLoS One* 2012; 7: e43564.
45. Cachia A, Indsto J, McLaren K, Mann G, Arends M. CDKN2A mutation and deletion status in thin and thick primary melanoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3511-3515.
46. Ramirez JA, Guitart J, Rao MS, Diaz LK. Cyclin D1 expression in melanocytic lesions of the skin. *Ann Diagn Pathol* 2005; 9: 185-188.
47. Halaban R. Rb/E2F: A two-edged sword in the melanocytic system. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 24: 339-56.
48. Rodriguez-Viciana P, Sabatier C, McCormick F. Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 4943-4954.
49. Reuveni H, Klein S, Levitzki A. The inhibition of Ras farnesylation leads to an increase in p27Kip1 and G1 cell cycle arrest. *Eur J Biochem* 2003; 270: 2759-2772.
50. Waters SB, Holt KH, Ross SE, Syu LJ, Guan KL, Saltiel AR, et al. Desensitization of Ras activation by a feedback association of the SOS-Grb2 complex. *J Biol Chem* 1995; 270: 20883-20888.

51. Chang F, Steelman LS, Shelton JG, Lee JT, Navolanic PM, Blalock WL, et al. Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway. *Int J Oncol* 2003; 22: 469-480.
52. Chang EH, Furth ME, Scolnick EM, Lowy DR. Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 1982; 297: 479-483.
53. Tsai KY, Tsao H. The genetics of skin cancer. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2004; 131C: 82-92.
54. End D, Smets G, Todd AV, Applegate TL, Fuery CJ, Angibaud P, et al. Characterization of the antitumor effects of the selective farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in vivo and in vitro. *Cancer Res* 2001; 61: 131-137.
55. Margolin KA, Moon J, Flaherty LE, Lao CD, Akerley WL, Othus M, et al. Randomized phase II trial of sorafenib with temsirolimus or tipifarnib in untreated metastatic melanoma (S0438). *Cancer Res* 2012; 18: 1129-1137.
56. Peyssonnaud C, Eychène A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell* 2001; 93: 53-62.
57. Edwards RH, Ward MR, Wu H, et al. Absence of BRAF mutations in UV-protected mucosal melanomas. *J Med Genet* 2004; 41: 270-272.
58. Rimoldi D, Salvi S, Lienard D, Lejeune FJ, Speiser D, Zografos L, et al. Lack of BRAF mutations in uveal melanoma. *Cancer Res* 2003; 63: 5712-5715.
59. AKslen LA, Angelini S, Straume O, Bachmann IM, Molven A, Hemminki K, et al. BRAF and NRAS mutations are frequent in nodular melanoma but are not associated with tumor cell proliferation or patient survival. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 312-317.
60. Eisen T, Ahmad T, Flaherty KT, Gore M, Kaye S, Marais R, et al. Sorafenib in advanced melanoma: a Phase II randomised discontinuation trial analysis. *Br J Cancer* 2006; 95: 581-586.
61. Fischer R, Larkin J. Vemurafenib: a new treatment for BRAF-V600 mutated advanced melanoma. *Cancer Manag Res* 2012; 4: 243-252.
62. Aplin A, Kaplan F, Shao Y. Mechanisms of resistance to RAF inhibitors in melanoma. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 1817-1820.
63. Chu EY, Wanat KA, Miller CJ, Amaravadi RK, Fecher LA, Brose MS, et al. Diverse cutaneous side effects associated with BRAF inhibitor therapy: a clinicopathologic study. *J Am Acad Dermatol* 2012; 67: 1265-1272.

64. Hauschild A, Grob J, Demidov L, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* 2012; 380: 358-365.
65. Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* 2012; 367: 1694-1703.
66. Kirkwood JM, Bastholt L, Robert C, Sosman J, Larkin J, Hersey P, et al. Phase II, open-label, randomized trial of the MEK1/2 inhibitor selumetinib as monotherapy versus temozolomide in patients with advanced melanoma. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 555-567.
67. Nikolaev S, Rimoldi D, Iseli C, Valsesia A, Robyr D, Gehrig C, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma. *Nat Genet* 2011; 44: 133-139.
68. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296: 1655-1657.
69. Xu G, Zhang W, Bertram P, Zheng XF, McLeod H. Pharmacogenomic profiling of the PI3K/PTEN-Akt-mTOR pathway in common human tumors. *Int J Oncol* 2004; 24: 893-890.
70. Yonezawa K, Yoshino KI, Tokunaga C, Hara K. Kinase activities associated with mTOR. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004; 279: 271-282.
71. Chong-Shan S, Kehrl JH. Pyk2 amplifies epidermal growth factor and c-Src-induced Stat3 activation. *J Biol Chem* 2004; 279: 17224-17231.
72. Brownawell AM, Kops G, Macara IG, Burgering B. Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Mol Cell Biol* 2001; 10: 3534-3546.
73. Rössig L, Jadidi AS, Urbich C, Badorff C, Zeiher AM, Dimmeler S. Akt-dependent phosphorylation of p21^{Cip1} regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol Cellr Biol* 2001; 21: 5644-5657.
74. Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin N, Bakin A, Baselga J, et al. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27^{Kip1} at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 2002; 8: 1145-1152.
75. Fang X, Yu S, Eder A, Mao M, Bast R, Boyd D, et al. Regulation of BAD phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen-associated protein kinase pathway. *Oncogene* 1999; 18: 6635-6640.
76. Amiri KI, Richmond A. Role of nuclear factor-k B in melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2005; 24: 301-313.

77. Karpinski BA, Morle GD, Huggenvik J, Uhler MD, Leiden JM. Molecular cloning of human CREB-2: an ATF/CREB transcription factor that can negatively regulate transcription from the cAMP response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 4820-4824.
78. Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 2001; 359: 1-16.
79. Steck PA, Pershouse MA, Jessner SA, Yung W, Lin H, Ligon A, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nature Genet* 1997; 15: 356-362.
80. Lee JO, Yang H, Georgescu MM, Di Cristofano A, Maheama T, Shi Y, et al. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 1999; 99: 323-334.
81. Stahl J, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng J, Bosenberg M, et al. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res* 2004; 64: 7002-7010.
82. Tsao H, Zhang X, Benoit E, Haluska F. Identification of PTEN/MMAC1 alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines. *Oncogene* 1998; 16: 3397-3402.
83. Nogueira C, Kim K-H, Sung H, Paraiso K, Dannenberg J-H, M Bosenberg, et al. Cooperative interactions of PTEN deficiency and RAS activation in melanoma metastasis. *Oncogene* 2010; 3: 6222-6232.
84. Aziz SA, Jilaveanu LB, Zito C, Camp RL, Rimm DL, Conrad P, et al. Vertical targeting of the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) pathway as a strategy for treating melanoma. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 6029-6039.
85. Xie X, White EP, Mehnert JM. Coordinate autophagy and mTOR pathway inhibition enhances cell death in melanoma. *PLoS One* 2013; 8: e55096.
86. Phung B, Sun J, Schepsky A, Steingrimsson E, Rönstrand L. C-KIT signaling depends on microphthalmia-associated transcription factor for effects on cell proliferation. *PLoS One* 2011; 6: e24064.
87. Gajewski T. Molecular profiling of melanoma and the evolution of patient-specific therapy. *Semin Oncol* 2012; 38: 236-242.
88. Guo J, Si L, Kong Y, Flaherty K, Xu X, Zhu Y, et al. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J Clin Oncol* 2011; 29: 2904-2909.

89. Kluger H, Dudek A, McCann C, Ritacco J, Southard N, Jilaveanu L, et al. A phase II trial of dasatinib in advanced melanoma. *Cancer* 2011; 117: 2202-2208.
90. Hearing V. Determination of melanin synthetic pathways. *J Invest Dermatol* 2011; 131: E8-E11.
91. Kuroda TS, Itoh T, Fukuda M. Functional analysis of slac2-a/melanophilin as a linker protein between Rab27A and myosin Va in melanosome transport. *Methods Enzymol* 2005; 403: 419-431.
92. Kobayashi N, Nakagawa A, Muramatsu T, Yamashina Y, Shirai T, Hashimoto M. Supranuclear melanin caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 860-810.
93. Mitra D, Luo X, Morgan A, Wang J, Hoang M, Lo J, et al. An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. *Nature* 2012; 491: 449-453.
94. Flanagan N, Healy E, Ray A, Philips S, Todd C, Jackson I, et al. Pleiotropic effects of the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene on human pigmentation. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2531-2537.
95. Busca R, Balloti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res* 2000; 13: 60-69.
96. Duffy D, Zhao Z, Sturm R, Hayward N, Martin N, Montgomery G. Multiple pigmentation gene polymorphisms account for a substantial proportion of risk of cutaneous malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 520-528.
97. Rass K, Reichrat. UV damage and DNA repair in malignant melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol* 2008; 624: 162-78.
98. Santonocito C, Scapatucci M, Penitente R, Paradisi A, Capizzi R, Lanza-Silveri S. Polymorphisms in base excision DNA repair genes and association with melanoma risk in a pilot study on Central-South Italian population. *Clin Chim Acta* 2012; 413: 1519-1524.
99. DiGiovanna J, Kraemer K. Shining a light on xeroderma pigmentosum. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 785-796.
100. Li C, Yin M, Wang L-E, Amos C, Zhu D, Lee J, et al. Polymorphisms of nucleotide excision repair genes predict melanoma survival. *J Invest Dermatol* 2013; 10.1038/jid2012.498.
101. Dianov G. Base excision repair targets for cancer therapy. *Am J Cancer Res* 2011; 1: 845-851.
102. Vaish M. Mismatch repair deficiencies transforming stem cells into cancer stem cells and therapeutic implications. *Molecular Cancer* 2007; 6: 26.

103. Rass K, Reichrath J. UV damage and DNA repair in malignant melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol* 2008; 624: 163-178.
104. Bleackley RC, Heibein JA. Enzymatic control of apoptosis. *Nat Prod Rep* 2001; 18: 431-440.
105. McFarlane M, Williams A. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep* 2004; 5: 674-678.
106. Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene* 2003; 22: 8543-8567.
107. Peitsch MC, Mannherz HG, Tschopp J. The apoptosis endonucleases: cleaning up after cell death? *Trends Cell Biol* 1994; 4: 37-41.
108. Schwerk C, Schulze-Osthoff K. Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1453-1458.
109. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116: 205-219.
110. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 2000; 1: 489-495.
111. Miyazaki T, Reed JC. A GTP-binding adapter protein couples TRAIL receptors to apoptosis-inducing proteins. *Nat Immunol* 2001; 2: 493-500.
112. Cecconi F, Gruss P. Apaf1 in developmental apoptosis and cancer: how many ways to die? *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 1688-1697.
113. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999; 13: 1899-1911.
114. Hinds MG, Lackmann M, Skea GL, Harrison PJ, Huang D, Day C. The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity. *EMBO J* 2003; 22: 1497-1507.
115. Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 526-534.
116. Kilbride SM, Prehn JH. Central roles of apoptotic proteins in mitochondrial function. *Oncogene* 2012; 31: 3481-3491.
117. Reubold TF, Eschenburg S. A molecular view on signal transduction by the apoptosome. *Cell Signal* 2012; 24: 1420-1425.

118. Hedge R, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, et al. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 2002; 277: 432-438.
119. Panka DJ, Atkins MB, Mier JW. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway in the treatment of malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2371s-2375s.
120. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 277-288.
121. Anvekar R, Asciola J, Missert D, Chipuk J. Born to be alive: a role for the BCL-2 family in melanoma tumor cell survival, apoptosis, and treatment. *Front Oncol* 2011; 1 :34.
122. Hu S, Yang X. Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *J Biol Chem* 2003; 278: 10055-10060.
123. McCubrey J, Demidenko Z. Recent discoveries in the cycling, growing and aging of the p53 field. *Aging* 2012; 4: 887-893.
124. Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 1986; 320: 84-85.
125. Fu T, Min H, Xu Y, Chen J, Li G. Molecular dynamic simulation insights into the normal state and restoration of p53 function. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 9709-9740.
126. Bergamaschi D, Samuels Y, Jin B, Duraisingham S, Crook T, Lu X. ASPP1 and ASPP2: common activators of p53 family members. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 1341-1350.
127. Kannan K, Amariglio N, Rechavi G, Jakob-Hirsch J, Kela I, Kaminsky N, et al. DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53. *Oncogene* 2001; 20: 2225-2234.
128. Biderman L, Manley J, Prives C. Mdm2 and mdmX as regulators of gene expression. *Genes Cancer* 2012; 3: 264-273.
129. Giglia-Mari G, Sarasin A. TP53 mutations in human skin cancers. *Human Mutation* 2003; 21: 217-228.
130. Goh A, Coffill C, Lane D. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol* 2011; 223: 116-126.
131. Muthusamy V, Hobbs C, Nogueira C, Cordon-Cardo C, McKee PH, Chin L, et al. Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45: 447-454.
132. Natan E, Joerger A. Structure and kinetic stability of the p63 tetramerization domain. *J Mol Biol* 2012; 415: 503-513.

133. Westfall M, Pietenpol J. p63: molecular complexity in development and cancer. *Carcinogenesis* 2004; 25: 857-864.
134. Yao JY, Chen JK. Roles of p63 in epidermal development and tumorigenesis. *Biomed J* 2012; 35: 457-463.
135. Yang A, Kaghad M, Caput D, McKeon F. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet* 2002; 18: 90-95.
136. Huang Y, Chuang A, Ratovitski E. Phospho- Δ Np63 α /miR-885-3p axis in tumor cell life and cell death upon cisplatin exposure. *Cell cycle*. 2011; 10: 3938-3947.
137. Matin RN, Chick A, Law Pak Chong S, Mesher D, Graf M, Sanza P, et al. p63 is an alternative p53 repressor in melanoma that confers chemoresistance and a poor prognosis. *J Exp Med* 2013; 210: 581-603.
138. Brinck U, Ruschenburg I, Di Como C, Buschmann N, Betke H, Stachura J, et al. Comparative study of p63 and p53 expression in tissue microarrays of malignant melanoma. *Int J Mol Med* 2002; 10: 707-711.
139. Berger M, Hodis E, Heffernan T, Deribe Y, Lawrence M, Protopopov A, et al. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature* 2012; 485: 502-506.
140. Wei X, Walia V, Lin J, Teer J, Prickett T, Gartner J, et al. Exome sequencing identifies GRIN2A as frequently mutated in melanoma. *Nat Genet* 2011; 43: 442-446.
141. Krauthammer M, Kong Y, Ha B, Evans P, Bacchiocchi A, McCusker J, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 2012; 44: 1006-1014.
142. Traynelis S, Wollmuth L, McBain C, Menniti F, Vance K, Ogden K, et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 2010; 62: 405-496.
143. Barbado M, Fablet K, Rongat M, De Waard M. Gene regulation by voltage-dependent calcium channels. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793: 1096-1104.
144. Tsao H, Chin L, Garraway L, Fisher D. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev* 2012; 26: 1131-1155.
145. Carbone M, Ferris L, Baumann F, Napolitano A, Lum C, Flores E. BAP1 cancer syndrome: malignant mesothelioma, uveal and cutaneous melanoma, and MIBAITs. *J Transl Med*. 2012; 10: 179.

146. Clark WH, Elder DE, Guerry D IV, Epstein M, Green M, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 1984; 15: 1147-1165.
147. Noto J. On the clinical significance of cutaneous melanoma's precursors. *Indian Dermatol Online J* 2012; 3: 83-88.
148. 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: 282-288.
149. Kraemer, Greene MH, Tarone R, Elder DE, Clark WH Jr, Guerry D 4th. Dysplastic nevi and cutaneous melanoma risk. *Lancet* 1983; 2: 1076.
150. Marghoob AA, Kopf AW, Rigel DS, Bart R, Friedman R, Yadav S, et al. Risk of cutaneous malignant melanoma in patients with 'classic' atypical-mole syndrome. A case-control study. *Arch Dermatol*. 1994; 130: 993-998.
151. Whiteman D, Watt P, Purdie D, Hughes M. Melanocytic nevi, solar keratosis, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 806-812.
152. Grichnik JM. Melanoma, and stem cell biology. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 2365-2378.
153. Piérard G, Piérard-Franchimont C, Reginster M-A, Quatresooz P. Smouldering malignant melanoma and metastatic dormancy: an update and review. *Dermatol Res Pract* 2012; 2012: 461278.
154. Rosa A, Dabas N, Byrnes D, Eller M, Grichnik M. Germ cell proteins in melanoma: prognosis, diagnosis, treatment, and theories on expression. *J Skin Cancer* 2012; 2012: 621968.
155. Hanahan D, Weinberg A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
156. Calonje E. Best practice No 162. The histological reporting of melanoma. *J Clin Pathol* 2000; 53: 587-590.
157. Clark WH, From L, Bernardino E, Mihm M. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969; 29: 705-726.
158. Dickson P, Gershenwald J. Staging and prognosis of cutaneous melanoma. *Surg Oncol Clin N Am* 2011; 20: 1-17.
159. Brodland DG, Zitelli JA. Mechanisms of metastasis. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27: 1-8.
160. Tejera-Vaquerizo A, Barrera-Vigo M, Fernández-Canedo I, Blázquez-Sánchez N, Mendiola-Fernández M, Fernández-Orland A, et al. Estudio temporal de los diferentes patrones metastásicos en la progresión del melanoma cutáneo. *Actas Dermosifilogr* 2007; 98: 531-538.

161. Morton D, Hoon D, Cochran A, Turner R, Essner R, Takeuchi H. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for early-stage melanoma. *Ann Surg* 2003; 238: 538-550.
162. Hsu MY, Meier F, Herlyn M. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* 2002; 70: 522.
163. Coit DG, Andtbacka R, Anker CJ, Bichakjian CK, Carson W, Daud A, et al. Melanoma, Version 2.2013: Features Updates to the NCCN Guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 2013; 11: 395-407.
164. Martinez SR, Shah DR, Yang AD, Canter RJ, Maverakis E. Sentinel lymph node biopsy in patients with primary cutaneous melanoma: patterns of use and underuse utilizing a population-based model. *ISRN Dermatol* 2013; 2013: 315609.
165. Morton D, Cochran A, Thompson J, Elashoff R, Essner R, Glass E. Sentinel node biopsy for early-stage melanoma accuracy and morbidity in MSLT-I, an international multicenter trial. *Ann Surg* 2005; 242: 302-311.
166. Covarelli P, Vedovati MC, Becattini C, Rodelli F, Tomassini GM, Messina S, et al. The sentinel node biopsy in patients with thick melanoma: outcome analysis from single-institution database. *In Vivo* 2011; 25: 439-443.
167. Scoggins CR, Bowen AL, Mertin RC, Edwards MJ, Reintgen DS, Ross MI, et al. Prognostic information from sentinel lymph node biopsy in patients with thick melanoma. *Arch Surg* 2010; 145: 622-627.
168. Gajdos C, Griffith KA, Wong SL, Johnson TM, Chang AE, Cimmino VM, et al. Is there a benefit to sentinel lymph node biopsy in patients with T4 melanoma? *Cancer* 2009; 115: 5752-5760.
169. Gutzmer R, Satzger I, Thoms KM, Völker B, Mitteldorf C, Kapp A, et al. Sentinel lymph node status is the most important prognostic factor for thick melanoma (> or = 4 mm) melanomas. *J Dtsch Dermatol Ges* 2008; 6: 198-203.
170. Vermeeren L, van der Ent FW, Sastrowijoto PS, Hulsewé KW. Thick melanoma: prognostic value of positive sentinel nodes. *World J Surg* 2009; 33: 2464-2468.
171. Morton D, Cochran A, Thompson J. The rationale for sentinel-node biopsy in primary melanoma. *Nat Clin Pract Oncol* 2008; 5: 510-511.
172. Rondelli F, Vedovati MC, Becattini C, Tomassini GM, Messina S, Noya G, et al. Prognostic role of sentinel node biopsy in patients with thick melanoma: a meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012; 26: 560-565.

173. Cecchi R, Buralli L, Innocenti S, Seghieri G, De Gaudio C. Sentinel lymph node biopsy in patients with thick (= 4 mm) melanoma: a single-centre experience. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007; 21: 758-761.
174. Göppner D, Ulrich J, Pokrywka A, Peters B, Gollnick H, Leverkus M. Sentinel lymph node biopsy status is a key parameter to stratify the prognostic heterogeneity of malignant melanoma in high-risk tumors >4 mm. *Dermatology* 2011; 222: 59-66.
175. Kelly J, Redmond HP. The role of sentinel lymph node biopsy in patients with thick melanoma. A single centre experience. *Surgeon* 2012; 10: 65-70.
176. Rughani MG, Swan MC, Adams TS, Marshall A, Asher R, Cassel OC, et al. Sentinel lymph node status predicts survival in thick melanomas: the Oxford perspective. *Eur J Surg Oncol* 2012; 38: 936-942.
177. Fujisawa Y, Otsuka F. The benefit of a sentinel lymph node biopsy and adjuvant therapy in thick (>4 mm) melanoma: multicenter, retrospective study of 291 Japanese patients. *Melanoma Res* 2012; 22: 362-367.
178. Hinz T, Ahmadzadehfar H, Wierzbicki A, Hoeller T, Wenzel J, Biersack HJ, et al. Sentinel lymph node status as most important prognostic factor in patients with high-risk cutaneous melanomas (tumour thickness >4 mm): outcome analysis from a single institution. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2012; 39: 1316-1325.
179. Fairbairn NG, Orfaniotis G, Butterworth M. Sentinel lymph node biopsy in thick malignant melanoma: a 10-year single unit experience. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2012; 65: 1396-1402.
180. Rhodes AR. Prognostic usefulness of sentinel lymph node biopsy for patients who have clinically node negative, localized, primary invasive cutaneous melanoma: a Bayesian analysis using informative published reports. *Arch Dermatol* 2011; 147: 408-415.
181. Zippel DB, Shapira R, Kuchuk I, Goitein D, Winkler E, Papa MZ, et al. Outcome of thick (> 4 mm) node-negative melanomas. *Isr Med Assoc J* 2009; 11: 669-672.
182. Slipicevic A, Herlyn M. Narrowing the knowledge gaps for melanoma. *Ups J Med Sci* 2012; 117: 237-243.
183. Braeuer R, Zigler M, Villares G, Dobroff A, Bar-Eli M. Transcriptional control of melanoma metastasis: The importance of the tumour microenvironment. *Semin Cancer Biol* 2011; 21: 83-88.
184. Alonso S, Ortiz P, Pollán M, Pérez-Gómez B, Sánchez L, Acuña MJ, et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles. *Am J Pathol* 2004; 164: 193-203.

185. Schramm S-J, Campain A, Scolyer R, Yang Y, Mann G. Review and cross-validation of gene expression signatures and melanoma prognosis. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 274-283.
186. Eckert D, Buhl S, Weber S, Jäger R, Schorle H. The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol* 2005; 6: 246.
187. Tellez C, McCarty M, Ruiz M, Bar-Eli M. Loss of activator protein-2 α results in overexpression of protease-activated receptor-1 and correlates with the malignant phenotype of human melanoma. *J Biol Chem* 2003; 278: 46632-46642.
188. Bar-Eli M. Gene regulation in melanoma progression by the AP-2 transcription factor. *Pigment Cell Res* 2001;14:78-85.
189. Woenckhaus C, Giebel J, Failing K, Fenic I, Dittberner T, Poetsch M. Expression of AP-2alpha, c-kit, and cleaved caspase-6 and -3 in naevi and malignant melanomas of the skin. A possible role for caspases in melanoma progression? *J Pathol* 2003; 201: 278-287.
190. Leppä S, Eriksson M, Saffrich R, Ansorge W, Bohmann D. Complex functions of AP-1 transcription factors in differentiation and survival of PC12 cells. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 4369-4378.
191. Yang S, McNulty S, Meyskens FL Jr. During human melanoma progression AP-1 binding pairs are altered with loss of c-Jun in vitro. *Pigment Cell Res* 2004; 17: 74-83.
192. Goding C. Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev* 2000; 14: 1712-1728.
193. Widlund HR, Horstmann MA, Price ER, Cui J, Lessnick S, Wu M, et al. Beta-catenin induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. *J Cell Biol* 2002; 158: 1079-1087.
194. Yasumoto K, Yokoyama K, Takahashi K, Tomita Y, Shibahara S. Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes. *J Biol Chem* 1997; 272: 503-509.
195. Carreira S, Goodall J, Aksan I, La Rocca S, Galibert M, Denat L, et al. Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature* 2005; 433: 764-769.
196. Tachibana M. MITF: a stream flowing for pigment cells. *Pigment Cell Res* 2000; 13: 230-240.
197. Wellbrock C, Marais R. Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J Cell Biol* 2005; 170:703-708.

198. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger A, Ramaswamy S, et al. Integrative genomic analysis identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* 2005; 436: 117-122.
199. Yokoyama S, Woods S, Boyle G, Aoude L, MacGregor S, Zismann V, et al. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature* 2011; 480: 99-103.
200. Landen CN, Chavez-Reyes A, Bucana C, Schmandt R, Deavers MT, Lopez-Berestein G, et al. Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer Res* 2005; 65: 6910-6918.
201. Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules – Part I. *N Engl J Med* 1996; 334: 1526-1529.
202. Wood B, Leong A. The biology and diagnostic applications of cadherins in neoplasia: a review. *Pathology* 2003; 35: 101-105.
203. Willert K, Nusse R. β -catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 95-102.
204. Perlis C, Herlyn M. Recent advances in melanoma biology. *Oncologist* 2004; 9: 182-187.
205. Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res* 2005; 18: 150-159.
206. Tang A, Eller MS, Hara M, Yaar M, Hirohashi S, Gilchrist BA. E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. *J Cell Sci* 1994; 107: 983-992.
207. Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* 2001; 61: 3819–3825.
208. Hao L, Ha JR, Kuzel P, Garcia E, Persad S. Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail. *Br J Dermatol* 2012; 166: 1184-1197.
209. Monaghan-Benson E, Burridge K. Mutant B-RAF regulates a Rac-dependent cadherin switch in melanoma. *Oncogene* 2012; 10: 2012.
210. Tsutsumida A, Hamada J, Tada M, Aoyama T, Furuuchi K, Yamamoto Y, et al. Epigenetic silencing of E- and P-cadherin gene expression in human melanoma cell lines. *Int J Oncol* 2004; 25: 1415-1421.
211. Kuphal S, Bosserhoff AK. Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin. *Oncogene* 2006; 25: 248-259.

212. Qi J, Chen N, Wang J, Siu CH. Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the β -catenin signaling pathway. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 4386-4397.
213. Qi J, Wang J, Romanyuk O, Siu CH. Involvement of Src family kinases in N-cadherin phosphorylation and β -catenin dissociation during transendothelial migration of melanoma cells. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 1261-1272.
214. van Marck V, Stove C, van den Bossche K, Stove V, Paredes J, van der Haeghen Y, et al. P-cadherin promotes cell-cell adhesion and counteracts invasion in human melanoma. *Cancer Res* 2005; 65: 8774-8783.
215. Bauer R, Hein R, Bosserhoff AK. A secreted form of P-cadherin is expressed in malignant melanoma. *Exp Cell Res* 2005; 305: 418-426.
216. Bischoff J. Cell adhesion and angiogenesis. *J Clin Invest* 1997; 99: 373-376.
217. Rinko LJ, Lawrence MB, Guilford WH. The molecular mechanics of P- and L-Selectin domains binding to PSGL-1. *Biophysical Journal* 2004; 86: 544-554.
218. Zak I, Lewandoswska E, Gnyp W. Selectin glycoprotein ligands. *Acta Biochim Pol* 2000; 47: 393-412.
219. Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, Furukawa H, Ishikawa O, Sasaki Y, et al. Increased expression of sialyl Lewisx antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Res* 1993; 53: 3632-3637.
220. Amado M, Carneiro F, Seixas M, Clausen H, Sobrinho-Simões M. Dimeric sialyl-Le(x) expression in gastric carcinoma correlates with venous invasion and poor outcome. *Gastroenterology* 1998; 114: 462-470.
221. Yamaoka T, Fujimoto M, Ogawa F, Yoshizaki A, Bae SJ, Muroi E, et al. The roles of P- and E-selectins and P-selectin glycoprotein ligand-1 in primary and metastatic mouse melanoma. *J Dermatol Sci* 2011; 64: 99-107.
222. Halaby DM, Poupon A, Mornon JP. The immunoglobulin fold family: sequence analysis and 3D structure comparisons. *Protein Eng* 1999; 12: 563-571.
223. Wang J, Springer TA. Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses. *Immunol Rev* 1998; 163: 197-215.
224. Bogenrieder T, Herlyn M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene* 2003; 22: 6524-6536.

225. Wong C, Dye D, Coombe D. The role of immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules in cancer metastasis. *Int J Cell Biol* 2012; 2012: 340296.
226. Haritopoulos KN, Lazaris AC, Kavantzias N, Tseleni-Balafouta S, Thomopoulou G, Aroni K. ICAM-1 and β_3 integrin immunoexpression in malignant melanoma cells: can they be used as additional predictors? *APMIS* 2003; 111: 421-429.
227. Howell WM, Rose-Zerilli MJ, Theaker JM, Bateman AC. ICAM-1 polymorphisms and development of cutaneous malignant melanoma. *Int J Immunogenet* 2005; 32: 367-373.
228. Yamada M, Yanaba K, Takehara K, Sato S. Clinical significance of serum levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 and soluble L-selectin in malignant melanoma. *Arch Dermatol Res* 2005; 297: 256-260.
229. Mills L, Tellez C, Huang S, Baker C, McCarty M, Green L, et al. Fully human antibodies to MCAM/MAC18 inhibit tumor growth and metastasis of human melanoma. *Cancer Res* 2002; 62: 5106-5114.
230. Xie S, Luca M, Huang S, Gutman M, Reich R, Johnson J, et al. Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 1997; 57: 2295-2303.
231. Fernandez C, Clark C, Burrows L, Schofield NR, Humphries MJ. Regulation of the extracellular ligand binding activity of integrins. *Front in Biosci* 1998; 3: d684-700.
232. Wiesner S, Legate KR, Fassler R. Integrin-actin interactions. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 1081-1099.
233. Shattil SJ. Integrins and Src: dynamic duo of adhesion signaling. *Trends Cell Biol* 2005; 15: 399-403.
234. Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 1994; 372: 786-791.
235. Humphries MJ. Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 2000; 28: 311-339.
236. Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest* 1991; 87: 1-5.
237. Felding-Habermann B, Mueller BM, Romerdahl CA, Cheresch DA. Involvement of integrin alpha V gene expression in human melanoma tumorigenicity. *J Clin Invest* 1992; 89: 2018-2022.
238. Nip J, Shibata H, Loskutoff DJ, Cheresch DA, Brodt P. Human melanoma cells derived from lymphatic metastases use integrin alpha v beta 1 to adhere to lymph node vitronectin. *J Clin Invest* 1992; 90: 1406-1413.

239. Felding-Habermann B, Fransvea E, O'Toole TE, Manzuk L, Faha B, Hensler M. Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 427-436.
240. Hieken TJ, Farolan M, Ronan SG, Shikaitis A, Wild L, Das Gupta TK. Beta3 integrin expression in melanoma predicts subsequent metastasis. *J Surg Res* 1996; 63: 169-173.
241. Saalbach A, Wetzel A, Hausteiner UF, Sticherling M, Simon JC, Anderegg U. Interaction of human Thy-1 (CD90) with the integrin alphavbeta3 (CD51/CD61): an important mechanism mediating melanoma cell adhesion to activated endothelium. *Oncogene* 2005; 24: 4710-4720.
242. Döme B, Rásó E, Dobos J, Mészáros L, Varga N, Puskás L, et al. Parallel expression of alphaIIb beta3 and alphavbeta3 integrins in human melanoma cells upregulates bFGF expression and promotes their angiogenic phenotype. *Int J Cancer* 2005; 116: 27-35.
243. Bao W, Strömblad S. Integrin αv -mediated inactivation of p53 controls a MEK1-dependent melanoma cell survival pathway in three-dimensional collagen. *J Cell Biol* 2004; 167: 745-756.
244. Melchiori A, Mortarini R, Carlone S, Marchisio P, Anichini A, Noonan D, et al. The alpha 3 beta 1 integrin is involved in melanoma cell migration and invasion. *Exp Cell Res* 1995; 219: 233-242.
245. Pochec E, Litynska A, Amoresano A, Casbarra A. Glycosylation profile of integrin alpha 3 beta 1 changes with melanoma progression. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1643: 112-123.
246. Litynska A, Przybylo M, Pochec E, Kremser E, Hoja-Lukowicz D, Sulowska U. Does glycosylation of melanoma cells influence their interactions with fibronectin? *Biochimie* 2005; 88: 527-534.
247. Vu T, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & Dev* 2000; 14: 2123-2133.
248. Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 1362-1378.
249. Benbow U, Brinckerhoff CE. The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix Biol* 1997; 15: 519-526.
250. Caudroy S, Polette M, Nawrocki-Raby B, Cao J, Toole BP, Zucker S, Birembaut P. EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 697-702.
251. Hibino T, Sakaguchi M, Miyamoto S, Yamamoto M, Motoyama A, Hosoi J, et al. S100A9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. *Cancer Res* 2013; 73: 172-183.
252. Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol* 2011; 12: 233.

253. Frank A, David V, Aurelie TR, Florent G, William H, Philippe B. Regulation of MPs during melanoma progression: from genetic to epigenetic. *Anticancer Agents Med Chem* 2012; 12: 773-782.
254. Nikkola J, Vihinen P, Vuoristo MS, Kellokumpu-Lehtinen P, Kahari VM, Pyrhonen S. High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5158-5166.
255. Huntington JT, Shields JM, Der CJ, Wyatt C, Benbow U, Slingsluff C, et al. Overexpression of collagenase 1 (MMP-1) is mediated by the ERK pathway in invasive melanoma cells: role of BRAF mutation and fibroblast growth factor signaling. *J Biol Chem* 2004; 279: 33168-33176.
256. Loffek S, Zigrino P, Angel P, Anwald B, Krieg T, Mauch C. High invasive melanoma cells induce matrix metalloproteinase-1 synthesis in fibroblasts by interleukin-1alpha and basic fibroblast growth factor-mediated mechanisms. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 638-643.
257. Banerji A, Chakraborti J, Mitra A, Chatterjee A. Cell membrane-associated MT1-MMP-dependent activation of pro-MMP-2 in A375 melanoma cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2005; 24: 3-17.
258. Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Nuclear factor-inducing kinase plays a crucial role in osteopontin-induced MAPK/IkappaBalpha kinase-dependent nuclear factor kappaB-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. *J Biol Chem* 2004; 279: 38921-38935.
259. Xie TX, Wei D, Liu M, Gao AC, Ali-Osman F, Sawaya R, et al: Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene* 2004; 23: 3550-3560.
260. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257.
261. John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res* 2001; 16: 345-351.
262. Naglich JG, Jure-Kunkel M, Gupta E, Fargnoli J, Henderson AJ, Lewin AC, et al. Inhibition of angiogenesis and metastasis in two murine models by the matrix metalloproteinase inhibitor, BMS-275291. *Cancer Res* 2001; 61: 8480-8485.
263. McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* 2000; 5: 3-10.
264. Marcoval J, Moreno A, Graells J, Vidal A, Escribá JM, García-Ramírez M, et al. Angiogenesis and malignant melanoma. Angiogenesis is related to the development of vertical (tumorigenic) growth phase. *J Cutan Pathol* 1997; 24: 212-218.

265. Streit M, Detmar M. Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. *Oncogene* 2003; 22: 3172-3179.
266. Fruehauf J, Lutzky J, McDermott D, Brown C, Meric J-B, Rosbrook B, et al. Multicenter, phase II study of axitinib, a selective second-generation inhibitor of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2, and 3, in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 7462-7469.
267. Schuster C, Eikesdal H, Puntervoll H, Geisler J, Geisler S, Heinrich D, et al. Clinical efficacy and safety of bevacizumab monotherapy in patients with metastatic melanoma: predictive importance of induced early hypertension. *PLoS One* 2012; 2012; 7:e38364.
268. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 2003; 170: 3369-3376.
269. Gutman M, Singh RK, Xie K, Bucana CD, Fidler IJ. Regulation of interleukin-8 expression in human melanoma cells by the organ environment. *Cancer Res* 1995; 55: 2470-2475.
270. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999; 155: 739-752.
271. Folberg R, Hendrix M, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2000; 156: 361-381.
272. Yao XH, Ping YF, Bian XW. Contribution of cancer stem cells to tumor vasculogenic mimicry. *Protein Cell* 2011; 2: 266-272.
273. Hendrix M, Seftor EA, Meltzer PS, Gardner LM, Hess AR, Kirschmann DA, et al. Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry. *Proc Natl Am Sci U S A* 2001; 98: 8018-8023.
274. Hess AR, Seftor EA, Gardner L, Carles-Kinch K, Schneider GB, Seftor RE, et al. Molecular regulation of tumor cell vasculogenic mimicry by tyrosine phosphorylation. *Cancer Res* 2001; 61: 3250-325.
275. Massi D, Franchi A, Paglierani M, Ketabchi S, Borgognoni L, Reali UM, et al. Vasculogenic mimicry has no prognostic significance in pT3 and pT4 cutaneous melanoma. *Hum Pathol* 2004; 35: 496-502.
276. Clarijs R, Ruiters DJ, de Waal RM. Lymphangiogenesis in malignant tumours: does it occur? *J Pathol* 2001; 193: 143-146.

277. Massi D, Puig S, Franchi A, Malvehy J, Vidal-Sicart S, González-Cao M, et al. Tumour lymphangiogenesis is a possible predictor of sentinel lymph node status in cutaneous melanoma: a case-control study. *J Clin Pathol* 2006; 59: 166-173.
278. Liersch R, Shin J, Bayer M, Schwöppe C, Schliemann C, Berdel W. Analysis of a novel highly metastatic melanoma cell line identifies osteopontin as a new lymphagiogenic factor. *Int J Oncol* 2012; 41: 1455-1463.
279. Dadras SS, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Nguyen L, Vora A, Muzikansky A, et al. Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Mod Pathol* 2005; 18: 1232-1242.
280. Kopper L, Hajdú M. Tumor stem cells. *Pathol Oncol Res* 2004; 10: 6973.
281. 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.
282. Riether C, Schürch C, Ochsenbein A. From “magic bullets” to specific cancer immunotherapy. *Swiss Med Wkly* 2013; 143: w13734.
283. Ichim C, Revisiting immunosurveillance and immunostimulation: implications for cancer immunotherapy. *J Transl Med* 2005; 3: 8.
284. Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. Skin Cancers in organ transplantation. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1681-1691.
285. Aris M, Barrio M, Mordoh J. Lessons from cancer immunoediting in cutaneous melanoma. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012: 192719.
286. Pandolfi F, Boyle LA, Trentin L, Kurnick JT, Isselbacher KJ, Gattoni-Celli S. Expression of HLA-A2 antigen in human melanoma cell lines and its role in T-cell recognition. *Cancer Res* 1991; 51: 164-170.
287. Driessens G, Kline, J, Gajewski T. Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunol Rev* 2009; 229: 126-144.
288. Mapara M, Sykes M. Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1136-1151.
289. Mukherji B. Immunology of melanoma. *Clin Dermatol* 2013; 31: 156-165.
290. Urosevic M, Dummer R. HLA-G in skin cancer: a wolf in sheep's clothing? *Hum Immunol* 2003; 64: 1073-1080.

291. Vierling AM. Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in melanoma. *Am Surg* 2011; 77: 188-192.
292. Davar D, Tarhini A, Kirkwood J. Adjuvant therapy for melanoma. *Cancer J.* 2012; 18: 192-202.
293. Vacchelli E, Eggermont A, Galon J, Sautès-Fridman C, Zitvogel L, Kroemer G, et al. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology* 2013; 2: e22789.
294. Zitvogel L, Kroemer G. Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2012; 8: 1223-1225.
295. Balch C, Gershenwald J, Soong S, Thompson J, Atkins M, Byrd D. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009; 27: 6199-6206.
296. Sam SS, Lebel KA, Bissailon CL, Tafe LJ, Tsongalis GJH, Lefferts JA. Automation of genomic DNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract* 2012; 208: 705-7.
297. Marras S, Kramer F, Tyagi S. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e122.
298. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: e164.
299. Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res* 2001; 11: 863-74.
300. Saldanha G, Potter L, DaForno P, Pringle J. BRAF e NRAS mutation frequencies. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4499-4505.
301. Klopffleisch R, Weiss AT, Gruber AD. Excavation of a buried treasure – DNA, mRNA, miRNA and protein analysis in formalin fixed, paraffin embedded tissues. *Histol Histopathol* 2011; 26: 797-810.
302. Solassol J, Ramos J, Crapez E, Saifi M, Mangé A, Vianès E, Lamy PJ, Costes V, Maudelonde T. KRAS Mutation Detection in Paired Frozen and Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Colorectal Cancer Tissues. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 3191-3204.
303. Shiratsuchi T, Nishimori H, Ichise H, Nakamura Y, Tokino T. Cloning and characterization of BAI2 and BAI3, novel genes homologous to brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1). *Cytogenet Cell Genet* 1997; 79: 103-108.
304. Kee HJ, Ahn KY, Choi KC, Song JW, Heo T, Jung S, et al. Expression of brain-specific angiogenesis inhibitor 3 (BAI3) in normal brain and implications for BAI3 in ischemia-induced brain angiogenesis and malignant glioma. *FEBS Letters* 2004; 569: 307-316.

305. Bulliard J-L, De Weck D, Fisch T, Bordoni A, Levi F. Detailed site distribution of melanoma and sunlight exposure: aetiological patterns from a Swiss series. *Ann Onco.* 2007; 18: 789-794.
306. Micu E, Baturaite Z, Juzeniene A, Bruland ØS, Moan JE. Superficial-spreading and nodular melanomas in Norway: a comparison by body site distribution and latitude gradients. *Melanoma Res* 2012; 22: 460-465.
307. Daigo Y, Nishiwaki T, Kawasoe T, Tamari M, Tsuchiya E, Nakamura Y. Molecular cloning of a candidate tumor suppressor gene, DLC1, from chromosome 3p21.3. *Cancer Res* 1999; 59: 1966-1972.
308. Zhang Y, Miao Y, Yi J, Wang R, Chen L. Frequent epigenetic inactivation of deleted in lung and esophageal cancer 1 gene by promoter methylation in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2010; 11: 264-270.
309. Ricketts C, Morris M, Gentle D, Brown M, Wake N, Woodward E, et al. Genome-wide CpG island methylation analysis implicates novel genes in the pathogenesis of renal cell carcinoma. *Epigenetics* 2012; 7: 278-290.
310. Ying J, Poon FF, Yu J, Geng H, Wong AHY, Qiu G-H, et al. DLEC1 is a functional 3p22.3 tumour suppressor silenced by promoter CpG methylation in colon and gastric cancers. *Br J Cancer* 2009; 100: 663-669.
311. Al Sarakbi W, Reefy S, Jiang WG, Roberts T, Newbold RF, Mokbel K. Evidence of a tumour suppressor function for DLEC1 in human breast cancer. *Anticancer Res* 2010; 30: 1079-1082.
312. Smith IM, Mithani SK, Liu C, Chang SS, Begum S, Dhara M, et al. Novel integrative methods for gene discovery associated with head and neck squamous cell carcinoma development. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2009; 135: 487-495.
313. Wang Z, Li L, Su X, Gao Z, Srivastava G, Murray P, et al. Epigenetic silencing of the 3p22 tumour suppressor DLEC1 by promoter CpG methylation in non-Hodgkin and Hodgkin lymphomas. *J Transl Med* 2012; 10: 209.
314. Navarro A, Yin P, Monsivais D, Lin S, Du P, Wei J-J, et al. Genome-wide DNA methylation indicates silencing of tumor suppressor genes in uterine leiomyoma. *PLoS One* 2012; 7: e33284.
315. Sasaki H, Hikosaka Y, Kawano O, Moriyama S, Yano M, Fujii Y. Methylation of the DLEC1 gene correlates with poor prognosis in Japanese lung cancer patients. *Oncol Lett* 2010; 1: 283-287.
316. Zhang Q, Ying J, Li J, Fan Y, Poon FF, Ng KM, et al. Aberrant promoter methylation of DLEC1, a critical 3p22 tumor suppressor for renal cell carcinoma, is associated with more advanced tumor stage. *J Urol* 2010; 184: 731-737.

317. Montavon C, Gloss BS, Warton K, Barton CA, Statham AL, Scurry JP, et al. Prognostic and diagnostic significance of DNA methylation patterns in high grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2012; 124: 582-588.
318. Gorman SW, Haider NB, Grieshammer U, Swiderski RE, Kim E, Welch JW, et al. The cloning and developmental expression of unconventional myosin IXA (MYO9A), a gene in the Bardet-Biedl syndrome (BBS4) region at chromosome 15q22-q23. *Genomics* 1999; 59: 150-160.
319. Omelchenko T, Hall A. Myosin-IXA regulates collective epithelial cell migration by targeting RhoGAP activity to cell-cell junctions. *Curr Biol* 2012; 22: 278-288.
320. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-752.
321. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 1998; 2: 305-316.
322. Brunner HG, Hamel, BC, Bokhoven H. p63 gene mutations and human developmental syndromes. *Am J Med Genet* 2002; 112: 284-290.
323. Nagore E, Oliver V, Botella-Estrada R, Moreno-Picot S, Guillén C, Fortea J. Clinicopathological analysis of 1571 cutaneous malignant melanomas in Valencia, Spain: Factors related to tumour thickness. *Acta Derm Venereol* 2006; 86: 50-56.
324. Garbe C, McLeod GR, Buettner PG. Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. *Cancer* 2000; 89: 1269-1278.
325. Luk NM, Ho LC, Choi CL, Wong KH, Yu KH, Yeung WK. Clinicopathological features and prognostic factors of cutaneous melanoma among Hong Kong Chinese. *Clin Exp Dermatol* 2004; 29: 600-604.
326. Phan A, Touzet S, Dalle S, Ronger-Savlé S, Balme B, Thomas L. Acral lentiginous melanoma: a clinicoprognostic study of 126 cases. *Br J Dermatol* 2006; 155: 561-569.
327. Chen LL, Jaimes N, Barker CA, Busam KJ, Marghoob AA. Desmoplastic melanoma: A review. *J Am Acad Dermatol* 2013; 68: 825-833.
328. Clark LN, Shin DB, Troxel AB, Khan S, Sober AJ, Ming ME. Association between the anatomic distribution of melanoma and sex. *J Am Acad Dermatol* 2007; 56: 768-773.
329. Cormier J, Xing Y, Ding M, Lee J, Mansfield P, Gershenwald J, et al. Ethnic differences among patients with cutaneous melanoma. *Arch Intern Med* 2006; 166: 1907-1914.

330. Lamerson C, Eaton K, Sax J, Kashani-Sabet M. Comparing melanoma invasiveness in dermatologist versus patient-detected lesions: a retrospective chart review. *J Skin Cancer* 2012; 2012: 187963.
331. Demierre M-F, Chung C, Miller D, Geller A. Early detection of thick melanomas in the United States beware of the nodular subtype. *JAMA* 2005; 141: 745-750
332. Sneyd MJ, Cox B. Clinical and histologic factors associated with melanoma thickness in New Zealand Europeans, Maori, and Pacific Peoples. *Cancer* 2011; 11: 2489-2498.
333. Green AC, Baade P, Coory M, Aitken JF, Smithers M. Population-based 20-year survival among people diagnosed with thin melanoma in Queensland, Australia. *J Clin Oncol* 2012; 30: 1462-1467.
334. Messenguer F, Agustí-Mejías A, Traves V, Alegre V, Oliver V, Nagore E. Risk factors for the development of locoregional cutaneous metastases as the sole form of recurrence in patients with melanoma. *Actas Dermosifiliogr* 2013; 104: 53-60.
335. White RL Jr, Ayers GD, Steil VH, Ding S, Gershenwald JE, Salo JC, et al. Factors predictive of the status of sentinel lymph nodes in melanoma patients from a large multicenter database. *Ann Surg Oncol* 2011; 18: 3593-3600.
336. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF. Update on the melanoma staging system: the importance of sentinel node staging and primary tumor mitotic rate. *J Surg Oncol* 2011; 104: 379-385.
337. Homsí J, Kashani-Sabet M, Messina JL, Daud A. Cutaneous melanoma: prognostic factors. *Cancer Control* 2005; 12: 223-229.
338. Balch C, Gershenwald J, Soong S, Thompson J, Ding J, Byrd D, et al. Multivariate analysis of prognostic factors among 2,313 patients with stage III melanoma: Comparison of nodal micrometastases versus macrometastases. *J Clin Oncol* 2010; 28: 2452-2459.
339. Phan GQ, Messina JL, Sondak VK, Zager JS. Sentinel lymph node biopsy for melanoma: indications and rationale. *Cancer Control* 2019; 16: 234-239.
340. van der Ploeg AP, van Akkooi AC, Rutkowski P, Cook M, Nieweh OE, Rossi CR, et al. Prognosis in patients with sentinel lymph node-positive melanoma without immediate completion lymph node dissection. *Br J Surg* 2012; 99: 1396-1405.
341. Meier F, Will S, Ellwanger U, Schlagenhauß B, Schitteck B, Rassner G, et al. Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol* 2002; 147: 62-70.
342. Didelot A, Le Corre D, Luscan A, Cazes A, Pallier K, Emile JF, et al. Competitive allele specific TaqMan PCR for KRAS, BRAF and EGFR mutation detection in clinical formalin fixed paraffin embedded samples. *Exp Mol Pathol* 2012; 92: 275-280.

Anexo A

Este anexo compila os dados relativos ao controlo de qualidade das amostras de melanoma (Tabela A1) e de nevos melanocíticos (Tabela A2).

Tabela A1. Amostras de melanomas primários, metástases cutâneas em trânsito e metástases ganglionares dos doentes do grupo A. O sombreado vermelho corresponde a amostras excluídas por taxa de genotipagem inferior a 60%. O sombreado verde corresponde a amostras excluídas por impossibilidade de extrair DNA com concentração mínima de 15 ng/μL e/ou rácios de absorvância <1,6.

Caso	Amostra	Conc. (ng/μL)	260/230	260/280	Vol. (μL)	Precip.	Genotipagens (%)
A1	A1	35,18	2,03	1,96	40		61,3
A2	A2	69,27	2,1	1,83	40		61,3
	B1	31,82	2,09	1,92	16		84,9
	B2	20,34	2,08	1,97	16		93,5
	B3	20,74	2,2	1,96	40		85,8
	B4	33,88	2,14	1,98	16		100
A3	A3	17,96	1,75	1,94	16		67,7
A4	A4	28,93	2,23	1,87	16		92,7
A5	A5	32,22	1,89	1,94	14	√	100
A6	A6	48,65	1,52	1,77	5,5	√	96,8
	B21	3,34	2,06	1,89	16		—
A7	A7	29,29	2,02	1,87	6	√	96,8
A8	A8	29,53	2,06	1,81	6	√	80,6
A9	A9	20,87	1,83	1,94	16		82,3
A10	A10	17,87	2,1	1,79	6	√	100
A11	A11	36,67	1,6	1,9	40		87,1
A12	A12	37,13	1,9	1,7	40		61,3
A13	A13	23,3	1,94	1,93	6	√	100
A14	A14	78,56	2,16	1,92	14		96,8
A15	A15	78,97	2,13	1,93	14		100
A16	A16	38,52	1,75	1,86	40		61,3
	B5	54,09	2,03	1,99	6	√	96,8
	B6	39,93	1,64	1,94	66,5		100
	B7	49,55	2,28	1,69	6	√	100
A17	A17	44,95	1,89	1,94	16		98,4
A18	A18	65,95	1,78	1,84	16,5		98,1
A19	A19	15,99	1,8	1,87	6	√	67,7
	B8	60,57	2,14	2,04	16		95,2
	B9	65,72	2,1	2,02	16		100
A20	A20	28,27	2	1,97	40		86,5
	B10	64,23	2,14	2,03	16		95,2
A21	A21	22,52	1,91	1,88	5,5	√	96,8

Caso	Amostra	Conc. (ng/μL)	260/230	260/280	Vol. (μL)	Precip.	Genotipagens (%)
A22	A22	18,57	2,31	1,97	6	√	100
A23	A23	59,44	2,16	1,97	14		98,9
A24	A24	34,73	1,9	1,9	40		98,7
A25	A25	58,50	1,72	1,83	47		100
A26	A26	54,23	2,28	1,74	6	√	100
A27	A27	44,91	2,07	2	16		100
A28	A28	82,66	2,17	1,96	16		96,8
A29	A29	55,34	1,61	1,77	34,5		63,7
A30	A30	38,65	2,03	1,88	16		100
A31	A31	18,87	1,83	1,98	16		96,8
A32	A32	43,10	1,68	1,94	40		100
A33	A33	47,20	1,66	1,88	52		100
A34	A34	67,68	2,13	1,95	16		100
A35	A35	16,89	1,93	1,89	6	√	100
A36	A36	58,3	1,9	1,9	40		90,9
	B11	59,83	2,1	1,95	16		98,4
A37	A37	24,39	1,8	1,98	40		75,8
	B12	51,4	2,08	1,98	16		100
	B13	24,26	1,83	1,88	16		72,6
A38	A38	23,07	1,92	1,86	5,5	√	96,8
A39	A39	42,03	1,93	1,86	6	√	80,6
A40	A40	28,97	1,7	1,9	40		75,8
A41	A41	25,75	1,98	1,92	5,5	√	95
A42	A42	69,67	2,02	2,02	16		94,6
A43	A43	27,99	1,95	2	40		92,3
	B14	82,7	2,16	1,95	16		92,5
	B15	16,85	2,22	1,98	6	√	100
A44	A44	37,92	1,98	1,96	40		100
A45	A45	20,28	1,7	1,9	40		91
	B16	30,48	1,7	1,9	16		98,4
	B22	2,67	1,27	1,82	16		—
A46	A46	58,03	2,11	1,93	16		98,4
A47	A47	47,5	1,9	1,88	16		100
A48	A48	61,52	2,08	1,87	16		100
A49	A49	60,99	2	1,9	40		100
A50	A50	44,56	2,13	1,93	16		98,4
A51	A51	76,59	2,08	1,93	16		100
A52	A52	60,63	2,09	1,91	16		96,8
	B17	31,76	1,89	1,94	16		96,8
A53	A53	35	2,03	1,88	14		100
A54	A54	23,86	1,77	1,96	16		100
A55	A55	60,3	2,2	1,87	16		98,4
A56	A56	29,59	1,93	1,96	16		100
A57	A57	25,61	1,95	1,95	14		78,5
A58	A58	74,4	2,11	1,96	16		98,4
A59	A59	46	2	1,98	16		98,4
A60	A60	84,66	2,09	1,95	14		98,4
A61	A61	29,57	1,89	2	16		100
A62	A62	32,09	1,78	1,79	16		98,9
A63	A63	34,66	2,07	1,97	16		100
A64	A64	99,02	2,21	1,96	16		88,7

Oncogênese e Progressão do Melanoma
Análise Mutacional e Estudo Clínico Retrospectivo

Caso	Amostra	Conc. (ng/ μ L)	260/230	260/280	Vol. (μ L)	Precip.	Genotipagens (%)
A65	A65	93,75	2,23	1,9	16		74,2
A66	A66	32,38	2,04	1,9	16		100
A67	A67	21,31	1,95	1,95	16		67,7
A68	A68	62,25	2,18	1,95	14		93,5
A69	A69	37,78	1,76	1,86	16		79,6
A70	A70	51,8	2,01	1,93	14		100
A71	A71	78,84	2,22	2	16		100
A72	A72	41,55	1,97	1,98	14		100
A73	A73	32,64	2,14	1,98	6	√	100
	B18	81,63	2,2	1,95	40		98,4
A74	A74	25,38	1,67	1,9	49		96,1
A75	A75	41,7	2,17	1,73	6	√	100
A76	A76	59,38	2,1	2	16		98,4
	B19	47,74	1,65	1,99	40		85,2
	B23	3	0,68	1,7	16		—
A77	A77	44,25	2,2	1,96	16		100
A78	A78	77,77	2,25	1,95	16		100
A79	A79	50,52	2,04	1,96	16		96,8
A80	A80	67,35	2,22	1,96	16		100
A81	A81	46,36	2,15	1,84	6	√	82,3
	B20	47,18	2	1,86	6	√	100
	B24	0,24	0,51	1,96	16		—
	B25	0,45	0,63	1,65	16		—
	B26	27,03	1,9	1,89	6	√	29
C1	22,6	2,1	1,7	40		61,3	
A82	A82	1,98	2,03	2,05	6	√	—
A83	A83	9,93	1,86	1,9	5,5	√	—
A84	A84	1,85	1,16	1,88	16		—
A85	A85	2,54	1,48	1,87	16		—
A86	A86	1,14	0,84	1,83	16		—
A87	A87	3,32	1,89	1,76	16		—
A88	A88	0,73	0,31	1,33	16		—
A89	A89	3,43	1,27	1,83	16		—
A90	A90	4,76	1,62	1,91	16		—
A91	A91	2,65	1,23	1,86	16		—
A92	A92	3,67	1,63	1,95	16		—
A93	A93	4,09	1,14	1,97	16		—
A94	A94	0,43	0,16	1,09	16		—
A95	A95	3,41	1,64	1,92	16		—
A96	A96	3,66	1,69	1,93	16		—
A97	A97	1,77	1,64	1,83	16		—
A98	A98	3,95	1,63	1,87	16		—
A99	A99	3,48	1,66	1,95	16		—
A100	A100	0,89	1,43	16	2,12		—
	B27	40,9	1,7	1,8	16		56,5
A101	A101	20,89	2,09	1,94	6	√	25,8
A102	A102	23,88	2,08	1,98	6	√	19,4
A103	A103	49,55	1,76	1,95	16		51,6
A104	A104	28,1	2,05	1,89	6	√	35,5
A105	A105	33,62	2,19	1,85	6	√	32,3
A106	A106	18,65	1,75	1,84	6	√	38,7

Caso	Amostra	Conc. (ng/μL)	260/230	260/280	Vol. (μL)	Precip.	Genotipagens (%)
A107	A107	54,1	1,65	1,78	11	√	24,2

Tabela A2. Amostras de nevos melanocíticos dos doentes do grupo B. O sombreado vermelho corresponde a amostras excluídas por taxa de genotipagem inferior a 60%. O sombreado verde corresponde a amostras excluídas por impossibilidade de extrair DNA com concentração mínima de 15 ng/μL e/ou rácios de absorvância <1,6.

Caso	Amostra	Conc. (ng/μL)	260/230	260/280	Vol. (μL)	Precip.	Genotipagens (%)
B1	D1	22,84	1,86	1,92	16		100
B2	D2	35,35	1,98	1,92	6	√	100
B3	D3	25,24	2,43	1,92	6	√	100
B4	D4	20,89	1,8	1,94	58,5		97,8
B5	D5	30,96	2,09	1,9	16	√	93,5
B6	D6	24,77	1,89	1,95	16		74,2
B7	D7	44,69	1,99	1,96	16		93,5
B8	D8	21,64	1,85	1,95	16		100
B9	D9	32,15	2,12	1,94	5,5	√	100
B10	D10	30,58	1,91	1,88	6	√	64,5
B11	D11	C17	27,05	2,09	1,96		98,4
B12	D12	21,57	1,72	1,84	6	√	100
B13	D13	22,79	2	1,98	16		98,4
B14	D14	42,41	2,04	1,97	16		96,8
B15	D15	35,54	2,01	2	16		100
B16	D16	31,44	2,01	1,94	16		98,4
B17	D17	19,16	1,68	2	16		96,8
B18	D18	43,65	1,98	1,97	16		98,4
B19	D19	42,55	2	1,96	16		100
B20	D20	48,97	2	1,92	16		98,4
B21	D21	20,54	1,74	1,94	16		100
B22	D22	40,55	2,1	1,83	6	√	98,9
B23	D23	20,17	2,22	1,97	5,5	√	100
B24	D24	17,85	2,01	1,96	5,5	√	100
B25	D25	51,27	1,93	1,95	16		98,4
B26	D26	20,67	2,01	1,96	16		98,4
B27	D27	31,03	2,13	1,94	16		98,4
B28	D28	26	2,07	2,04	16		96,8
B29	D29	4,9	1,33	1,99	16		—
B30	D30	3,78	1,54	1,97	16		—
B31	D31	2,2	0,96	1,88	16		—
B32	D32	3,06	1,71	1,84	5,5	√	—
B33	D33	2,09	1,7	2,05	16		—
B34	D34	2,78	1,59	2,12	16		—
B35	D35	2,09	1,7	2,05	16		—
B36	D36	3,3	1,81	1,86	5,5	√	—
B37	D37	4,75	1,6	2,01	16		—
B38	D38	3,38	1,83	1,81	5,5	√	—
B39	D39	2,57	1,42	1,99	16		—
B40	D40	4,7	1,41	1,95	16		—

Oncogênese e Progressão do Melanoma
Análise Mutacional e Estudo Clínico Retrospectivo

Caso	Amostra	Conc. (ng/μL)	260/230	260/280	Vol. (μL)	Precip.	Genotipagens (%)
B41	D41	5,3	1,13	2	16		—
B42	D42	4,93	1,16	1,85	16		—
B43	D43	2,59	1,3	1,77	16		—
B44	D44	3,26	1,07	2,06	16		—
B45	D45	1,31	0,88	2,05	16		—
B46	D46	1,47	0,75	1,97	16		—
B47	D47	1,92	1,25	1,94	16		—
B48	D48	4,05	1,35	1,87	16		—
B49	D49	0,87	0,83	1,94	16		—
B50	D50	3,54	1,26	1,92	16		—
B51	D51	1,79	1,59	1,98	16		—
B52	D52	4,4	2,26	2	16		—
B53	D53	3,15	1,71	1,98	16		—
B54	D54	2,69	2,05	1,97	16		—
B55	D55	3,46	2,13	2	16		—
B56	D56	2,4	2,21	1,91	16		—
B57	D57	4,9	1,8	1,94	16		—
B58	D58	4,9	1,85	1,93	16		—
B59	D59	1,89	1,79	2,09	16		—
B60	D60	4,34	1,69	1,9	16		—
B61	D61	23,37	1,97	1,94	6	√	19,4
B62	D62	31,01	1,95	1,92	6	√	16,1
B63	D63	19,43	1,7	1,9	18		19,4
B64	D64	20,61	1,97	1,91	6	√	22,6
B65	D65	18,36	1,76	1,85	6	√	51,6
B66	D66	22,94	1,91	1,86	6	√	29

Anexo B

As tabelas seguintes (B1 a B152) foram extraídas do *software* IBM® SPSS® Statistics, versão 20, e correspondem aos testes estatísticos realizados.

Tabela B1. Amostras excluídas por extração de DNA em quantidade e/ou qualidade insuficientes (teste do χ^2).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	20,797 ^a	1	,000		
Continuity Correction ^b	19,297	1	,000		
Likelihood Ratio	20,040	1	,000		
Fisher's Exact Test				,000	,000
Linear-by-Linear Association	20,693	1	,000		
N of Valid Cases	201				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 18,39.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B2. Genotipagens bem sucedidas (teste exacto de Fisher).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2,554 ^a	1	,110		
Continuity Correction ^b	1,629	1	,202		
Likelihood Ratio	2,293	1	,130		
Fisher's Exact Test				,119	,104
Linear-by-Linear Association	2,536	1	,111		
N of Valid Cases	145				

a. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,52.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B3. Frequência alélica das mutações BAI3 D755N, MYO9A G2291V e TP63 M499I nas amostras dos grupos A e B (teste exacto de Fisher).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,277 ^a	1	,599		
Continuity Correction ^b	,000	1	1,000		
Likelihood Ratio	,487	1	,485		
Fisher's Exact Test				1,000	,785
Linear-by-Linear Association	,275	1	,600		
N of Valid Cases	130				

a. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,22.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B4. Frequência alélica das mutações DLEC1 D215N nas amostras dos grupos Ae B (teste exacto de Fisher).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1,049 ^a	1	,306		
Continuity Correction ^b	,220	1	,639		
Likelihood Ratio	,907	1	,341		
Fisher's Exact Test				,293	,293
Linear-by-Linear Association	1,041	1	,308		
N of Valid Cases	130				

a. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,08.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B5. Frequência de mutações BA13 D755N, MYO9A G2291V e TP63 M499I nas amostras dos grupos Ae B (teste exacto de Fisher).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,349 ^a	1	,555		
Continuity Correction ^b	,000	1	1,000		
Likelihood Ratio	,597	1	,440		
Fisher's Exact Test				1,000	,743
Linear-by-Linear Association	,346	1	,557		
N of Valid Cases	109				

a. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,26.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B6. Frequência de mutações DLEC1 D215N nas amostras dos grupos Ae B (teste exacto de Fisher).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,562 ^a	1	,453		
Continuity Correction ^b	,051	1	,821		
Likelihood Ratio	,514	1	,474		
Fisher's Exact Test				,601	,382
Linear-by-Linear Association	,557	1	,455		
N of Valid Cases	109				

a. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,28.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B7. Teste de normalidade da distribuição da idade no grupo A (teste de Kolmogorov-Smirnov).

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Idade
N		208
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	61,1731
	Std. Deviation	16,52779
Most Extreme Differences	Absolute	,115
	Positive	,045
	Negative	-,115
Kolmogorov-Smirnov Z		1,657
Asymp. Sig. (2-tailed)		,008
a. Test distribution is Normal.		
b. Calculated from data.		

Tabela B8. Teste de normalidade da distribuição da espessura do melanoma primário no grupo A (teste de Kolmogorov-Smirnov).

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Espessura
N		191
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	3,9565
	Std. Deviation	4,11872
Most Extreme Differences	Absolute	,183
	Positive	,183
	Negative	-,168
Kolmogorov-Smirnov Z		2,525
Asymp. Sig. (2-tailed)		,000
a. Test distribution is Normal.		
b. Calculated from data.		

Tabela B9. Idade de acordo com o sexo (teste de Mann-Whitney).

Hypothesis Test Summary				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Idade is the same across categories of Sexo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,524	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B10. Grupo etário de acordo com o sexo (teste de Mann-Whitney).

Hypothesis Test Summary				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Etário is the same across categories of Sexo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,405	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B11. Localização do melanoma de acordo com o sexo (teste de Monte Carlo).

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Chi-Square Tests					
				Sig.	Monte Carlo Sig. (2-sided)		Sig.	Monte Carlo Sig. (1-sided)	
					99% Confidence Interval			99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound
Pearson Chi-Square	30,402 ^a	4	,000	,000 ^b	,000	,000	,000		
Likelihood Ratio	30,260	4	,000	,000 ^b	,000	,000			
Fisher's Exact Test	29,790			,000 ^b	,000	,000			
Linear-by-Linear Association	6,744 ^c	1	,009	,010 ^b	,008	,013	,006 ^b	,004	,008
N of Valid Cases	208								

a. 2 cells (20,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,25.

b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 2000000.

c. The standardized statistic is -2,597.

Tabela B12. Espessura do tumor primário de acordo com o sexo (teste U de Mann-Whitney).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Espessura is the same across categories of Sexo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,024	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B13. Categoria T de acordo com o sexo (teste de Mann-Whitney).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of T is the same across categories of Sexo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,085	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Tabela B14. Ulceração do tumor primário de acordo com o sexo (teste do χ^2).

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,137 ^a	1	,712		
Continuity Correction ^b	,042	1	,837		
Likelihood Ratio	,136	1	,712		
Fisher's Exact Test				,744	,416
Linear-by-Linear Association	,136	1	,712		
N of Valid Cases	208				

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 19,88.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B15. Idade em função da localização do melanoma (teste de Kruskal-Wallis).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Idade is the same across categories of Localização.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,003	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B16. Comparações múltiplas da idade em função da localização do melanoma (teste de Bonferroni).

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
Tronco-Membro superior	-22,897	15,872	-1,443	,149	1,000
Tronco-Não classificado	-23,699	25,783	-,919	,358	1,000
Tronco-Membro inferior	-28,232	10,036	-2,813	,005	,049
Tronco-Cabeça e pescoço	49,965	13,210	3,782	,000	,002
Membro superior-Não classificado	-,803	28,177	-,028	,977	1,000
Membro superior-Membro inferior	-5,335	15,162	-,352	,725	1,000
Membro superior-Cabeça e pescoço	27,068	17,426	1,553	,120	1,000
Não classificado-Membro inferior	4,533	25,352	,179	,858	1,000
Não classificado-Cabeça e pescoço	26,266	26,768	,981	,326	1,000
Membro inferior-Cabeça e pescoço	21,733	12,349	1,760	,078	,784

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same.
Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is ,05.

Tabela B17. Localização do melanoma em função do grupo etário (teste de Kruskal-Wallis).

Hypothesis Test Summary

Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1 The distribution of Etário is the same across categories of Localização.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,042	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Tabela B18. Comparações múltiplas da localização do melanoma em função do grupo etário (teste de Bonferroni).

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
Tronco-Não classificado	-13,379	23,970	-,558	,577	1,000
Tronco-Membro inferior	-20,538	9,330	-2,201	,028	,277
Tronco-Membro superior	-23,764	14,756	-1,611	,107	1,000
Tronco-Cabeça e pescoço	36,212	12,281	2,949	,003	,032
Não classificado-Membro inferior	7,159	23,570	,304	,761	1,000
Não classificado-Membro superior	10,386	26,196	,396	,692	1,000
Não classificado-Cabeça e pescoço	22,833	24,886	,918	,359	1,000
Membro inferior-Membro superior	3,227	14,096	,229	,819	1,000
Membro inferior-Cabeça e pescoço	15,674	11,480	1,365	,172	1,000
Membro superior-Cabeça e pescoço	12,447	16,201	,768	,442	1,000

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same.
Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is ,05.

Tabela B19. Idade em função do tipo de melanoma (teste de Kruskal-Wallis).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Idade is the same across categories of Tipo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,001	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B20. Comparações múltiplas da idade em função do tipo de melanoma (teste de Bonferroni).

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
Outros-Melanoma crescimento superficial	1,450	13,249	,109	,913	1,000
Outros-Melanoma nodular	27,339	13,417	2,038	,042	,416
Outros-Melanoma acral	42,064	14,246	2,953	,003	,032
Outros-Lêntigo maligno	54,200	25,256	2,146	,032	,319
Melanoma crescimento superficial-Melanoma nodular	-25,889	10,687	-2,423	,015	,154
Melanoma crescimento superficial-Melanoma acral	-40,614	11,710	-3,468	,001	,005
Melanoma crescimento superficial-Lêntigo maligno	52,750	23,918	2,205	,027	,274
Melanoma nodular-Melanoma acral	14,724	11,901	1,237	,216	1,000
Melanoma nodular-Lêntigo maligno	26,861	24,011	1,119	,263	1,000
Melanoma acral-Lêntigo maligno	12,136	24,484	,496	,620	1,000

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same.
Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is .05.

Tabela B21. Tipo de melanoma de acordo com o grupo etário (teste de Mann-Whitney).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Etário is the same across categories of Tipo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,003	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B22. Comparações múltiplas do tipo de melanoma de acordo com o grupo etário (teste de Bonferroni).

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
Outros-Melanoma crescimento superficial	1,418	12,317	,115	,908	1,000
Outros-Melanoma nodular	24,168	12,474	1,937	,053	,527
Outros-Lêntigo maligno	35,981	23,480	1,532	,125	1,000
Outros-Melanoma acral	37,903	13,245	2,862	,004	,042
Melanoma crescimento superficial-Melanoma nodular	-22,750	9,935	-2,290	,022	,220
Melanoma crescimento superficial-Lêntigo maligno	34,563	22,236	1,554	,120	1,000
Melanoma crescimento superficial-Melanoma acral	-36,485	10,887	-3,351	,001	,008
Melanoma nodular-Lêntigo maligno	11,813	22,323	,529	,597	1,000
Melanoma nodular-Melanoma acral	13,735	11,064	1,241	,214	1,000
Lêntigo maligno-Melanoma acral	-1,922	22,762	-,084	,933	1,000

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same. Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is ,05.

Tabela B23. Espessura do melanoma de acordo com o grupo etário (correlação não linear de Spearman).

Correlations				
			Espessura	Etário
Spearman's rho	Espessura	Correlation Coefficient	1,000	,277**
		Sig. (2-tailed)	.	,000
		N	191	191
	Etário	Correlation Coefficient	,277**	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	.
		N	191	208

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tabela B24. Categoria T de acordo com o grupo etário (teste de Kruskal-Wallis).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of T is the same across categories of Etário.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,002	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Tabela 25. Espessura do melanoma em função da localização (teste de Kruskal-Wallis).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Espessura is the same across categories of Localização.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,716	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Tabela B26. Espessura do tumor primário em função do tipo de melanoma (teste de Kruskal-Wallis).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Espessura is the same across categories of Tipo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B27. Comparações múltiplas dos tipos de melanoma em relação à espessura (teste de Bonferroni).

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
Melanoma crescimento superficial-Lêntigo maligno	21,511	21,997	,978	,328	1,000
Melanoma crescimento superficial-Outros	-28,035	13,896	-2,018	,044	,436
Melanoma crescimento superficial-Melanoma acral	-33,976	11,225	-3,027	,002	,025
Melanoma crescimento superficial-Melanoma nodular	-76,364	9,929	-7,691	,000	,000
Lêntigo maligno-Outros	-6,524	24,115	-,271	,787	1,000
Lêntigo maligno-Melanoma acral	-12,465	22,681	-,550	,583	1,000
Lêntigo maligno-Melanoma nodular	-54,852	22,069	-2,485	,013	,129
Outros-Melanoma acral	5,941	14,956	,397	,691	1,000
Outros-Melanoma nodular	48,329	14,010	3,450	,001	,006
Melanoma acral-Melanoma nodular	-42,387	11,365	-3,730	,000	,002

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same. Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is .05.

Tabela B28. Ulceração do melanoma primário em função do grupo etário (teste de Mann-Whitney).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Etário is the same across categories of Ulceração.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05

Tabela B29. Ulceração do melanoma primário em função da localização (teste de Monte Carlo).

Chi-Square Tests									
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Monte Carlo Sig. (2-sided)			Monte Carlo Sig. (1-sided)		
				Sig.	99% Confidence Interval		Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound
Pearson Chi-Square	4,599 ^a	4	,331	,319 ^b	,307	,331			
Likelihood Ratio	4,975	4	,290	,330 ^b	,318	,342			
Fisher's Exact Test	4,650			,300 ^b	,288	,311			
Linear-by-Linear Association	1,070 ^c	1	,301	,325 ^b	,313	,337	,168 ^b	,158	,178
N of Valid Cases	208								

a. 3 cells (30,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,53.
b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 1110856691.
c. The standardized statistic is 1,034.

Tabela B30. Ulceração do melanoma primário em função do tipo (teste de Monte Carlo).

Chi-Square Tests									
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Monte Carlo Sig. (2-sided)			Monte Carlo Sig. (1-sided)		
				Sig.	99% Confidence Interval		Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound
Pearson Chi-Square	27,036 ^a	4	,000	,000 ^b	,000	,000			
Likelihood Ratio	28,709	4	,000	,000 ^b	,000	,000			
Fisher's Exact Test	27,434			,000 ^b	,000	,000			
Linear-by-Linear Association	3,607 ^c	1	,058	,060 ^b	,054	,066	,034 ^b	,029	,038
N of Valid Cases	208								

a. 1 cells (10,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,78.
b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 624387341.
c. The standardized statistic is 1,899.

Tabela B31. Espessura em função da ulceração do melanoma (teste de Mann-Whitney).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Espessura is the same across categories of Ulceração.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B32. Ulceração do melanoma de acordo com a categoria T (teste de Mann-Whitney).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of T is the same across categories of Ulceração.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B33. Tipo de melanoma por região anatómica (teste de Monte Carlo).

Chi-Square Tests									
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Monte Carlo Sig. (2-sided)			Monte Carlo Sig. (1-sided)		
				Sig.	99% Confidence Interval		Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound
Pearson Chi-Square	106,419 ^a	16	,000	,000 ^b	,000	,000			
Likelihood Ratio	108,752	16	,000	,000 ^b	,000	,000			
Fisher's Exact Test	94,739			,000 ^b	,000	,000			
Linear-by-Linear Association	,135 ^c	1	,713	,732 ^b	,720	,743	,372 ^b	,359	,384
N of Valid Cases	208								

a. 12 cells (48,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,20.
b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 1831435319.
c. The standardized statistic is ,368.

Tabela B34. Ocorrência de metástases satélites e/ou em trânsito em função do sexo (teste do χ^2).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2,299 ^a	1	,129		
Continuity Correction ^b	1,790	1	,181		
Likelihood Ratio	2,253	1	,133		
Fisher's Exact Test				,154	,091
Linear-by-Linear Association	2,288	1	,130		
N of Valid Cases	208				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 15,75.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B35. Ocorrência de metástases satélites e/ou em trânsito em função da idade (teste de Mann-Whitney).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Idade is the same across categories of Met.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,016	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B36. Ocorrência de metástases satélites e/ou em trânsito em função da espessura do melanoma (teste de Mann-Whitney).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Espessura is the same across categories of Met.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B37. Ocorrência de metástases satélites e/ou em trânsito em função da ulceração do melanoma (teste do χ^2).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	6,232 ^a	1	,013		
Continuity Correction ^b	5,282	1	,022		
Likelihood Ratio	5,804	1	,016		
Fisher's Exact Test				,017	,013
Linear-by-Linear Association	6,202	1	,013		
N of Valid Cases	208				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 10,70.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B38. Risco de ocorrência de metástases satélites e/ou em trânsito nos melanomas ulcerados (*odds ratio*).

	Risk Estimate		
	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Ulceração (Ausente / Presente)	2,456	1,197	5,036
For cohort Met = Não	1,235	1,014	1,504
For cohort Met = Sim	,503	,296	,855
N of Valid Cases	208		

Tabela B39. Ocorrência de metástases satélites e/ou em trânsito em função da localização do melanoma (teste de Monte Carlo).

	Chi-Square Tests								
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Monte Carlo Sig. (2-sided)			Monte Carlo Sig. (1-sided)		
				Sig.	99% Confidence Interval		Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound
Pearson Chi-Square	2,512 ^a	4	,643	,648 ^b	,636	,660			
Likelihood Ratio	3,696	4	,449	,514 ^b	,501	,527			
Fisher's Exact Test	2,025			,734 ^b	,723	,745			
Linear-by-Linear Association	,069 ^c	1	,793	,827 ^b	,817	,837	,427 ^b	,414	,439
N of Valid Cases	208								

a. 3 cells (30,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,21.
b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 2096426169.
c. The standardized statistic is ,263.

Tabela B40. Ocorrência de metástases satélites e/ou em trânsito em função do tipo do melanoma (teste de Monte Carlo).

	Chi-Square Tests								
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Monte Carlo Sig. (2-sided)			Monte Carlo Sig. (1-sided)		
				Sig.	99% Confidence Interval		Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound
Pearson Chi-Square	9,877 ^a	4	,043	,042 ^b	,037	,047			
Likelihood Ratio	10,753	4	,029	,033 ^b	,029	,038			
Fisher's Exact Test	8,646			,063 ^b	,057	,069			
Linear-by-Linear Association	3,744 ^c	1	,053	,055 ^b	,049	,061	,029 ^b	,024	,033
N of Valid Cases	208								

a. 1 cells (10,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,41.
b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 2129180967.
c. The standardized statistic is 1,935.

Tabela B41. Regressão logística das variáveis que influenciaram a metastização em trânsito.

		Variables in the Equation							
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
								Lower	Upper
Step 1 ^a	Idade	,012	,013	,958	1	,328	1,013	,988	1,038
	Espessura	,127	,048	6,977	1	,008	1,135	1,033	1,247
	Ulceração	,311	,460	,457	1	,499	1,365	,554	3,365
	Lentigo	-19,593	14714,159	,000	1	,999	,000	,000	.
	MCS	,240	,761	,099	1	,753	1,271	,286	5,648
	Acral	-,038	,817	,002	1	,963	,963	,194	4,773
	Nodular	,597	,725	,679	1	,410	1,817	,439	7,528
	Constant	-3,116	,971	10,290	1	,001	,044		

a. Variable(s) entered on step 1: Idade, Espessura, Ulceração, Lentigo, MCS, Acral, Nodular.

Hosmer and Lemeshow Test			
Step	Chi-square	df	Sig.
1	8,198	8	,414

Tabela B42. Ocorrência de metástases ganglionares regionais em função do sexo (teste do χ^2).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	8,341 ^a	1	,004		
Continuity Correction ^b	7,518	1	,006		
Likelihood Ratio	8,301	1	,004		
Fisher's Exact Test				,005	,003
Linear-by-Linear Association	8,301	1	,004		
N of Valid Cases	208				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 31,13.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B43. Risco de ocorrência de metástases ganglionares regionais no sexo masculino (*odds ratio*).

Risk Estimate			
	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Sexo (Feminino / Masculino)	2,322	1,304	4,133
For cohort Mgg = Não	1,427	1,098	1,855
For cohort Mgg = Sim	,615	,444	,852
N of Valid Cases	208		

Tabela B44. Ocorrência de metástases ganglionares regionais em função da idade (teste de Mann-Whitney).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Idade is the same across categories of Mgg.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,322	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B45. Ocorrência de metástases ganglionares regionais em função da espessura do melanoma (teste de Mann-Whitney).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Espessura is the same across categories of Mgg.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B46. Ocorrência de metástases ganglionares regionais em função da ulceração do melanoma (teste do χ^2).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	12,432 ^a	1	,000		
Continuity Correction ^b	11,312	1	,001		
Likelihood Ratio	12,254	1	,000		
Fisher's Exact Test				,001	,000
Linear-by-Linear Association	12,372	1	,000		
N of Valid Cases	208				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 21,15.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B47. Risco de ocorrência de metástases ganglionares regionais nos melanomas ulcerados (*odds ratio*).

Risk Estimate			
	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Ulceração (Ausente / Presente)	3,107	1,631	5,919
For cohort Mgg = Não	1,693	1,193	2,403
For cohort Mgg = Sim	,545	,398	,745
N of Valid Cases	208		

Tabela B48. Ocorrência de metástases ganglionares regionais em função da localização do melanoma (teste de Monte Carlo).

Chi-Square Tests									
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Monte Carlo Sig. (2-sided)			Monte Carlo Sig. (1-sided)		
				Sig.	99% Confidence Interval		Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound
Pearson Chi-Square	3,012 ^a	4	,556	,561 ^b	,548	,574			
Likelihood Ratio	3,080	4	,544	,556 ^b	,543	,569			
Fisher's Exact Test	3,138			,535 ^b	,522	,548			
Linear-by-Linear Association	,289 ^c	1	,591	,605 ^b	,593	,618	,323 ^b	,311	,335
N of Valid Cases	208								

a. 2 cells (20,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,39.
b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 1039640005.
c. The standardized statistic is ,538.

Tabela B49. Ocorrência de metástases ganglionares regionais em função do tipo de melanoma (teste de Monte Carlo).

Chi-Square Tests									
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Monte Carlo Sig. (2-sided)			Monte Carlo Sig. (1-sided)		
				Sig.	99% Confidence Interval		Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound
Pearson Chi-Square	31,177 ^a	4	,000	,000 ^b	,000	,000			
Likelihood Ratio	34,392	4	,000	,000 ^b	,000	,000			
Fisher's Exact Test	31,656			,000 ^b	,000	,000			
Linear-by-Linear Association	22,027 ^c	1	,000	,000 ^b	,000	,000	,000 ^b	,000	,000
N of Valid Cases	208								

a. 2 cells (20,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,79.
b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 1810951851.
c. The standardized statistic is 4,693.

Tabela B50. Regressão logística das variáveis que influenciaram a metastização ganglionar.

		Variables in the Equation							
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
								Lower	Upper
Step 1 ^a	Idade	-,011	,012	,932	1	,334	,989	,967	1,012
	Espessura	,204	,063	10,653	1	,001	1,227	1,085	1,387
	Ulceração	,563	,434	1,682	1	,195	1,757	,750	4,116
	Lentigo	-20,968	13899,148	,000	1	,999	,000	,000	.
	MCS	-,720	,610	1,392	1	,238	,487	,147	1,610
	Acral	-,236	,635	,138	1	,710	,790	,227	2,743
	Nodular	,382	,596	,411	1	,522	1,466	,455	4,716
	Sexo	,829	,367	5,095	1	,024	2,292	1,115	4,708
	Constant	-,903	,784	1,327	1	,249	,405		

a. Variable(s) entered on step 1: Idade, Espessura, Ulceração, Lentigo, MCS, Acral, Nodular, Sexo.

Hosmer and Lemeshow Test			
Step	Chi-square	df	Sig.
1	11,607	8	,170

Tabela B51. Ocorrência de metástases distantes em função do sexo (teste do χ^2).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	6,445 ^a	1	,011		
Continuity Correction ^b	5,688	1	,017		
Likelihood Ratio	6,354	1	,012		
Fisher's Exact Test				,014	,009
Linear-by-Linear Association	6,414	1	,011		
N of Valid Cases	208				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 24,75.

b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B52. Risco de ocorrência de metástases distantes no sexo masculino (*odds ratio*).

	Risk Estimate		
	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Sexo (Feminino / Masculino)	2,156	1,185	3,920
For cohort Md = Não	1,293	1,043	1,603
For cohort Md = Sim	,600	,405	,888
N of Valid Cases	208		

Tabela B53. Ocorrência de metástases distantes em função da idade (teste de Mann-Whitney).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Idade is the same across categories of Md.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,656	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B54. Ocorrência de metástases distantes em função da espessura do melanoma (teste de Mann-Whitney).

Hypothesis Test Summary				
	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Espessura is the same across categories of Md.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B55. Ocorrência de metástases distantes em função da ulceração do melanoma (teste do χ^2).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	12,119 ^a	1	,000		
Continuity Correction ^b	10,958	1	,001		
Likelihood Ratio	11,601	1	,001		
Fisher's Exact Test				,001	,001
Linear-by-Linear Association	12,061	1	,001		
N of Valid Cases	208				

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 16,82.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B56. Risco de ocorrência de metástases distantes nos melanomas ulcerados (*odds ratio*).

Risk Estimate			
	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Ulceração (Ausente / Presente)	3,089	1,614	5,913
For cohort Md = Não	1,526	1,143	2,037
For cohort Md = Sim	,494	,338	,721
N of Valid Cases	208		

Tabela B57. Ocorrência de metástases distantes em função da localização do melanoma (teste de Monte Carlo).

Chi-Square Tests									
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Monte Carlo Sig. (2-sided)			Monte Carlo Sig. (1-sided)		
				Sig.	99% Confidence Interval		Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound
Pearson Chi-Square	4,249 ^a	4	,373	,388 ^b	,375	,400			
Likelihood Ratio	3,969	4	,410	,450 ^b	,437	,462			
Fisher's Exact Test	4,023			,407 ^b	,394	,419			
Linear-by-Linear Association	,554 ^c	1	,457	,460 ^b	,447	,473	,248 ^b	,237	,259
N of Valid Cases	208								

a. 2 cells (20,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,90.
b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 795555105.
c. The standardized statistic is ,744.

Tabela B58. Ocorrência de metástases distantes em função do tipo de melanoma (teste de Monte Carlo).

	Chi-Square Tests								
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Monte Carlo Sig. (2-sided)			Monte Carlo Sig. (1-sided)		
				Sig.	99% Confidence Interval		Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound
Pearson Chi-Square	22,164 ^a	4	,000	,000 ^b	,000	,000			
Likelihood Ratio	24,769	4	,000	,000 ^b	,000	,000			
Fisher's Exact Test	22,275			,000 ^b	,000	,000			
Linear-by-Linear Association	18,733 ^c	1	,000	,000 ^b	,000	,000	,000 ^b	,000	,000
N of Valid Cases	208								

a. 2 cells (20,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,22.
 b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 1291153757.
 c. The standardized statistic is 4,328.

Tabela B59. Regressão logística das variáveis que influenciaram a metastização à distância.

		Variables in the Equation							
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
								Lower	Upper
Step 1 ^a	Idade	-,014	,012	1,466	1	,226	,986	,964	1,009
	Espessura	,121	,050	5,872	1	,015	1,129	1,023	1,245
	Ulceração	,872	,433	4,047	1	,044	2,392	1,023	5,594
	Lentigo	-20,129	14429,915	,000	1	,999	,000	,000	.
	MCS	-,636	,649	,961	1	,327	,530	,149	1,888
	Acral	-,410	,685	,358	1	,549	,664	,173	2,540
	Nodular	,331	,613	,292	1	,589	1,393	,419	4,628
	Sexo	,712	,376	3,589	1	,058	2,038	,976	4,256
	Constant	-,983	,792	1,541	1	,214	,374		

a. Variable(s) entered on step 1: Idade, Espessura, Ulceração, Lentigo, MCS, Acral, Nodular, Sexo.

Hosmer and Lemeshow Test			
Step	Chi-square	df	Sig.
1	7,152	8	,520

Tabela B60. Morte por melanoma em função do sexo (teste do χ^2).

Chi-Square Tests				
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	6,163 ^a	1	,013	
Continuity Correction ^b	5,417	1	,020	
Likelihood Ratio	6,070	1	,014	
Fisher's Exact Test				,020
Linear-by-Linear Association	6,133	1	,013	
N of Valid Cases	208			

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 24,00.
 b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B61. Risco de morte por melanoma no sexo masculino (*odds ratio*).

	Risk Estimate		
	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Sexo (Feminino / Masculino)	2,130	1,166	3,891
For cohort Morte = Não	1,278	1,037	1,576
For cohort Morte = Sim	,600	,402	,897
N of Valid Cases	208		

Tabela B62. Morte por melanoma em função da idade (teste de Mann-Whitney).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Idade is the same across categories of Morte.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,228	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B63. Morte por melanoma em função da espessura do tumor primário (teste de Mann-Whitney).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Espessura is the same across categories of Morte.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B64. Morte por melanoma em função da ulceração do tumor primário (teste do χ^2).

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	11,166 ^a	1	,001		
Continuity Correction ^b	10,044	1	,002		
Likelihood Ratio	10,661	1	,001		
Fisher's Exact Test				,002	,001
Linear-by-Linear Association	11,112	1	,001		
N of Valid Cases	208				

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 16,31.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B65. Risco de morte por melanoma nos melanomas ulcerados (*odds ratio*).

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Ulceração (Ausente / Presente)	2,965	1,546	5,686
For cohort Morte = Não	1,482	1,121	1,959
For cohort Morte = Sim	,500	,339	,738
N of Valid Cases	208		

Tabela B66. Morte por melanoma em função da localização do tumor primário (teste de Monte Carlo).

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Monte Carlo Sig. (2-sided)			Monte Carlo Sig. (1-sided)		
				Sig.	99% Confidence Interval		Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound
Pearson Chi-Square	5,182 ^a	4	,269	,267 ^b	,255	,278			
Likelihood Ratio	4,889	4	,299	,342 ^b	,329	,354			
Fisher's Exact Test	4,916			,284 ^b	,272	,295			
Linear-by-Linear Association	,727 ^c	1	,394	,416 ^b	,404	,429	,211 ^b	,201	,222
N of Valid Cases	208								

a. 2 cells (20,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,85.
b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 1201225993.
c. The standardized statistic is ,853.

Tabela B67. Morte por melanoma em função do tipo do tumor primário (teste de Monte Carlo).

Chi-Square Tests									
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Monte Carlo Sig. (2-sided)			Monte Carlo Sig. (1-sided)		
				Sig.	99% Confidence Interval		Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound
Pearson Chi-Square	18,781 ^a	4	,001	,001 ^b	,000	,002			
Likelihood Ratio	20,938	4	,000	,001 ^b	,000	,001			
Fisher's Exact Test	18,532			,001 ^b	,000	,002			
Linear-by-Linear Association	15,113 ^c	1	,000	,000 ^b	,000	,001	,000 ^b	,000	,000
N of Valid Cases	208								

a. 2 cells (20,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,15.
 b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 1156607048.
 c. The standardized statistic is 3,888.

Tabela B68. Regressão logística das variáveis que influenciaram a morte por melanoma.

Variables in the Equation									
	B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)		
							Lower	Upper	
Step 1 ^a	Idade	,002	,011	,021	1	,884	1,002	,980	1,024
	Espessura	,138	,050	7,542	1	,006	1,148	1,040	1,267
	Ulceração	,454	,423	1,152	1	,283	1,574	,687	3,606
	Lentigo	-20,663	14476,778	,000	1	,999	,000	,000	.
	MCS	-,748	,614	1,486	1	,223	,473	,142	1,576
	Acral	-,785	,660	1,414	1	,234	,456	,125	1,664
	Nodular	,066	,585	,013	1	,910	1,069	,340	3,363
	Sexo	,449	,367	1,493	1	,222	1,567	,762	3,219
	Constant	-1,500	,783	3,671	1	,055	,223		

a. Variable(s) entered on step 1: Idade, Espessura, Ulceração, Lentigo, MCS, Acral, Nodular, Sexo.

Hosmer and Lemeshow Test			
Step	Chi-square	df	Sig.
1	11,510	8	,174

Tabela B69. Morte por melanoma em função da presença de metástases em trânsito (teste do χ^2).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	27,753 ^a	1	,000		
Continuity Correction ^b	25,816	1	,000		
Likelihood Ratio	25,885	1	,000		
Fisher's Exact Test				,000	,000
Linear-by-Linear Association	27,619	1	,000		
N of Valid Cases	208				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 12,92.
 b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B70. Risco de morte por melanoma em função da presença de metástases em trânsito (*odds ratio*).

Risk Estimate			
	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Met (Não / Sim)	6,276	3,026	13,014
For cohort Morte = Não	2,176	1,438	3,291
For cohort Morte = Sim	,347	,241	,498
N of Valid Cases	208		

Tabela B71. Morte por melanoma em função da presença de metástases ganglionares regionais (teste do χ^2).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	56,315 ^a	1	,000		
Continuity Correction ^b	54,037	1	,000		
Likelihood Ratio	57,548	1	,000		
Fisher's Exact Test				,000	,000
Linear-by-Linear Association	56,045	1	,000		
N of Valid Cases	208				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 25,54.
b. Computed only for a 2x2 table

TabelaB72. Risco de morte por melanoma em função da presença de metástases ganglionares regionais (*odds ratio*).

Risk Estimate			
	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Mgg (Não / Sim)	12,013	5,914	24,402
For cohort Morte = Não	2,233	1,702	2,932
For cohort Morte = Sim	,186	,110	,314
N of Valid Cases	208		

Tabela B73. Morte por melanoma em função da presença de metástases à distância (teste do χ^2).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	164,145 ^a	1	,000		
Continuity Correction ^b	160,036	1	,000		
Likelihood Ratio	180,118	1	,000		
Fisher's Exact Test				,000	,000
Linear-by-Linear Association	163,356	1	,000		
N of Valid Cases	208				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 20,31.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B74. Risco de morte por melanoma em função da presença de metástases à distância (*odds ratio*).

Risk Estimate			
	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Md (Não / Sim)	345,000	93,934	1267,110
For cohort Morte = Não	10,690	4,982	22,937
For cohort Morte = Sim	,031	,012	,082
N of Valid Cases	208		

Tabela B75. Comparação das curvas de sobrevivência global de ambos os sexos (teste *log-rank* de Mantel-Cox).

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	8,547	1	,003
Test of equality of survival distributions for the different levels of Sexo.			

Tabela B76. Comparação das curvas de sobrevivência global por grupo etário (teste *log-rank* de Mantel-Cox).

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	2,933	3	,402
Test of equality of survival distributions for the different levels of Etário.			

Tabela B77. Comparação das curvas de sobrevivência global em função da categoria T (teste *log-rank* de Mantel-Cox).

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	55,842	4	,000
Test of equality of survival distributions for the different levels of T.			

Tabela B78. Comparação das curvas de sobrevivência global em função da ulceração do melanoma (teste *log-rank* de Mantel-Cox).

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	13,459	1	,000
Test of equality of survival distributions for the different levels of Ulceração.			

Tabela B79. Comparação das curvas de sobrevivência global em função da localização do melanoma (teste *log-rank* de Mantel-Cox).

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	8,550	4	,073
Test of equality of survival distributions for the different levels of Localização.			

Tabela B80. Comparação das curvas de sobrevivência em função do tipo de melanoma (teste *log-rank* de Mantel-Cox).

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	22,806	4	,000
Test of equality of survival distributions for the different levels of Tipo.			

Tabela B81. Comparação das curvas de sobrevivência global em função da presença de metástases satélites e/ou em trânsito (teste *log-rank* de Mantel-Cox).

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	20,887	1	,000
Test of equality of survival distributions for the different levels of Metástases em trânsito.			

Tabela B82. Comparação das curvas de sobrevivência global em função da presença de metástases ganglionares regionais (teste *log-rank* de Mantel-Cox).

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	57,831	1	,000
Test of equality of survival distributions for the different levels of Metástases ganglionares regionais.			

Tabela B83. Comparação das curvas de sobrevivência global em função da presença de metástases à distância (teste *log-rank* de Mantel-Cox).

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	161,810	1	,000
Test of equality of survival distributions for the different levels of Metástases distantes.			

Tabela B84. Regressão de Cox das variáveis que influenciaram as curvas de sobrevivência.

	Variables in the Equation							
	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0% CI for Exp(B)	
							Lower	Upper
Sexo	,258	,289	,796	1	,372	1,294	,734	2,281
T	,891	,199	20,094	1	,000	2,438	1,651	3,600
Ulceração	,242	,299	,655	1	,418	1,273	,709	2,287
Lentigo	-12,038	333,151	,001	1	,971	,000	,000	2,240E+278
MCS	-,493	,526	,879	1	,349	,611	,218	1,713
Acral	-,662	,520	1,620	1	,203	,516	,186	1,430
Nodular	-,377	,446	,716	1	,397	,686	,286	1,643

Tabela B85. Positividade do gânglio sentinela em função do sexo (teste do χ^2).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	9,010 ^a	1	,003		
Continuity Correction ^b	7,739	1	,005		
Likelihood Ratio	8,666	1	,003		
Fisher's Exact Test				,004	,003
Linear-by-Linear Association	8,943	1	,003		
N of Valid Cases	134				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 10,17.

b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B86. Risco do sexo masculino ter gânglio sentinela positivo (*odds ratio*).

	Risk Estimate		
	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Sexo2 (Feminino / Masculino)	3,542	1,511	8,300
For cohort Gânglio sentinela = Negativo	1,351	1,072	1,702
For cohort Gânglio sentinela = Positivo	,381	,199	,729
N of Valid Cases	134		

Tabela B87. Teste de normalidade da distribuição da idade no grupo de doentes submetidos a biopsia do gânglio sentinela (teste de Kolmogorov-Smirnov).

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Idade
N		134
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	59,0149
	Std. Deviation	14,46228
Most Extreme Differences	Absolute	,123
	Positive	,051
	Negative	-,123
Kolmogorov-Smirnov Z		1,426
Asymp. Sig. (2-tailed)		,034
a. Test distribution is Normal.		
b. Calculated from data.		

Tabela B88. Idade em função do resultado da biopsia do gânglio sentinela (teste de Mann-Whitney).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Idade is the same across categories of GS.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,873	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B89. Teste de normalidade da distribuição da espessura do melanoma no grupo de doentes submetidos a biopsia do gânglio sentinela (teste de Kolmogorov-Smirnov).

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Espessura
N		127
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	3,5031
	Std. Deviation	3,75916
Most Extreme Differences	Absolute	,219
	Positive	,219
	Negative	-,197
Kolmogorov-Smirnov Z		2,472
Asymp. Sig. (2-tailed)		,000
a. Test distribution is Normal.		
b. Calculated from data.		

Tabela B90. Espessura do melanoma em função do resultado da biopsia do gânglio sentinela.

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Espessura is the same across categories of GS.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B91. Positividade do gânglio sentinela em função da categoria T (teste de Mann-Whitney).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of T is the same across categories of Gânglio sentinela.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,000	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Tabela B92. Positividade do gânglio sentinela em função da ulceração do melanoma (teste do χ^2).

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	3,679 ^a	1	,055		
Continuity Correction ^b	2,799	1	,094		
Likelihood Ratio	3,441	1	,064		
Fisher's Exact Test				,084	,050
Linear-by-Linear Association	3,651	1	,056		
N of Valid Cases	131				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 7,08.

b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B93. Positividade do gânglio sentinela em função da localização do melanoma (teste de Monte Carlo).

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Monte Carlo Sig. (2-sided)			Monte Carlo Sig. (1-sided)		
				Sig.	99% Confidence Interval		Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound
Pearson Chi-Square	3,991 ^a	4	,407	,379 ^b	,366	,391			
Likelihood Ratio	3,958	4	,412	,436 ^b	,423	,448			
Fisher's Exact Test	3,928			,384 ^b	,372	,397			
Linear-by-Linear Association	,059 ^c	1	,808	,856 ^b	,847	,865	,441 ^b	,429	,454
N of Valid Cases	134								

a. 4 cells (40,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,43.

b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 957002199.

c. The standardized statistic is -,243.

Tabela B94. Positividade do gânglio sentinela em função do tipo de melanoma (teste de Monte Carlo).

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Monte Carlo Sig. (2-sided)			Monte Carlo Sig. (1-sided)		
				Sig.	99% Confidence Interval		Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound
Pearson Chi-Square	8,797 ^a	4	,066	,062 ^b	,056	,069			
Likelihood Ratio	8,622	4	,071	,074 ^b	,068	,081			
Fisher's Exact Test	8,463			,062 ^b	,056	,069			
Linear-by-Linear Association	5,057 ^c	1	,025	,025 ^b	,021	,029	,015 ^b	,012	,018
N of Valid Cases	134								

a. 3 cells (30,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,22.

b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 92208573.

c. The standardized statistic is 2,249.

Tabela B95. Regressão logística das variáveis que se relacionaram com a positividade do gânglio sentinela.

		Variables in the Equation						95% C.I. for EXP(B)	
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Lower	Upper
Step 1 ^a	Sexo	1,478	,512	8,321	1	,004	4,385	1,606	11,971
	T	1,208	,293	17,051	1	,000	3,347	1,887	5,940
	Constant	-5,530	1,038	28,373	1	,000	,004		

a. Variable(s) entered on step 1: Sexo, T.

Hosmer and Lemeshow Test			
Step	Chi-square	df	Sig.
1	4,050	5	,542

Tabela B96. Metástases em trânsito de acordo com o resultado da biopsia do gânglio sentinela (teste exacto de Fisher).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	12,482 ^a	1	,000		
Continuity Correction ^b	10,562	1	,001		
Likelihood Ratio	10,737	1	,001		
Fisher's Exact Test				,001	,001
Linear-by-Linear Association	12,389	1	,000		
N of Valid Cases	134				

a. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,76.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B97. Risco de metástases em trânsito nos doentes com gânglio sentinela positivo (*odds ratio*).

	Risk Estimate		
	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for GS (Negativo / Positivo)	5,222	1,968	13,860
For cohort Met = Não	1,442	1,077	1,931
For cohort Met = Sim	,276	,133	,572
N of Valid Cases	134		

Tabela B98. Metástases distantes de acordo com o resultado da biopsia do gânglio sentinela (teste do χ^2).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	17,012 ^a	1	,000		
Continuity Correction ^b	15,022	1	,000		
Likelihood Ratio	15,160	1	,000		
Fisher's Exact Test				,000	,000
Linear-by-Linear Association	16,885	1	,000		
N of Valid Cases	134				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6,71.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B99. Risco de metástases distantes nos doentes com gânglio sentinela positivo (*odds ratio*).

	Risk Estimate		
	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for GS (Negativo / Positivo)	5,960	2,418	14,689
For cohort Md = Não	1,756	1,194	2,581
For cohort Md = Sim	,295	,166	,522
N of Valid Cases	134		

Tabela B100. Morte por melanoma de acordo com o resultado da biopsia do gânglio sentinela (teste do χ^2).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	21,363 ^a	1	,000		
Continuity Correction ^b	19,125	1	,000		
Likelihood Ratio	18,944	1	,000		
Fisher's Exact Test				,000	,000
Linear-by-Linear Association	21,203	1	,000		
N of Valid Cases	134				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6,71.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B101. Risco de morte por melanoma nos doentes com gânglio sentinela positivo (*odds ratio*).

	Risk Estimate		
	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for GS (Negativo / Positivo)	7,385	2,962	18,409
For cohort Morte = Não	1,912	1,267	2,885
For cohort Morte = Sim	,259	,146	,459
N of Valid Cases	134		

Tabela B102. Comparação das curvas de sobrevivência livre de doença em função do resultado da biopsia do gânglio sentinela (teste *log-rank* de Mantel-Cox).

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	119,435	1	,000

Test of equality of survival distributions for the different levels of Gânglio sentinela.

Tabela B103. Comparação das curvas de sobrevivência global em função do resultado da biopsia do gânglio sentinela (teste *log-rank* de Mantel-Cox).

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	33,616	1	,000

Test of equality of survival distributions for the different levels of Gânglio sentinela.

Tabela B104. Sobrevivência global aos 30 meses em função do resultado da biopsia do gânglio sentinela (teste exacto de Fisher).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	40,507 ^a	1	,000		
Continuity Correction ^b	36,983	1	,000		
Likelihood Ratio	33,783	1	,000		
Fisher's Exact Test				,000	,000
Linear-by-Linear Association	40,204	1	,000		
N of Valid Cases	134				

a. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,76.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B105. Risco de morte aos 30 meses nos doentes com gânglio sentinela positivo (*odds ratio*).

	Risk Estimate		
	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Morte aos 30 meses (Não / Sim)	31,350	10,179	96,554
For cohort GS = Negativo	3,784	1,879	7,622
For cohort GS = Positivo	,121	,064	,227
N of Valid Cases	134		

Tabela B106. Sobrevivência global aos 60 meses em função do resultado da biopsia do gânglio sentinela (teste do χ^2).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	31,498 ^a	1	,000		
Continuity Correction ^b	28,851	1	,000		
Likelihood Ratio	28,307	1	,000		
Fisher's Exact Test				,000	,000
Linear-by-Linear Association	31,263	1	,000		
N of Valid Cases	134				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 7,36.

Tabela B107. Risco de morte aos 60 meses nos doentes com gânglio sentinela positivo (*odds ratio*).

	Risk Estimate		
	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Morte aos 60 meses (Não / Sim)	11,400	4,450	29,207
For cohort GS = Negativo	2,040	1,390	2,995
For cohort GS = Positivo	,179	,093	,346
N of Valid Cases	134		

Tabela B108. Positividade do gânglio sentinela em função da espessura do melanoma (inferior ou igual a 4 mm versus superior a 4 mm) (teste do χ^2).

	Chi-Square Tests				
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	24,380 ^a	1	,000		
Continuity Correction ^b	21,999	1	,000		
Likelihood Ratio	21,986	1	,000		
Fisher's Exact Test				,000	,000
Linear-by-Linear Association	24,188	1	,000		
N of Valid Cases	127				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 7,02.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B109. Risco de ter uma biopsia de gânglio sentinela positivo nos doentes com melanoma de espessura superior a 4 mm (*odds ratio*).

	Risk Estimate		
	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Espessura (<=4,0 mm / >4,0 mm)	8,925	3,464	22,998
For cohort Gânglio sentinela = Negativo	1,843	1,288	2,638
For cohort Gânglio sentinela = Positivo	,207	,105	,405
N of Valid Cases	127		

Tabela B110. Metástases em trânsito de acordo com o resultado da biopsia do gânglio sentinela em melanomas >4,0 mm (teste do χ^2).

	Chi-Square Tests				
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,036 ^a	1	,849		
Continuity Correction ^b	,000	1	1,000		
Likelihood Ratio	,036	1	,849		
Fisher's Exact Test				1,000	,563
Linear-by-Linear Association	,035	1	,851		
N of Valid Cases	33				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 7,27.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B111. Metástases distantes de acordo com o resultado da biopsia do gânglio sentinela em melanomas >4,0 mm (teste do χ^2).

	Chi-Square Tests				
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	1,588 ^a	1	,208		
Continuity Correction ^b	,824	1	,364		
Likelihood Ratio	1,604	1	,205		
Fisher's Exact Test				,296	,182
Linear-by-Linear Association	1,540	1	,215		
N of Valid Cases	33				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6,79.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B112. Morte por melanoma de acordo com o resultado da biopsia do gânglio sentinela em melanomas >4,0 mm (teste do χ^2).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2,528 ^a	1	,112		
Continuity Correction ^b	1,538	1	,215		
Likelihood Ratio	2,565	1	,109		
Fisher's Exact Test				,166	,107
Linear-by-Linear Association	2,451	1	,117		
N of Valid Cases	33				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 7,27.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B113. Comparação das curvas de sobrevivência livre de doença em função do resultado da biopsia do gânglio sentinela em melanomas >4,0 mm (teste *log-rank* de Mantel-Cox).

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	11,978	1	,001
Test of equality of survival distributions for the different levels of Gânglio sentinela.			

Tabela B114. Comparação das curvas de sobrevivência global em função do resultado da biopsia do gânglio sentinela em melanomas >4,0 mm (teste *log-rank* de Mantel-Cox).

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1,690	1	,194
Test of equality of survival distributions for the different levels of Gânglio sentinela.			

Tabela B115. Sobrevivência global aos 30 meses em função do resultado da biopsia do gânglio sentinela nos melanomas com espessura >4 mm (teste do χ^2).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	7,127 ^a	1	,008		
Continuity Correction ^b	5,369	1	,020		
Likelihood Ratio	7,470	1	,006		
Fisher's Exact Test				,013	,009
Linear-by-Linear Association	6,911	1	,009		
N of Valid Cases	33				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6,79.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B116. Risco de morte aos 30 meses nos doentes com melanoma de espessura >4,0 mm e gânglio sentinela positivo (*odds ratio*).

	Risk Estimate		
	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Morte aos 30 meses (Não / Sim)	7,944	1,601	39,416
For cohort GS = Negativo	3,193	1,119	9,111
For cohort GS = Positivo	,402	,196	,823
N of Valid Cases	33		

Tabela B117. Sobrevivência global aos 60 meses em função do resultado da biópsia do gânglio sentinela nos melanomas com espessura >4 mm (teste do χ^2).

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,750 ^a	1	,387		
Continuity Correction ^b	,268	1	,605		
Likelihood Ratio	,753	1	,386		
Fisher's Exact Test				,494	,303
Linear-by-Linear Association	,727	1	,394		
N of Valid Cases	33				

a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 7,76.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B118. Progressão da doença loco-regional para doença à distância em função do sexo.

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,192 ^a	1	,661		
Continuity Correction ^b	,048	1	,827		
Likelihood Ratio	,192	1	,661		
Fisher's Exact Test				,827	,413
Linear-by-Linear Association	,190	1	,663		
N of Valid Cases	88				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 17,00.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B119. Teste de normalidade da distribuição da idade nos doentes com doença loco-regional (teste de Kolmogorov-Smirnov).

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Idade
N		88
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	63,3636
	Std. Deviation	16,53918
Most Extreme Differences	Absolute	,154
	Positive	,066
	Negative	-,154
Kolmogorov-Smirnov Z		1,447
Asymp. Sig. (2-tailed)		,030

a. Test distribution is Normal.
b. Calculated from data.

Tabela B120. Progressão da doença loco-regional para doença à distância em função da idade.

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Idade is the same across categories of Progressão.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,069	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B121. Teste de normalidade da distribuição da idade nos doentes com doença loco-regional (teste de Kolmogorov-Smirnov).

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Espessura
N		76
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	6,2230
	Std. Deviation	4,67747
Most Extreme Differences	Absolute	,190
	Positive	,190
	Negative	-,132
Kolmogorov-Smirnov Z		1,657
Asymp. Sig. (2-tailed)		,008
a. Test distribution is Normal.		
b. Calculated from data.		

Tabela B122. Progressão da doença loco-regional para doença à distância em função da espessura do melanoma.

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Espessura is the same across categories of Progressão.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,223	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B123. Progressão da doença loco-regional para doença à distância em função da ulceração do melanoma.

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,222 ^a	1	,638		
Continuity Correction ^b	,058	1	,809		
Likelihood Ratio	,222	1	,637		
Fisher's Exact Test				,654	,406
Linear-by-Linear Association	,219	1	,640		
N of Valid Cases	80				
a. 0 cells (0,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 14,02.					
b. Computed only for a 2x2 table					

Tabela B124. Progressão da doença loco-regional para doença à distância em função do tipo de melanoma.

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	5,232 ^a	3	,156
Likelihood Ratio	5,259	3	,154
Linear-by-Linear Association	4,570	1	,033
N of Valid Cases	88		
a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,02.			

Tabela B125. Progressão da doença loco-regional para doença à distância em função da localização do melanoma.

Chi-Square Tests									
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Monte Carlo Sig. (2-sided)			Monte Carlo Sig. (1-sided)		
				Sig.	99% Confidence Interval		Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound
Pearson Chi-Square	3,499 ^a	4	,478	,491 ^b	,478	,503			
Likelihood Ratio	4,562	4	,335	,405 ^b	,392	,417			
Fisher's Exact Test	3,003			,575 ^b	,562	,587			
Linear-by-Linear Association	,082 ^c	1	,775	,789 ^b	,778	,799	,429 ^b	,416	,442
N of Valid Cases	88								

a. 5 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,16.
b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 92208573.
c. The standardized statistic is -,286.

Tabela B126. Morte por melanoma em função da progressão da doença loco-regional para doença à distância.

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	51,337 ^a	1	,000		
Continuity Correction ^b	48,196	1	,000		
Likelihood Ratio	56,764	1	,000		
Fisher's Exact Test				,000	,000
Linear-by-Linear Association	50,754	1	,000		
N of Valid Cases	88				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 13,91.
b. Computed only for a 2x2 table

Tabela B127. Risco de morte por melanoma em função da progressão da doença loco-regional para doença à distância.

Risk Estimate			
	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for Morte (Não / Sim)	60,000	15,634	230,262
For cohort Progressão = Não	10,833	4,178	28,090
For cohort Progressão = Sim	,181	,087	,376
N of Valid Cases	88		

Tabela B128. Regressão logística das variáveis que influenciaram a progressão da doença loco-regional.

Variables in the Equation									
		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I. for EXP(B)	
								Lower	Upper
Step 1 ^a	Idade	-,045	,023	3,787	1	,052	,956	,914	1,000
	Morte	4,414	,782	31,875	1	,000	82,567	17,839	382,152
	Constant	1,106	1,391	,632	1	,427	3,021		

a. Variable(s) entered on step 1: Idade, Morte.

Hosmer and Lemeshow Test			
Step	Chi-square	df	Sig.
1	5,627	7	,584

Tabela B129. Comparação das curvas de sobrevivência livre de doença dos doentes com metástases loco-regionais com e sem progressão para metastização à distância.

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1,925	1	,165
Test of equality of survival distributions for the different levels of Progressão.			

Tabela B130. Comparação das curvas de sobrevivência global dos doentes com metástases loco-regionais com e sem progressão para metastização à distância.

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	23,526	1	,000
Test of equality of survival distributions for the different levels of Progressão.			

Tabela B131. Sexo dos doentes das diferentes vias metastáticas do melanoma.

Chi-Square Tests			
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	,548 ^a	2	,760
Likelihood Ratio	,549	2	,760
Linear-by-Linear Association	,033	1	,856
N of Valid Cases	66		

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 5,50.

Tabela B132. Teste de normalidade da distribuição da idade nos doentes com melanoma metastático (teste de Kolmogorov-Smirnov).

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Idade
N		66
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	62,0758
	Std. Deviation	16,25405
Most Extreme Differences	Absolute	,126
	Positive	,059
	Negative	-,126
Kolmogorov-Smirnov Z		1,021
Asymp. Sig. (2-tailed)		,248

a. Test distribution is Normal.
b. Calculated from data.

Tabela B133. Comparação da idade média dos doentes das diferentes vias metastáticas do melanoma (teste ANOVA de um factor).

ANOVA					
Idade					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1589,554	2	794,777	3,213	,047
Within Groups	15583,068	63	247,350		
Total	17172,621	65			

Tabela B134. Teste de normalidade da distribuição da espessura do melanoma nos doentes com melanoma metastático (teste de Kolmogorov-Smirnov).

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Espessura
N		53
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	6,3660
	Std. Deviation	4,88139
Most Extreme Differences	Absolute	,176
	Positive	,176
	Negative	-,136
Kolmogorov-Smirnov Z		1,283
Asymp. Sig. (2-tailed)		,074
a. Test distribution is Normal.		
b. Calculated from data.		

Tabela B135. Comparação da espessura média dos melanomas dos doentes das diferentes vias metastáticas do melanoma (teste ANOVA de um factor).

ANOVA					
Espessura					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	55,854	2	27,927	1,180	,316
Within Groups	1183,200	50	23,664		
Total	1239,054	52			

Tabela B136. Ulceração do tumor primário nas diferentes vias metastáticas do melanoma (teste de Monte Carlo).

Chi-Square Tests									
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Monte Carlo Sig. (2-sided)			Monte Carlo Sig. (1-sided)		
				Sig.	99% Confidence Interval		Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound
Pearson Chi-Square	,837 ^a	2	,658	,723 ^b	,711	,734			
Likelihood Ratio	,839	2	,658	,723 ^b	,711	,734			
Fisher's Exact Test	,875			,723 ^b	,711	,734			
Linear-by-Linear Association	,261 ^c	1	,609	,700 ^b	,688	,712	,376 ^b	,364	,389
N of Valid Cases	57								
a. 1 cells (16,7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 4,74.									
b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 957002199.									
c. The standardized statistic is ,511.									

Tabela B137. Tipo do tumor primário nas diferentes vias metastáticas do melanoma (teste de Monte Carlo).

Chi-Square Tests									
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Monte Carlo Sig. (2-sided)			Monte Carlo Sig. (1-sided)		
				Sig.	99% Confidence Interval		Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound
Pearson Chi-Square	9,874 ^a	6	,130	,129 ^b	,120	,137			
Likelihood Ratio	10,318	6	,112	,162 ^b	,152	,171			
Fisher's Exact Test	10,205			,093 ^b	,086	,101			
Linear-by-Linear Association	,018 ^c	1	,894	,943 ^b	,937	,949	,471 ^b	,458	,484
N of Valid Cases	66								
a. 6 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,67.									
b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 1993510611.									
c. The standardized statistic is ,133.									

Tabela B138. Localização do tumor primário nas diferentes vias metastáticas do melanoma (teste de Monte Carlo).

Chi-Square Tests									
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Monte Carlo Sig. (2-sided)			Monte Carlo Sig. (1-sided)		
				Sig.	99% Confidence Interval		Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound
Pearson Chi-Square	5,038 ^a	8	,754	,791 ^b	,780	,801			
Likelihood Ratio	6,628	8	,577	,718 ^b	,706	,729			
Fisher's Exact Test	4,794			,815 ^b	,805	,825			
Linear-by-Linear Association	1,267 ^c	1	,260	,289 ^b	,277	,300	,141 ^b	,132	,150
N of Valid Cases	66								

a. 11 cells (73,3%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,50.
 b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 92208573.
 c. The standardized statistic is 1,126.

Tabela B139. Morte por melanoma nos doentes das diferentes vias metastáticas (teste de Monte Carlo).

Chi-Square Tests									
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Monte Carlo Sig. (2-sided)			Monte Carlo Sig. (1-sided)		
				Sig.	99% Confidence Interval		Sig.	99% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound		Lower Bound	Upper Bound
Pearson Chi-Square	1,956 ^a	2	,376	,386 ^a	,373	,398			
Likelihood Ratio	2,828	2	,243	,386 ^a	,373	,398			
Fisher's Exact Test	1,550			,609 ^a	,596	,621			
Linear-by-Linear Association	1,905 ^c	1	,167	,215 ^a	,204	,226	,143 ^a	,134	,152
N of Valid Cases	66								

a. 3 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,00.
 b. Based on 10000 sampled tables with starting seed 2000000.
 c. The standardized statistic is 1,380.

Tabela B140. Idade e via metastática (teste de comparações múltiplas de Bonferroni).

Sample1-Sample2	Test Statistic	Std. Error	Std. Test Statistic	Sig.	Adj.Sig.
B-A	12,311	5,377	2,290	,022	,066
B-C	-11,131	6,630	-1,679	,093	,280
C-A	1,180	7,200	,164	,870	1,000

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same. Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is ,05.

Tabela B141. Comparação das curvas de sobrevivência livre de doença em função da via metastática (teste *log-rank* de Mantel-Cox).

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1,700	2	,428

Test of equality of survival distributions for the different levels of Via.

Tabela B142. Comparação das curvas de sobrevivência livre de metástases distantes em função da via metastática (teste *log-rank* de Mantel-Cox).

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	3,545	2	,170

Test of equality of survival distributions for the different levels of Via.

Tabela B143. Teste de normalidade da distribuição da sobrevivência livre de metástases distantes nos doentes com melanoma metastático (teste de Kolmogorov-Smirnov).

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Tmd
N		66
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	25,5909
	Std. Deviation	28,57109
Most Extreme Differences	Absolute	,185
	Positive	,179
	Negative	-,185
Kolmogorov-Smirnov Z		1,505
Asymp. Sig. (2-tailed)		,022
a. Test distribution is Normal.		
b. Calculated from data.		

Tabela B144. Sobrevivência livre de metástases distantes em ambos os sexos (teste de Mann-Whitney).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Tmd is the same across categories of Sexo.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,404	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B145. Sobrevivência livre de metástases distantes nos diversos estratos etários (teste de Kruskal-Wallis).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Tmd is the same across categories of Etário.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,363	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B146. Sobrevivência livre de metástases distantes nos vários estratos da categoria T (teste de Kruskal-Wallis).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Tmd is the same across categories of T.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,012	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B147. Sobrevida livre de metástases distantes nos melanomas ulcerados e não ulcerados (teste de Kruskal-Wallis).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Tmd is the same across categories of Ulceração.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,522	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B148. Sobrevida livre de metástases distantes em função do tipo de melanoma (teste de Kruskal-Wallis).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Tmd is the same across categories of Tipo.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,376	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B149. Sobrevida livre de metástases distantes em função da localização do melanoma (teste de Kruskal-Wallis).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Tmd is the same across categories of Localização.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	,180	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

Tabela B150. Morte por melanoma em função da sobrevida livre de metástases distantes (teste de Mann-Whitney).

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Tempo até à metastização distante is the same across categories of Morte.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,836 ¹	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

¹Exact significance is displayed for this test.

Tabela B151. Comparação das curvas de sobrevida global em função da via metastática (teste de *log-rank* de Mantel-Cox).

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	3,125	2	,210

Test of equality of survival distributions for the different levels of Via.

Tabela B152. Comparação das curvas de sobrevivência a partir do diagnóstico de metastização distante em função da via metastática (teste de *log-rank* de Mantel-Cox).

Overall Comparisons			
	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,955	2	,620

Test of equality of survival distributions for the different levels of Via.

