

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA**  
**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA bcl-2 EM METÁSTASES**  
**DE MELANOMA CUTÂNEO E RELAÇÃO COM A SOBREVIVÊNCIA**

**MARÍLIA BITTENCOURT ESPÍNDOLA**  
**ORIENTADOR: DR. OLY CAMPOS CORLETA**

**Porto Alegre**

**E77e Espíndola, Marília Bittencourt**

**Expressão imunoistoquímica da proteína bcl-2 em metástases de melanoma cutâneo e relação com a sobrevida / Marília Bittencourt**

**Espíndola ; orient. Oly Campos Corleta. – 2007.**

92 f. : il. color.

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.**

**Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências**

**Médicas: Cirurgia. Porto Alegre, BR-RS, 2007.**

1. Melanoma 2. Neoplasias cutâneas 3. Sobrevida 4. Metástase neoplásica 5. Oncogenes 6. Proteínas proto-oncogênicas c-bcl-2 I. Corleta, Oly Campos II.

Título.

NLM: QZ 200

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

“A vã presunção de se conhecer tudo, só pode possuir como base, o nunca compreender nada... Pois qualquer indivíduo que tenha experimentado, pelo menos uma vez, o entendimento perfeito de um único objeto [e possa haver, realmente, experimentado como o conhecimento é atingido...] saberia reconhecer que existe uma infinidade de outras verdades sobre as quais ele nada compreende”.

**GALILEU GALILEI**

**Diálogos Sobre os Dois Maiores Sistemas do Mundo.**

“Os homens sempre precisam estar pesquisando, sempre aprendendo; contudo, há um infinito além.”

**ELLEN G. WHITE**

**Mensagens Escolhidas**

À Deus,  
autor e consumidor  
de todas as coisas.

Ao meu esposo, Éverton,  
pelo amor, compreensão, carinho e  
incentivo durante esses anos.

À minha mãe, Maria Elena  
*(in memoriam)*,  
por ter-me ensinado a  
fazer as escolhas certas.

À minha família e amigos,  
todos muito importantes  
em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

- **Ao Prof. Dr. Oly Campos Corleta**, pela orientação, sugestões e incentivo durante a confecção dessa dissertação;

- **Ao Prof. Dr. Renato Luiz Amaral**, pelos ensinamentos, oportunidades e incentivo ao longo de minha formação acadêmica e de minha vida profissional;

- **Ao Prof. Dr. Luis Rohde**, coordenador deste PPG, pela paciência e incentivo à conclusão desse trabalho;

- **Ao Prof. Dr. Luis Fernando Rivero**, pela disposição e valiosas orientações nas avaliações histológicas e imunoistoquímicas;

- **Ao Dr. Gerson Junqueira Jr.**, pelas oportunidades profissionais e por ceder casos a essa pesquisa;

- **Ao Dr. Geraldo Geyer**, do Laboratório Geyer, pela prontidão em fornecer material para a pesquisa;

- **A Dra. Mônica Blaya Azevedo**, do Laboratório Anat-Pat, por colaborar com o material para a pesquisa;

- **Ao Prof. Dr. Roque Furian**, do Laboratório de Patologia da ISCMPA, pela grande colaboração na identificação e separação de casos;

- **À Sra. Estela Maris Araripe**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina – Cirurgia da UFRGS, pela atenção e solicitude sempre demonstrados;

- **À Sra. Flávia Giusti**, técnica em imunoistoquímica, funcionária do Serviço de Patologia do HCPA, pela dedicação, rapidez e eficiência na realização das reações imunoistoquímicas;

- À **Sra. Zeli Fogaça Pacheco**, funcionária do Serviço de Patologia do HCPA, pela atenção e disposição na busca dos blocos de parafina;
- À **FIPE, Fundo de Incentivo à pesquisa e Eventos**, pelo auxílio financeiro na aquisição do material para as reações imunoistoquímicas;
- À **Sra. Vânia Naomi Hirakata**, estatística, pelas orientações estatísticas;
- À **Profª. Luciana Damiani**, pela padronização do texto em língua portuguesa;
- À **Sra. Fátima**, da Coordenadoria de Informações em Saúde da Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, pela presteza no fornecimento de dados;
- Às **Sras. Jacira e Sônia**, do SAMIS-HCPA, pelo apoio na coleta de dados;
- Ao colega **Fábio Jung**, pelo auxílio na versão em língua inglesa;
- A todos que de uma forma ou outra **contribuíram para a realização desse trabalho.**

## SUMÁRIO

1 – AGRADECIMENTOS	VI
2 – SUMÁRIO	VIII
3 – LISTA DE ABREVIATURAS	X
4 – LISTA DE TABELAS	XII.
5 – LISTA DE FIGURAS	XIV
6 – LISTA DE ANEXOS	XV
7 – INTRODUÇÃO	1
8 – ARTIGO	
8.1 – TÍTULO	9
8.2 – RESUMO	10
8.3 – INTRODUÇÃO	11
8.4 – PALAVRAS CHAVE	12
8.5 - PACIENTES E MÉTODOS	13
8.6 – RESULTADOS	17
8.7 – DISCUSSÃO	20
8.8 - CONCLUSÃO	27
8.9 – AGRADECIMENTOS	28
8.10 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
8.11 – TABELAS	35
8.12 – FIGURAS	39
9 – REVISÃO DE LITERATURA	44
10 – TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA	64



11 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
12 – ANEXOS	73

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AJCC:** *American Joint Committee on Cancer*; (Comitê Americano de Câncer)

**ATP:** *adenosine triphosphate*; (trifosfato de adenosina);

**BANS:** *back, arms, neck and scalp*; (dorso, braços, cabeça e pescoço);

**BCL-2:** família de genes envolvidos com a apoptose;

**Bcl-2:** proto-oncogene relacionado com a inibição da apoptose;

**bcl-2:** proteína resultante da transcrição do gene;

**BCNU:** Carmustina;

**DAB:** *3,3'-diaminobenzedine*;

**DNA:** *Deoxyribonucleic acid*; (ácido desoxirribonucléico);

**DTIC:** Dacarbazina;

**FDA:** *Food and Drug Administration*; (Administração de alimentos e medicações);

**HCPA:** Hospital de Clinicas de Porto Alegre;

**HMV:** Hospital Moinhos de Vento;

**HSR:** Hospital Santa Rita;

**ISCMPA:** Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre;

**KDa:** *KiloDalton*; QuiloDalton;

**MC:** Melanoma Cutâneo;

**PBS:** *phosphate-buffered saline*; (solução salina tamponada com fosfato);

**PCR:** *polimerase chain reaction*; (reação da polimerase em cadeia);

**PUVA:** Psoralen e radiação ultravioleta A;

**SCDI:** *Severe combined immunodeficient*; imunodeficiência combinada grave;

**SNC:** Sistema nervoso central;

**TANS:** *trunk, arms, neck and scap*; (tronco, braços, cabeça e pescoço);

**TNM:** *Tumor, Node and Metastasis*; (Tumor, linfonodos e metástases);

**UAB-SMU:** Base de dados da Universidade do Alabama e da Unidade de Melanoma de Sydney; (*University of Alabama at Birmingham – Sydney Melanoma Unit*);

**UV:** radiação ultravioleta;

**UVA:** radiação ultravioleta A;

**UVB:** radiação ultravioleta B.

## LISTA DE TABELAS

### 1 – TABELAS DO TRABALHO:

**1.1 – Tabela I:** Classificação modificada da microespessura de tumor (Breslow), em mm, segundo *AJCC*.

**1.2 – Tabela II:** Classificação do grau de invasão do MC nas camadas da pele (Clark).

**1.3 – Tabela III:** Estadiamento TNM (*Tumor, Node and Metastasis*) – *AJCC* utilizado até 2001 para MC.

**1.4 – Tabela IV:** Estadiamento TNM-*AJCC* utilizado a partir de 2002 para Melanoma Cutâneo.

**1.5 – Tabela V:** Classificação dos tipos e dermato-helioses segundo Fitzpatrick.

### 2 – TABELAS DO ARTIGO:

**2.1 – Tabela I:** Grau de positividade e intensidade da reação imunoistoquímica à proteína bcl-2 em metástases de melanoma cutâneo.

**2.2 – Tabela II:** Presença da proteína bcl-2 entre os vivos, e entre os com lesão metastática sugerida por imagem e não ressecada ao final do estudo. A porcentagem, na coluna bcl-2 positivo e metástase não ressecada, refere-se ao número total de pacientes vivos ao final do estudo com bcl-2 positivo.

**2.3 – Tabela III:** teste qui-quadrado para a presença da proteína bcl-2 nos três tipos de metástases ( $\chi^2=1,34$ ;  $P=0,510$ ).

**2.4 – Tabela IV:** Análise Univariada de Cox das metástases linfonodais em relação a sexo, idade e presença da proteína bcl-2.

**2.5 – Tabela V:** Análise Univariada de Cox das metástases subcutâneas em relação a sexo, idade e presença da proteína bcl-2.

**2.6 – Tabela VI:** Análise univariada de Cox das metástases viscerais em relação a sexo, idade e presença da proteína bcl-2.

**2.7 – Tabela VII:** Análise Multivariada de Cox das metástases subcutâneas em relação a sexo, idade e presença da proteína bcl-2.

## LISTA DE FIGURAS

**1 - Figura I:** Fotomicrografia de metástase linfonodal de MC apresentando reação intensa após coloração com a proteína bcl-2 (a coloração marrom escura e com padrão granular reflete a presença do pigmento melanina) (200x).

**2 - Figura II:** Fotomicrografia de metástase linfonodal de MC exibindo reação fraca a proteína bcl-2 (presença de melanófagos – macrófagos que fagocitaram melanina) (200x).

**3 - Figura III:** Fotomicrografia de reação negativa à proteína bcl-2 em metástase linfonodal de MC (200x).

**4 - Figura IV:** Fotomicrografia de metástase subcutânea de MC apresentando expressão forte da proteína bcl-2 (200x).

**5 - Figura V:** Fotomicrografia de metástase subcutânea de MC exibindo coloração fraca da proteína bcl-2 (presença de melanina) (200x).

**6 - Figura VI:** Fotomicrografia de reação negativa à proteína bcl-2 em metástase subcutânea de MC (200x).

**7 - Figura VII:** Fotomicrografia de metástase visceral de MC exibindo coloração intensa da proteína bcl-2 (200x).

**8 - Figura VIII:** Fotomicrografia de metástase visceral de MC apresentando reação fraca à proteína bcl-2 (200x).

**9 - Figura IX:** Fotomicrografia de reação negativa à proteína bcl-2 em metástase visceral de MC (200x).

## **LISTA DE ANEXOS**

- 1. Anexo 1:** Protocolo de coleta de dados.
- 2. Anexo 2:** Aprovação pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## INTRODUÇÃO

O câncer de pele é a neoplasia maligna mais freqüente em humanos. O melanoma cutâneo (MC) representa cerca de 3% de todas as neoplasias de pele, porém é responsável por cerca de 79% das mortes por câncer de pele (1). Origina-se nos melanócitos da pele, as células produtoras do pigmento melanina. Essas células localizam-se na camada basal da epiderme e emitem numerosos prolongamentos entre as camadas superiores da pele (2). O melanoma geralmente ocorre na superfície cutânea (melanoma cutâneo), ainda que outros tecidos, incluindo superfícies mucosas (oral, anogenital e esofágica), meninges e globo ocular possam também apresentar essa neoplasia (3).

A incidência do MC tem aumentado significativamente nos últimos anos. Nos Estados Unidos, de 1973 a 2000, sua incidência cresceu de 5,7 para 14,3 casos por 100.000 habitantes. Já a mortalidade no mesmo período sofreu um acréscimo de 44%, elevando-se de 1,6 para 2,3 óbitos em cada 100.000 habitantes. Estima-se que em 2007 serão diagnosticados aproximadamente 59.940 novos casos e que cerca de 8.110 pessoas morrerão por melanoma, neste ano, naquele país . O gasto estimado é de cerca de US\$ 740 milhões, anualmente (1). No Brasil, no período de 1978 a 1982, a incidência, obtida a partir dos Registros de Câncer de Base Populacional de São Paulo, Porto Alegre, Recife e Fortaleza, variou de 1,3 a 4,0 casos por 100.000 habitantes. Tendo-se em conta o sub-registro, comum em nosso país, é lícito supor que essa taxa esteja subestimada. Para 2006, estão previstos 2.710 casos novos em homens e 3.050 casos novos em mulheres, segundo as Estimativas de Incidência de Câncer no Brasil. As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sul (4).



O MC apresenta um aumento gradativo de incidência a partir dos dez anos de idade até a quinta década de vida. Por acometer principalmente pacientes jovens, que se encontram no período mais produtivo de suas vidas, o MC torna-se uma doença de grande repercussão socioeconômica. Fenótipo caucasiano (pele clara, olhos claros e cabelos loiros ou ruivos), presença de múltiplos tumores benignos de pele (nevus), história familiar e exposição solar excessiva - principalmente em pacientes com história de queimaduras solares - são considerados fatores de risco para o MC (5).

Apesar dos grandes avanços em conhecimento do MC nos últimos anos, a cirurgia ainda permanece como base do tratamento do tumor inicial e das lesões metastáticas (6, 7 e 8).

O principal determinante do prognóstico do melanoma maligno é a extensão da doença no momento do diagnóstico (7). No melanoma em fase inicial têm grande valor a espessura do tumor (nível de Breslow), o tipo histológico, a presença de ulceração ou de regressão, o gênero, a localização do tumor e o nível histológico de invasão da pele (nível de Clark) (Tabelas I e II). Sabe-se que esses fatores relacionados ao melanoma primário perdem grandemente seu valor prognóstico após o diagnóstico da primeira metástase, seja ela linfonodal regional ou não. A mortalidade é alta nos pacientes com tumores considerados avançados (Tabela III e IV). A sobrevida em cinco anos para os estágios III e IV é de 13% e 2% respectivamente. Pacientes com a doença em estágio IV têm um pior prognóstico, com uma média de sobrevida, após a primeira metástase detectada, de 6,0 a 7,5 meses (8).

Tabela I: Classificação modificada da microespessura de tumor (Breslow), em mm, segundo AJCC (*American Joint Committee on Cancer*).

Até 2001	A partir de 2002
Até 0,75	Até 1,00
0,76 a 1,50	1,01 a 2,00
1,51 a 4,00	2,01 a 4,00
Maior que 4,0	Maior que 4,00

Tabela II: Classificação do grau de invasão do Melanoma Cutâneo nas camadas da pele (Clark).

NÍVEL	LOCALIZAÇÃO
I	MELANOMA CUTÂNEO “in situ”
II	INVADE A DERME PAPILAR
III	INVADE A TRANSIÇÃO ENTRE A DERME PAPILAR E RETICULAR
IV	INVADE A DERME RETICULAR
V	INVADE O TECIDO CELULAR SUBCUTÂNEO

Tabela III: Estadiamento TNM (*Tumor, Node and Metastasis*) – AJCC utilizado até 2001 para Melanoma Cutâneo.

<b>Classificação TNM – AJCC até 2001</b>			
<b>Tumor primário</b>			
pTX	Não há como avaliar o tumor primário		
pT0	Sem evidência de tumor primário		
pTis	Melanoma in situ – Clark I		
pT1	< ou = a 0,75mm de espessura e/ou Clark II		
pT2	0,76 a 1,50 mm e/ou Clark III		
pT3	1,51 a 4,00 mm e/ou Clark IV		
pT4	> do que 4,00 mm e/ou Clark V e/ou satelitoses a 2 cm do tumor primário		
<b>Linfonodos regionais</b>			
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados		
N0	Ausência de metástase linfonodal regional		
N1	Até três centímetros de maior diâmetro		
N2	Mais de três centímetros de maior diâmetro e/ou metástase em trânsito		
<b>Metástases a distância</b>			
MX	Metástases a distância não podem ser avaliadas		
M0	Ausência de metástase a distância		
M1	Presença de metástase a distância		
<b>Estadiamento por grupos</b>			
Estágio 0	pTis	N0	M0
Estágio I	PT1	N0	M0
	PT2	N0	M0
Estágio II	PT3	N0	M0
	PT4	N0	M0
Estágio III	Qualquer pT	N1	M0
	Qualquer pT	N2	M0
	Qualquer pT	Qualquer N	M1

Tabela IV: Estadiamento TNM – AJCC utilizado a partir de 2002 para Melanoma Cutâneo.

<b>T</b>	<b>ESPESSURA</b>	<b>ULCERAÇÃO</b>					
T1	Até 1,0 mm	a: ausência de ulceração e nível II/III b: com ulceração ou nível IV/V					
T2	1,01 – 2,00 mm	a: ausência de ulceração b: com ulceração					
T3	2,01 – 4,00 mm	a: ausência de ulceração b: com ulceração					
T4	maior do que 4,00 mm	a: ausência de ulceração b: com ulceração					
<b>N</b>	<b>No. LNS METASTÁTICOS</b>	<b>INFILTRAÇÃO TUMORAL DO LN</b>					
N1	Um linfonodo	a: micrometástase * b: macrometástase **					
N2	Dois a três linfonodos	a: micrometástase * b: macrometástase ** c: Metástases em trânsito/ Satelitoses/ sem metástases linfonodais					
N3	Quatro ou mais linfonodos metastáticos, ou linfonodos confluentes, ou MTX em trânsito / satelitoses com linfonodos metastáticos						
<b>M1</b>	<b>LOCALIZAÇÃO</b>	<b>LDH SÉRICO</b>					
M1a	MTX cutânea, subcutânea ou linfonodal a distância	Normal					
M1b	Metástase em pulmão	Normal					
M1c	MTX em outras vísceras Qualquer metástase a distância	Normal Elevado					
<b>ESTADIAMENTO CLÍNICO ***</b>				<b>ESTADIAMENTO PATOLÓGICO****</b>			
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0		T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0		T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0		T4a	N0	M0
IIC	T4b	NO	M0	IIC	T4b	N0	M0
III	qqT	N1	M0	III			
		N2	M0				
		N3	M0				
IIIA				IIIA	T1-4 a	N1a	M0
					T1-4 a	N2a	M0
IIB				IIB	T1 – 4 b	N1a	M0

					T1 – 4 b	N2a	M0
					T1 – 4 a	N1b	M0
					T1 – 4 a	N2b	M0
					T1 – 4 a/b	N2c	M0
IIIC				IIIC	T1 – 4 b	N1b	M0
					T1 – 4 b	N2b	M0
					qq T	N3	M0
IV	qqT	qqN	qqM1	IV	qqT	qqN	QqM1

\* Micrometástases são diagnosticadas após pesquisa de linfonodo sentinela ou linfadectomia eletiva.

\*\* Macrometástases são definidas como metástases em linfonodo clinicamente detectável confirmados por linfadectomia terapêutica ou por metástase em linfonodo com extensão extracapsular macroscópica.

\*\*\* Estadiamento clínico inclui microestadiamento do melanoma primário e avaliação clínica e radiológica das metástases. Por convenção, deve ser usado após completa excisão do melanoma primário com avaliação clínica das metástases regionais e a distância.

\*\*\*\* Estadiamento patológico inclui microestadiamento do melanoma primário e informações patológicas a respeito dos linfonodos regionais após linfadectomia parcial ou completa. Pacientes com estágio patológico 0 ou IA são a exceção; eles não requerem avaliação patológica de seus linfonodos.

Acredita-se que o sítio da metástase seja um importante fator prognóstico no melanoma cutâneo estágio IV. As metástases de melanoma são divididas em viscerais e não-viscerais (pele, tecido celular subcutâneo, músculo ou linfonodos distantes). Os pacientes com metástases não-viscerais geralmente têm maior sobrevida do que os com metástases viscerais, com ou sem não-viscerais associadas (média de sobrevida de oito meses versus três meses; sobrevida em um ano de 46% versus 18% respectivamente) (9).

Outros fatores prognósticos importantes, no estágio IV, são o número de sítios metastáticos e a duração do intervalo livre de doença (10). Sabe-se que pacientes com mais de um sítio metastático têm uma sobrevida menor. Além disso, a sobrevida também varia conforme a localização do sítio metastático. Pacientes com metástases subcutâneas únicas, ou múltiplas apresentam melhor sobrevida que aqueles com uma única metástase visceral. O intervalo livre de doença é outro fator importante em todos os estágios, visto que a sobrevida tende a ser maior naqueles pacientes com maior intervalo entre o tumor primário e a metástase e entre metástases (5 e 11). Existem

também numerosos marcadores moleculares e biológicos com relevância clínica em estudo, alguns dos quais refinarão as atuais variáveis clínicas e patológicas que predizem o prognóstico e o padrão de metástases. Entre eles, está o estudo do Bcl-2 em melanoma primário e metastático (12). Nesse estudo utilizaremos a expressão BCL-2 para designar a família de genes denominada BCL-2; Bcl-2 quando nos referirmos ao gene e bcl-2 para identificar a proteína oriunda do gene.

O gene Bcl-2 é um proto-oncogene responsável pela expressão de uma proteína 26-KDa, localizada na mitocôndria, retículo endoplasmático e membrana nuclear, que inibe a morte celular programada (apoptose). Ele tem sido identificado no pâncreas (ácinos e células das ilhotas), mama (células epiteliais hormônio-dependentes), tireóide, próstata, trato gastrointestinal (células epiteliais das criptas), neurônios especializados, tecido linfático (células B) e pele (melanócitos e células da camada basal) (12 e 13). A translocação 14:18 (q32;q21) em linfoma folicular de células B leva ao aumento da expressão de bcl-2, embora essa alteração genética não tenha sido identificada em outros tecidos que expressam bcl-2 (12). Por seu efeito anti-apoptótico, o Bcl-2 tem sido alvo de vários estudos nos últimos anos. Desses, muitos têm relatado altos níveis da proteína bcl-2 em melanócitos normais na pele. Melanomas primários mostram imunopositividade à proteína bcl-2, mas em menor proporção que nas lesões benignas, enquanto lesões metastáticas mostram menor expressão ainda. Conclui-se que, durante o processo de progressão maligna, há a substituição da ação antiapoptótica do Bcl-2 por outras características autônomas de desenvolvimento. Grover *et al.* estudando 42 metástases linfonodais regionais de melanoma cutâneo por citometria de fluxo, verificaram que a expressão de bcl-2 é um fator de pior prognóstico independente na determinação da sobrevida. Sabe-se que isso também é verdade em tumores de pulmão não-pequenas células e em neuroblastomas (14).

Sugere-se que a citada manutenção da expressão do Bcl-2 em metástases linfonodais regionais de MC deva explicar o pior prognóstico delas. A causa para a expressão anormal de bcl-2 no melanoma é, até o momento, desconhecida. O mecanismo clássico de aumento da expressão (translocação do cromossomo 14:18) não tem sido detectado em melanomas primários ou metastáticos (14).

A maioria dos tratamentos oncológicos não-cirúrgicos (quimioterapia e radioterapia), baseia-se na indução da apoptose, levando à destruição das células neoplásicas. Uma maior expressão de bcl-2 (inibidor da apoptose) causaria uma maior resistência dessas lesões a esses tipos de tratamento, o que poderia explicar a resistência observada em melanomas cutâneos aos tratamentos quimioterápicos convencionais (14, 15, 16 e 17).

Apesar de que a maioria dos melanomas cutâneos primários com espessura menor que 0,76 mm está relacionada a um bom prognóstico, vários estudos têm mostrado que 5 a 22% dessas lesões podem formar metástases e matar. Ao contrário, há um grupo de pacientes com melanomas cutâneos primários espessos (maiores do que 3,6 mm) que apresentam uma longa sobrevida (mais de 10 anos). Essa controvérsia poderá ser mais bem esclarecida pelo estudo dos marcadores biológicos e moleculares dessas lesões, entre eles o Bcl-2 (18).

Com base nas controvérsias encontradas na literatura sobre a expressão de bcl-2, desenvolvemos o presente estudo que tem por objetivo avaliar a expressão imunohistoquímica da proteína bcl-2 em metástases linfonodais regionais, subcutâneas e viscerais de MC e relacionar essa expressão com a sobrevida, no intuito de verificar se há ou não correlação entre a manutenção da expressão dessa proteína e um pior prognóstico. Esse estudo será encaminhado para publicação no *Applied Cancer*

*Research*, e foi escrito com base nas diretrizes de apresentação de trabalhos encontradas em sua página na *internet* (19).

**EXPRESSÃO DE bcl-2 E SUA RELAÇÃO COM A SOBREVIDA EM  
MELANOMA CUTÂNEO METASTÁTICO**

**Espíndola M B, Corleta OC**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina - Cirurgia da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul – Brasil**

**Rua Ramiro Barcelos 2300, 2º. Andar.**

**Cep 90035-003 Porto Alegre – RS – Brasil.**

**Telefone: (0XX51) 33165607**

**Fax: (0XX51) 33821200**

**e-mail: mariliae@brturbo.com.br**



## RESUMO

A morte celular programada (apoptose) tem sido implicada no desenvolvimento tumoral e no potencial metastático. O Bcl-2, um proto-oncogene inibidor da apoptose, vem sendo estudado em várias neoplasias incluindo o Melanoma Cutâneo (MC). Esse estudo avaliou a expressão imunoistoquímica da proteína bcl-2 em 35 metástases linfonodais regionais, 28 metástases subcutâneas e 17 metástases viscerais de MC e correlacionou com a sobrevida. O tempo médio de acompanhamento foi de 29,7 meses nas metástases linfonodais, 23,1 meses nas metástases subcutâneas e 22,9 meses nas metástases viscerais. A expressão de bcl-2 foi de 74,3% nas metástases linfonodais, 85,7% nas subcutâneas e 82,4% nas viscerais. Após análise uni e multivariada não houve correlação entre a positividade para bcl-2 e a sobrevida em nenhum dos tipos de metástases. Conclui-se que a avaliação imunoistoquímica da proteína bcl-2 isoladamente, em metástases, não é um marcador prognóstico no MC. Estudos posteriores das relações entre os membros da família BCL-2 poderão elucidar seu papel no desenvolvimento do Melanoma Cutâneo.

## INTRODUÇÃO

O Melanoma Cutâneo (MC) é o tumor com maior aumento de incidência em humanos nos últimos anos (1). Entre os fatores apontados como causadores do aumento, está o maior número de exposições solares e conseqüentemente de queimaduras, com indução de danos genéticos causados pela radiação ultravioleta (2). O MC em estágio inicial é curável, mas o prognóstico para doença metastática é ruim, apresentando taxas de sobrevida, em cinco anos, de 41%, em pacientes com metástases linfonodais regionais e de, no máximo, dois anos, em pacientes com metástases à distância (3). Apesar dos grandes avanços tecnológicos, a cirurgia continua sendo a base do tratamento, visto que as respostas à quimioterapia e radioterapia são ainda baixas e pouco sustentadas (4 e 5). Como a via final da maioria dos tratamentos não-cirúrgicos é a indução da apoptose (morte celular programada), grande interesse tem sido demonstrado, ultimamente, no estudo dos mecanismos genéticos que regulam esse evento celular fisiológico (6). Defeitos na regulação da apoptose têm sido implicados na progressão tumoral, formação de metástases e resistência a quimioterápicos (7 e 8). Nos últimos, anos numerosas biomoléculas vêm sendo estudadas no MC, na tentativa de estabelecer quais lesões apresentarão maior chance de responder a tratamentos não-cirúrgicos. Dentre essas biomoléculas, está o *bcl-2* (*B cell lymphoma/leukemia-2*) (9).

O gene *Bcl-2* localiza-se no seguimento cromossômico 18q21.3 em uma orientação do telômero para o centrômero (9). A proteína *bcl-2* é uma proteína integral de membrana (26kDa) que se situa no núcleo, mitocôndria e retículo endoplasmático da célula (10). Ela atua como inibidora da apoptose, não tendo qualquer influência na proliferação celular (9). Recentemente foram descobertas várias outras proteínas caracterizadas como parte da família *BCL-2*, com atuação direta na apoptose, seja inibindo-a ou promovendo-a. Dentre os membros antiapoptóticos dessa família, estão

os seguintes: Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1, Nr13, ORF 16, KS, Bcl-2 e o E1B-19K. Já os membros pró-apoptóticos são os seguintes: Bax, Bak, Bok, Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bim<sub>L</sub>, Bad, Bid, EGL-1 e o Bcl-x<sub>S</sub> (11).

Os resultados da pesquisa do Bcl-2 em MC são controversos. Enquanto alguns autores encontraram um aumento de bcl-2, durante a progressão de melanócito normal ao melanoma, outros têm encontrado resultados opostos (12, 13, 14, 15 e 16). Grover *et al.* demonstraram menor sobrevida em pacientes com metástases linfonodais regionais de MC e positividade para a proteína bcl-2, na análise por citometria de fluxo (12).

Esse estudo foi realizado para determinar a relação entre a expressão imunoistoquímica da proteína bcl-2 e a sobrevida em pacientes com metástases linfonodais regionais, subcutâneas e viscerais de MC.

Nesse trabalho os termos BCL-2, Bcl-2 e bcl-2 referem-se à família, gene e proteína respectivamente.

#### **PALAVRAS CHAVE**

Melanoma; metástases; bcl-2; oncogene; sobrevida.

## PACIENTES E MÉTODOS

Com base em registros hospitalares, foram selecionados 50 pacientes, atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (Rio Grande do Sul – Brasil), Hospital Santa Rita da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (HSR) e Hospital Moinhos de Vento (HMV) (Porto Alegre), no período de 1990 a 2000, com diagnóstico de MC em estágios III e IV, com primeira metástase tendo sido ressecada em uma dessas instituições. Um total de 38 pacientes do HCPA, nove do HSR e três do HMV compuseram a presente amostra. Foram excluídos do estudo pacientes com outras neoplasias prévias ou concomitantes, radioterapia ou quimioterapia prévias ao diagnóstico ou à ressecção da metástase, primeira metástase ressecada em outro hospital ou não ressecada totalmente em um dos sítios, e aqueles que morreram por outras causas que não o MC.

A amostra consta de 50 pacientes, 28 homens (56%) e 22 mulheres (44%). O diagnóstico do tumor primário foi em 21 casos de melanoma tipo espalhamento superficial, 15 de melanoma nodular, cinco de melanoma amelanótico e dois de melanoma acral. Em sete laudos, não constava o tipo histológico do melanoma primário. Como a presença de regressão, ulceração, crescimento vertical, índice mitótico, invasão vascular e infiltrado linfocitário não foi relatada em todos os diagnósticos iniciais, não houve como avaliar a importância desses parâmetros nesta amostra. A localização do tumor primário distribuiu-se da seguinte maneira: 30 casos em tronco, 13 casos em membros inferiores, quatro casos em membros superiores e três casos em cabeça e pescoço. A idade média do diagnóstico inicial foi de 43 anos, variando de 16 a 74 anos e uma mediana de 42 anos. O índice de Breslow médio foi de 5,01 mm variando de 0,4 a 27,5 mm. O nível de Clark variou de II a V, sendo o nível

IV mais prevalente (22 casos – 44%). O seguimento variou de zero a 131 meses do diagnóstico primário de metástase até o desfecho final (óbito ou última consulta em um dos referidos hospitais). Trinta e cinco metástases linfonodais, 28 metástases subcutâneas e 17 metástases viscerais foram avaliadas. As metástases viscerais avaliadas localizaram-se em anexo uterino (um), intestino delgado (quatro), adrenal (dois), epíplon (um), intestino grosso (um) pulmão (três), fígado (dois), testículo (um) e mama (dois). Quando um paciente apresentou mais de um tipo de metástase, apenas a primeira metástase de cada sítio foi avaliada para a expressão da proteína bcl-2. Somente pacientes com ressecção completa da primeira metástase em cada sítio constaram do estudo. Nove pacientes receberam tratamento quimioterápico com esquemas que constaram das seguintes drogas: DTIC (Dacarbazina), BCNU (Carmustina), Verapamil, Cisplatina e Tamoxifeno, em combinações variáveis e com duração de um a cinco ciclos, todos com caráter paliativo. Um paciente submeteu-se a perfusão isolada hipertérmica de membro inferior com uso de *melphalam*, apresentando remissão total da doença na época do tratamento, porém com recidiva tumoral posterior. Cinco pacientes receberam tratamento com interferon por períodos que variaram de um a cinco meses. Cinco pacientes receberam tratamento radioterápico, sendo quatro em sistema nervoso central (SNC) e um em axila, também com intenção paliativa.

O estudo consta de uma coorte histórica, em que o desfecho é a sobrevida de pacientes portadores de MC metastático. O fator em estudo é a expressão de bcl-2 em metástases linfonodais regionais, subcutâneas e viscerais, para avaliar o papel das alterações gênicas na evolução da doença. A reação imunistoquímica produzida pelo anticorpo monoclonal anti-bcl-2 produz uma coloração acastanhada de

padrão finamente granular como conseqüência da reação do corante DAB no citoplasma e membranas.

As lâminas foram avaliadas, conjuntamente pela pesquisadora e pelo Dr. Luis Fernando Rivero (professor do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul) e classificadas, conforme a coloração, em:

- 0 (negativa): com menos de 5 % das células tumorais coradas com bcl-2;
- I (positiva fraca): de 5% a 50% das células tumorais coradas com bcl-2.
- II (positiva forte): mais de 50% das células tumorais coradas com bcl-2.

A análise estatística foi realizada, primeiramente, agrupando-se os grupos positivos I e II e considerando-os como positivos. Após, a análise foi realizada considerando-se os grupos 0 e I conjuntamente, para avaliar a possibilidade de alteração de resultados finais. Como não houve alteração dos resultados finais, optou-se por descrever, na análise estatística, os grupos I e II juntamente. Para análise descritiva da amostra estudada, foram utilizados média aritmética, desvio-padrão, mediana, porcentagem (quando aplicável), valor máximo e mínimo para as variáveis quantitativas e qualitativas. O teste qui-quadrado, e o teste exato de Fisher foram utilizados para avaliar a relação entre a expressão da proteína bcl-2 nas metástases linfonodais, subcutâneas e viscerais, a relação entre a expressão da proteína bcl-2 e a sobrevida em cada tipo de metástase, o sexo e a idade do primeiro diagnóstico. Tabelas de frequência avaliaram a localização da primeira metástase, a presença de lesão metastática não tratada na última consulta, a idade do diagnóstico da primeira

metástase, a sobrevida em cada tipo de metástase, o intervalo livre de doença (definido como o tempo entre o diagnóstico inicial e a primeira metástase), e a relação entre a expressão da proteína bcl-2 e a sobrevida em cada tipo de metástase. Os testes log-rank e Kaplan Méier, com médias, medianas, desvios padrão e intervalo de confiança de 95%, foram utilizados para analisar a expressão da proteína bcl-2 e a sobrevida em cada tipo de metástase e a interação desses resultados com o sexo e a idade da primeira metástase. Para avaliar as interações entre as variáveis sexo, idade da primeira metástase, sobrevida, tipo de metástase, expressão de bcl-2, foram realizados testes de regressão univariada e multivariada de Cox. Um valor de P menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

O processamento e a análise dos dados foram executados com o auxílio dos programas Microsoft Excel 2000 e SPSS versão 6.0.

## RESULTADOS

A sobrevida média foi de 33,9 meses, mediana 16,5 meses a partir do diagnóstico da lesão metastática inicial (variando de zero a 131 meses), sendo que 24 dos 50 pacientes (48%) morreram por MC até o final do estudo. Dos 26 pacientes que permaneciam vivos ao final do estudo, 09 (36%) apresentavam exames de imagem sugestivos de múltiplas lesões metastáticas, ou lesão metastática única irressecável. O sítio anatômico da primeira metástase foi linfonodal regional em 24 pacientes (48%), subcutâneo em 13 pacientes (26%) e visceral em sete pacientes (14%). Cinco pacientes (10%) apresentaram metástases visceral e subcutânea, concomitantes como sítio de primeira metástase e um (2%) apresentou os três sítios já como manifestação metastática inicial. A média do intervalo livre de doença (do diagnóstico inicial ao diagnóstico de primeira metástase) foi de 17,6 meses (0 a 83 meses) (mediana de 11,5 meses e desvio padrão de 21,5 meses).

O tempo médio de acompanhamento dos pacientes até o evento final (óbito ou final do estudo) foi de 39,7 meses (mediana de 19,0 meses e desvio padrão de 38,7 meses) nas metástases linfonodais. Nas metástases subcutâneas, a média de acompanhamento foi de 23,1 meses (mediana de 10 meses e desvio padrão de 30,6 meses). Já nas metástases viscerais, a média foi de 22,9 meses (mediana de 11,0 meses e desvio padrão de 30,2 meses).

A expressão imunoistoquímica da proteína bcl-2, em metástases linfonodais regionais ocorreu em 26 dos 35 casos (74,3%), sendo que 17 casos (48,6%) apresentaram coloração intensa (Figura I); nove casos (25,7%) apresentaram coloração fraca (Figura II); os restantes nove casos (25,7%) foram negativos (Figura III). Dentre as 28 metástases subcutâneas, 24 (85,7%) foram positivas, 20 casos (71,4%) apresentaram coloração forte (Figura IV), quatro casos (14,3%) apresentaram coloração



fraca (Figura V) e quatro casos (14,3%) foram negativos (Figura VI). Das 17 metástases viscerais, 14 foram positivas (82,4%), sendo 11 (64,7%) com coloração intensa (Figura VII), três (17,6%) com coloração fraca (Figura VIII) e três (17,6%) foram negativas (Figura IX) (Tabela I).

Dentre os 35 pacientes que apresentaram metástases linfonodais, 16 morreram até o final do estudo (45,7%) e 12, dentre esses, apresentaram bcl-2 positivo (75%). Dos 28 pacientes com metástases subcutâneas, 16 (57,1 %) morreram até o final do estudo, sendo 13, dentre os 16, positivos para bcl-2 (81,3%). Nos 17 pacientes com metástases viscerais, a mortalidade total foi de nove pacientes (52,9%), sendo desses, oito positivos para bcl-2 (89%). A análise estatística desses dados, pelo teste exato de Fisher, não demonstrou significância nos diferentes tipos de metástases, entre a positividade para bcl-2 e óbito ( $P= 1,0$  para metástases linfonodais,  $P= 0,613$  para metástases subcutâneas e  $P=0,576$  para metástases viscerais).

A análise estatística, utilizando o teste exato de Fisher, comparando a presença da proteína bcl-2 em cada tipo de metástase, com a sobrevida e a presença de doença metastática não ressecada ao final do estudo, não demonstrou significância estatística ( $P=1,0$ ,  $P=0,333$  e  $P=0,429$  para metástase linfonodal, subcutânea e visceral respectivamente) (Tabela II).

O teste qui-quadrado, ao analisar a presença da proteína bcl-2 nos três tipos de metástases, não encontrou diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2 = 1,34$ ;  $P=0,510$ ) (Tabela III).

A análise de sobrevida de Kaplan-Meier ao comparar a sobrevida com a idade, o sexo e a presença da proteína bcl-2, encontrou a idade do diagnóstico inicial (> 60 anos) (Log Rank= 6,17;  $P=0,0130$ ), e o sexo masculino (Log Rank=3,17;  $P=0,0752$ )

nos pacientes com metástases subcutâneas, como estatisticamente significativas não encontrando relação com os demais dados.

A análise univariada de Cox, comparando presença da proteína bcl-2 nos três tipos de metástases e comparando com sobrevida, sexo e idade, encontrou, o fator idade (> 60 anos) e o sexo masculino como estatisticamente significativos nas metástases subcutâneas (P=0,022), mas não encontrou significância entre as demais comparações (Tabelas IV,V e VI). A análise multivariada de Cox, realizada com a presença da proteína bcl-2, sexo, idade e tipo de metástase, revelou o fator idade (>60 anos) e sexo masculino nos pacientes com metástases subcutâneas como estatisticamente significativo (P=0, e HR= com I.C. de a ) e não encontrou relação entre os demais dados (Tabela VII).

## DISCUSSÃO

A apoptose, ou morte celular programada, foi definida em 1972 por Kehr *et al.* como um processo genética e fisiologicamente controlado, mas somente há poucos anos vem recebendo interesse gradualmente maior (7, 9 e 17). A descoberta do gene Bcl-2 na translocação 14;18 (q32;q21) em linfomas foliculares de células B e após a família BCL-2 no estudo do nematódeo *Caenorhabditis elegans* abriu novas perspectivas no estudo da morfogênese tecidual e da oncogênese (9, 11 e 18). A inibição da apoptose pode ocorrer em qualquer fase do ciclo celular, mas o mecanismo através do qual o Bcl-2 inibe a apoptose não é totalmente entendido (19). Na presença de superexpressão de Bcl-2, a habilidade de remover danos celulares por apoptose estará limitada. Dessa forma permite que tumores progridam para fenótipos altamente malignos ou também mais resistentes a agentes quimioterápicos ou radioterápicos indutores da apoptose, tendo como consequência a formação de metástases e progressão tumoral, embora o Bcl-2 não atue diretamente na proliferação celular (8, 19 e 20). Vários tecidos, além da linhagem hematopoiética, expressam a proteína bcl-2. Em algumas neoplasias oriundas desses tecidos, há relação entre a expressão de bcl-2, maior intervalo livre de doença e melhor prognóstico, como em linfonodos com metástases de carcinoma de mama. No entanto, em outros, há relação inversa entre a positividade para bcl-2 e o prognóstico, como em carcinoma de próstata, ovário, carcinoma de pulmão não-pequenas células, carcinoma folicular de tireóide, neuroblastoma e carcinoma de mama (15 e 16). Em melanoma cutâneo, essa relação é ainda indefinida e controversa.

As variáveis de confusão, como tamanho da amostra, gênero e idade devem ser avaliadas ao se analisar fatores prognósticos no MC. Quanto ao número de casos, a relativa pequena amostra do presente estudo deve-se principalmente à ausência

de um protocolo de atendimento de pacientes com MC em nosso meio, o que impossibilita o acesso aos dados da maioria dos pacientes atendidos nos referidos serviços. Também existe uma dificuldade quanto ao acesso aos dados de registro, muitas vezes por mau preenchimento do prontuário médico ou pela ausência de um banco de dados nos Serviços de Patologia. Esse banco de dados possibilitaria o acesso ao prontuário, utilizando-se como dado inicial o diagnóstico anatomopatológico.

Quanto ao gênero, a tendência à superioridade feminina na sobrevida geral, e especialmente nos pacientes com metástases subcutâneas, é compatível com a literatura mundial (3, 21, 22, 23 e 24). Ainda que esse achado seja amplamente difundido, o verdadeiro motivo para essa maior sobrevida ainda não foi totalmente esclarecido. Sugeriram-se fatores hormonais e menor espessura tumoral nas lesões diagnosticadas em pacientes do sexo feminino, embora isso não tenha sido confirmado após análises multivariadas. Molife *et al.* avaliaram a sobrevida em pacientes com tumores de mama, pulmão, cólon e reto, esôfago, estômago, pâncreas, sarcomas de partes moles e melanomas e dividiram por sexo. Eles observaram que, em seis desses oito tipos de tumor, há evidência de vantagem na sobrevida para o sexo feminino, entre eles o MC, e que a vantagem é progressivamente maior, quanto mais inicial for o estágio da doença no momento do diagnóstico primário (24).

As individualizações de risco utilizam a idade de 50 ou de 60 anos para o diagnóstico inicial como ponto de corte para a avaliação de pacientes com MC. Este estudo, utilizou a idade de 60 anos e confirmou o achado de aumento de risco para idade maior de 60 anos em pacientes com metástases subcutâneas de MC, bem como a ausência de influência da idade na sobrevida nos demais tipos de metástase (3, 22, 25 e 26). A maior espessura do tumor em pacientes com diagnóstico acima dos 60 anos, bem como o acúmulo de danos genéticos adquiridos durante a vida poderia explicar esse

achado (27). Fernandez-Pol e Douglas relacionam a presença de bcl-2, a integridade mitocondrial e a carcinogênese com o envelhecimento humano (28). Garbe e Blum ao estudarem a epidemiologia do melanoma, na Alemanha, notaram que a maioria dos melanomas foi diagnosticada entre a sexta e sétima décadas de vida, sendo apenas 22% diagnosticados antes dos 40 anos de idade (29).

As características histológicas do tumor primário não estavam disponíveis em todos os casos e, portanto, não puderam ser avaliadas. Não foram avaliadas as relações entre localização da lesão primária, sobrevida e bcl-2. As características da lesão primária perdem sua importância prognóstica a partir do diagnóstico da primeira metástase (3, 26, 30, 31 e 32). A importância de dados do tumor inicial é controversa, visto que alguns autores encontraram resultados conflitantes a respeito do papel das características histológicas e sítio da lesão primária em relação ao prognóstico (1, 3, 21, 22, 26 e 30).

O gene bcl-2 é superexpresso em células epiteliais benignas, tanto em pele normal quanto em nevos (14, 15, 18, 33 e 34). Plettenberg *et al.* demonstraram, através de estudo imunistoquímico, que há uma expressão maior de bcl-2 em células de melanoma em cultura, quando comparadas a células de melanócitos em cultura, e que não existe diferença entre a expressão de bcl-2 em melanócitos normais de áreas expostas e não expostas ao sol. Eles também demonstraram que não há diferença entre a expressão de bcl-2 entre peças de MC primário e melanócitos normais (5). Já Tron *et al.* encontraram uma expressão forte de bcl-2 em melanócitos humanos normais e uma diminuição da expressão em nevus e MC primários quando comparados com os melanócitos. Sua conclusão foi de que a perda da expressão possa dever-se à aquisição de características autônomas de crescimento durante o processo de malignização (14). Reed, Tang, van den Oord e Ramsay também demonstraram uma diminuição da

expressão de bcl-2 em metástases de MC quando comparadas com a lesão primária (10, 15, 35 e 36). Já Mikhail *et al.*, não encontraram evidências de correlação entre a expressão imunohistoquímica da proteína bcl-2 em 127 melanomas primários e o prognóstico, após um seguimento médio de 12,8 anos (13).

Em nosso estudo, avaliamos a expressão de bcl-2 em metástases de MC sem correlacionar com a expressão em melanócitos normais. Isso não foi realizado por tratar-se de um estudo retrospectivo, baseado em blocos de parafina armazenados e dados de registro, não sendo possível a obtenção de amostras de pele normal ou de nevos dos pacientes avaliados.

Os dados percentuais de positividade para a proteína bcl-2 em nosso estudo foram semelhantes aos encontrados por Morales-Ducret, Tron, Collins e White que também utilizaram método imunohistoquímico (14, 15, 34 e 37).

Grover e Wilson avaliaram, através de citometria de fluxo, 42 pacientes com metástases linfonodais de MC. Eles encontraram a expressão de bcl-2 como fator prognóstico independente na determinação da sobrevida de pacientes com MC metastático, contudo a manutenção da expressão de bcl-2 não esteve relacionada com a resposta ao tratamento quimioterápico (12). Algumas diferenças encontradas entre o trabalho de Grover e o presente estudo podem justificar resultados distintos. O método de avaliação foi diferente, enquanto Grover utilizou a citometria de fluxo para avaliar a expressão de bcl-2, o presente estudo utilizou a expressão imunohistoquímica da mesma proteína. O material utilizado neste estudo foi oriundo de cortes de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina enquanto Grover utilizou peças “a fresco”. A análise de Grover constou de 42 metástases linfonodais de MC, enquanto este estudo avaliou 36 metástases linfonodais de MC. Grover acompanhou seus pacientes por um tempo médio de 45 meses; em nosso estudo, o tempo de acompanhamento foi contado

a partir do diagnóstico da primeira lesão metastática até uma nova lesão metastática, óbito ou final do estudo, o que resultou num tempo curto de acompanhamento.

Semelhante ao presente estudo, Leiter *et al.* não encontraram relação entre a sobrevivência e a expressão de bcl-2. Em seu trabalho, Leiter analisou a expressão de bcl-2 e de bcl-x<sub>L</sub>, através de PCR (“*polimerase chain reaction*”) e imunohistoquímica. As proteínas bcl-2 e bcl-x<sub>L</sub> apresentaram aumento de expressão com a progressão do MC (16).

Ao contrário, Selzer *et al.*, ao analisarem por “Western blotting” a expressão de Bcl-2, Bax, Bak, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-x<sub>S</sub>, Mcl-1 e Bad, em melanócitos normais, MC primário e metastático, encontraram taxas semelhantes dessas proteínas nos tecidos examinados. Baseados nesses resultados, eles sugerem que o bcl-2 e seus homólogos não desempenham um papel dominante na transformação maligna dos melanócitos (38). Loggini *et al.* também não encontraram relação entre a expressão de bcl-2 em melanoma primário e a resistência a múltiplas drogas (39).

Em nosso estudo, não houve relação entre a positividade de bcl-2 e a sobrevivência nos três tipos de metástases. Tal fato pode ser interpretado de três formas distintas: realmente não há relação entre a expressão imunohistoquímica da proteína bcl-2 em metástases de MC; essa relação existe, porém não foi determinada por uma amostra pequena e pouco tempo de acompanhamento; a existência de interação entre os demais membros da família BCL-2. A regulação dos componentes pró e antiapoptóticos da família BCL-2 é complexa. Muitos membros dessa família estão ainda sendo descobertos como o Bim e o GRS (40 e 41). As relações entre os membros pró e antiapoptóticos ocorrem através da formação de homo e heterodímeros entre os membros da família e suas proteínas de ligação. A função da proteína bcl-2 pode ser alterada ao ligar-se com o BAG1, bad e bax, assim como com outros membros da

família como bcl-x<sub>L</sub> e bcl-x<sub>S</sub>. O proto-oncogene Bcl-x<sub>L</sub>, assim como o Bcl-2, funciona como um inibidor da apoptose, enquanto o Bcl-x<sub>S</sub> serve como um inibidor negativo dominante do Bcl-x<sub>L</sub> e do Bcl-2. A proteína de ligação do Bcl-2, BAG1, inibe a apoptose, enquanto o Bad e Bax promovem a apoptose. A habilidade do Bcl-2 de inibir a apoptose depende do balanço intracelular entre os membros de sua família (7). A função do Bcl-2 e do Bcl-x<sub>L</sub> pode ser modificada pelo Bax levando à aceleração da apoptose através da formação de heterodímeros (16). A relação bax/bcl-2 determina a suscetibilidade de células de melanoma humano *in vitro* a apoptose induzida por CD95/Fas, sendo que uma baixa proporção caracteriza as células resistentes e uma alta proporção caracteriza as células sensíveis à apoptose induzida por esse estímulo (42). As complexas relações entre os membros da família BCL-2 são apenas parcialmente conhecidas até o momento. Possivelmente, no futuro, o conhecimento mais aprofundado de suas inter-relações e principalmente de sua funcionalidade, não só de sua presença, propicie uma utilização adequada dos membros da família BCL-2 para a predição da sobrevida em MC.

Outro dado interessante sobre o papel do Bcl-2 no melanoma, é a observação de que terapias com oligonucleotídeos voltadas à redução da expressão de bcl-2 tornam células de melanoma, em ratos (SCDI – *Severe Combined Immunodeficient*) e em humanos com MC metastático, mais sensíveis à quimioterapia (5, 44, 45, 46, 47, 48 e 49). Esses oligonucleotídeos são partes quimicamente modificadas de uma fita única de DNA, que são regiões complementares de códons específicos do RNA-mensageiro de um gene alvo, e são capazes de inibir a expressão desse gene (5). Isso demonstra que a proteína bcl-2 desempenha um papel importante, embora ainda não totalmente entendido, na quimiorresistência no MC.



Tais dados demonstram que um entendimento mais amplo das ações e relações entre os membros da família BCL-2 será necessário mediante estudos posteriores, para realmente ser definido o papel exato da proteína bcl-2 na patogênese e prognóstico do melanoma cutâneo primário e metastático e em vários outros tumores (45 e 46)

## CONCLUSÃO

A relação entre a expressão da proteína bcl-2 e a sobrevida em melanoma metastático ainda é controversa. Nosso estudo não encontrou relação entre essas variáveis. O interesse crescente, demonstrado por um número cada vez maior de estudos sobre terapias que alterem o funcionamento de proteínas da família BCL-2, demonstra que um entendimento mais amplo das ações e relações entre os membros dessa família se faz necessário. Estudos posteriores definirão o papel da proteína bcl-2, e das demais proteínas da família BCL-2, na patogênese, prognóstico e resposta aos novos tratamentos no melanoma cutâneo primário e metastático.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao Dr. Luis Fernando Rivero, Professor do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo apoio e instrução na avaliação imunoistoquímica deste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Markowitz JS, Cosimi LA, Carey RW, Kang S, Padyk C, Sober AJ, et al. Prognosis after initial recurrence of cutaneous melanoma. Arch Surg 1991 Jun;126:703-08.
- 2- Gilchrist BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. NEJM 1999 Apr 29;340(7):1341-48.
- 3- Stadelmann WK, Rapaport DP, Soong S-J, Reintgen DS, Buzaid AC, Balch CM. Prognostic Clinical pathologic features. In: Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong S-J. Cutaneous Melanoma. Third edition. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc. 1998. p.11-35.
- 4- Runger TM, Emmert S, Schadendorf D, Diem C, Epe B, Hllfritsch D. Alterations of repair in melanoma cell lines resistant to Cisplatin, Fotemustine, or Etoposide. J Invest Dermatol 2000 Jan;114(1):34.
- 5- Jansen B, Schlagbauer-Wadl H, Brown BD, Bryan RN, Elsas AV, Muller, et al. *bcl-2* antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. Nat Med 1998 Feb;4(2):232-34.
- 6- Miller LJ, Marx J. Apoptosis [editorial]. Science 1998 Aug 28;281:1301.
- 7- Meterissian SH. Apoptosis: its role in the progression of and chemotherapy for carcinoma. J Am Col Surg 1997 Jun;184:658-66.
- 8- Wong CW, Lee A, Shientag L, Yu J, Dong Y, Kao G, et al. Apoptosis: an early event in metastatic inefficiency. Cancer Res 2001 Jan 01;61:333-38.
- 9- Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. Blood 1992 Aug 15;80(4):879-86.

- 10- Reed JA, Albino AP. Update of diagnostic and prognostic markers in cutaneous malignant melanoma. *Dermatol Clin* 1999 Jul;17(3):631-43.
- 11- Adams JM, Cory S. The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998 Aug 28;281:1322-26.
- 12- Grover R, Wilson GD. Bcl-2 expression in malignant melanoma and its prognostic significance. *Eur J Surg Oncol* 1996;22(4):347-49.
- 13- Mikhail M, Velasquez E, Shapiro R, Berman R, Pavlik A, Sorhaindo L, Spira J, Mir C, Panageas KS, Polsky D, Osman I. PTEN Expression in Melanoma: relationship with patient survival, Bcl-2 expression, and proliferation. *Clin Cancer Res* 2005 Jul 15;11(14):5153-7.
- 14- Tron VA, Krajewski S, Klein-Parker H, Li G, Ho VC, Reed JC. Immunohistochemical analysis of bcl-2 protein regulation in cutaneous melanoma. *Am J Pathol* 1995 Mar;146(3):643-50.
- 15- Tang L, Tron VA, Reed JC, Mah KJ, Krajewska M, Li G, et al. Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 1998 Aug;4:1865-71.
- 16- Leiter U, Schmid RL, Kaskel P, Peter RA, Krähn G. Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced melanoma. *Arch Dermatol Res* 2000;292:225-32.
- 17- Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *The Lancet* 1993 May 15;341:1251-54.
- 18- Plettenberg A, Ballaun C, Pammer J, Mildner M, StrunkD, Weninger W, et al. Human melanocytes and melanoma cells constitutively Express the bcl-2 proto-oncogene *in situ* and in cell culture. *Am J Pathol* 1995 Mar;146(3):651-59.
- 19- Lu Q-L, Abel P, Foster C, Lalani E-N. bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol* 1996 Feb;27(2):102-10.

- 20-** Takaoka A, Adachi M, Okuda H, Sato S, Yawata A, Hinoda Y, et al. Anti-cell death activity promotes pulmonary metastasis of melanoma cells. *Oncogene* 1997 Jun 19;14(24):2971-77.
- 21-** Shaw HM, McGovern VJ, Milton GW, Faraco GA, McCarthy WH. Histologic features of tumors and the female superiority in survival from malignant melanoma. *Cancer* 1980 Apr 01;45:1604-08.
- 22-** Drzewiecki KT, Andersen K. Survival with malignant melanoma – A regression analysis of prognostic factors. *Cancer* 1982 Jun. 01;49:2414-19.
- 23-** Masback A, Olsson H, Westerdahl J, Ingvar C, Jonsson N. Prognostic factors in invasive cutaneous malignant melanoma: a population-based study and review [abstract]. *Melanoma Res* 2001 Oct;11(5):435-45.
- 24-** Molife R, Lorigan P, MacNeil S. Gender and survival in malignant tumours. *Cancer Treat Rev* 2001 Aug;27(4):201-09.
- 25-** Gershenwald JE, Sussman JJ, Lee JE. Melanoma. In: Feig BW, Berger DH, Fuhrman GM. *The M. D. Anderson surgical oncology Handbook*. Second edition. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins; 1999. p.38-68.
- 26-** Barth A, Wanek LA, Morton CL. Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. *J Am Coll Surg* 1995 Sep;181(3):193-201.
- 27-** Osborne JE, Hutchinson PE. Clinical correlates of Breslow thickness of malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2001 Mar;144(3):476-83.
- 28-** Fernandez-Pol JA, Douglas MG. Molecular interactions of cancer and age. *Hem/Oncol Clin Nort Am* 2000 Feb;14(1):25-44.
- 29-** Garbe C, Blum A. Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide [abstract]. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001 Sep-Oct;14(5):280-90.

- 30-** Ryan L, Kramar A, Borden E. Prognostic factors in metastatic melanoma. *Cancer* 1993 May 15;71(10):2995-3005.
- 31-** Eberlein TJ. Prognosis of patients with advanced melanoma. *J Am Coll Surg* 1995 Sep;181:263-65.
- 32-** Presant CA, Bartolucci AA, Southeastern Cancer Study Group. Prognostic factors in metastatic malignant melanoma – the southeastern cancer study group experience. *Cancer* 1982 May 15;49:2192-96.
- 33-** Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, Urist M, McMasters KM, Ross MI, Kirkwood JM, Atkins MB, Thompson JA, Coit DG, Byrd D, Desmond R, Zhang Y, Liu PY, Lyman GH, Morabito A. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 2001 Aug 15;19(16):3622-34
- 34-** Rodriguez-Villanueva, Colome MI, Brisbay S, McDonnell TJ. The expression and localization of bcl-2 protein in normal skin and in non-melanoma skin cancer. *Path Res Pract* 1995;191(5):391-98.
- 35-** Collins KA, White WL. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and bcl-2 are differentially expressed in early evolving malignant melanoma. *Am J Dermatopathol* 1995;17(5):429-38.
- 36-** Ramsay JA, From L, Kahn HJ. Bcl-2 protein expression in melanocytic neoplasms of the skin. *Mod Pathol* 1995 Feb;8(2):150-54.
- 37-** van den Oord JJ, Vandeghinste N, de Ley M, De Wolf-Peeters C. Bcl-2 expression in human melanocytes and melanocytic tumors. *Am J Pathol* 1994 Aug;145(2):294-300.

- 38-** Morales-Ducret CRJ, van de Rijn M, LeBrun DP, Smoller BR. Bcl-2 expression in primary malignancies of the skin. *Arch Dermatol* 1995 Aug;131:909-12.
- 39-** Selzer E, Schlagbauer-Wadl H, Okamoto I, Pehamberger H, Potter R, Jansen B. Expression of bcl-2 family members in human melanocytes, in melanoma metastases and melanoma cell lines [abstract]. *Melanoma Res* 1998 Jun;8(3):197-203.
- 40-** Loggini B, Rinaldi I, Pingitore R, Cristofani R, Castagna M, Barachini P. Immunohistochemical study of 49 cutaneous melanoma: p53, PCNA, bcl-2 expression and multidrug resistance [abstract]. *Tumori* 2001 May-Jun;87(3):179-86.
- 41-** O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, et al. Bim: a novel member of the bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* 1998;17:384-95.
- 42-** Kenny JJ, Knobloch TJ, Augustus M, Carter KC, Rosen CA, Lang JC. GRS, a novel member of the bcl-2 gene family, is highly expressed in multiple cancer cell lines and in normal leukocytes. *Oncogene* 1997 Feb 27;14(8):997-1001.
- 43-** Raisova M, Hossini AM, Eberle J, Riebeling C, Wieder T, Sturm I, et al. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol* 2001 Aug;117(2):333-40.
- 44-** Jansen B, Wacheck V, Heere-ress E, Schlagbauer-Wadl H, Hoeller C, Lucas T, et al. Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. *Lancet* 2000 Nov 18;356:1728-33.
- 45-** Letai A. Pharmacological manipulation of Bcl-2 family members to control cell death. *J Clin Invest.* 2005 October 1; 115(10): 2648–2655.



- 46-** Alvarez MG, Besa PC. Multidisciplinary approach to cancer. *Surgical Clinics of North America*. April 2000. 80; 2 in  
<http://www.mdconsult.com/das/article/body/83132608-2/jorg=journal&source=MI&sp=11319953&sid=0/N/176200/1.html#top>
- 47-** Wolter KG, Verhaegen M, Fernandez Y, Nikolovska-Coleska Z, Riblett M, de la Vega CM, Wang S, Soengas MS. Therapeutic window for melanoma treatment provided by selective effects of the proteasome on Bcl-2 proteins. *Cell Death Differ* 2007 Sep 14;9:1605-16.
- 48-** Tarhini AA, Kirkwood JM. Oblimersen in the treatment of metastatic melanoma. *Future Oncol* 2007 Jun 3;3:263-71.
- 49-** Mena S, Benlloch M, Ortega A, Carretero J, Obrador E, Asensi M, Petschen I, Brown BD, Estrela JM. Bcl-2 and glutathione depletion sensitizes B16 melanoma to combination therapy and eliminates metastatic disease. *Clin Cancer Res* 2007 May 13;9:2658:66.

Tabela I: Graus de positividade e intensidade da reação imunoistoquímica à proteína bcl-2 em metástases de melanoma cutâneo

<b>bcl-2</b>	<b>Negativo (%)</b>	<b>Positivo I (%)</b>	<b>Positivo II (%)</b>	<b>Positivo total (%)</b>
<b>Metástase</b>				
<b>LINFONODAL</b>	9 (25,7)	9 (25,7)	17 (48,6)	26 (74,3)
<b>SUBCUTÂNEA</b>	4 (14,3)	4 (14,3)	20 (71,4)	24 (85,7)
<b>VISCERAL</b>	3 (17,6)	3 (17,6)	11 (64,7)	14 (82,4)
<b>TOTAL</b>	16	16	48	

Tabela II: Presença da proteína bcl-2 entre os vivos, e entre os com lesão metastática sugerida por imagem e não ressecada ao final do estudo. A porcentagem, na coluna bcl-2 positivo e metástase não ressecada, refere-se ao número total de pacientes vivos ao final do estudo com bcl-2 positivo.

	<b>Vivos ao final do estudo (%)</b>	<b>bcl-2 positivo entre os vivos (%)</b>	<b>bcl-2 positivo e metástase não ressecada (%)</b>	<b>Valor de P</b>
<b>LINFONODAL</b>	19 (54,3)	14 (73,7)	4 (28,7)	1,0
<b>SUBCUTÂNEA</b>	12 (42,8)	11 (91,7)	8 (72,7)	0,333
<b>VISCERAL</b>	7 (41,2)	6 (85,7)	4 (66,6)	0,429

Tabela III: Teste qui-quadrado para a presença da proteína bcl-2 nos três tipos de metástases ( $\chi^2 = 1,34$ ;  $P=0,510$ ).

	bcl-2 positivo (%)	bcl-2 negativo (%)	TOTAL (%)
<b>LINFONODAL</b>	26 (74,3)	9 (25,7)	35 (100)
<b>SUBCUTÂNEA</b>	24 (85,7)	4 (14,3)	28 (100)
<b>VISCERAL</b>	14 (82,3)	3 (17,7)	17 (100)
<b>TOTAL</b>	64 (80,0)	16 (20,0)	80 (100)

Tabela IV: Análise Univariada de Cox das metástases linfonodais em relação a sexo, idade e presença da proteína bcl-2.

	Total (%)	Óbitos N (%)	RR * (IC 95%)
<b>SEXO</b>			
<b>MASCULINO</b>	19 (54,3)	10 (52,6)	1,872 (0,679 a 5,160)
<b>FEMININO</b>	16 (45,7)	06 (37,5)	1,0
<b>IDADE</b>			
<b>&gt; 60 ANOS</b>	5 (14,3)	4 (80)	2,606 (0,824 a 8,245)
<b>&lt;= a 60 ANOS</b>	30 (85,7)	12 (40)	1,0
<b>bcl-2</b>			
<b>POSITIVO</b>	26 (74,3)	12 (46,1)	1,103 (0,353 a 3,445)
<b>NEGATIVO</b>	09 (25,7)	04 (44,4)	1,0

\* Risco Relativo estimado através da regressão de Cox.

Tabela V: Análise Univariada de Cox das metástases subcutâneas em relação a sexo, idade e presença da proteína bcl-2.

	<b>Total (%)</b>	<b>Óbitos N (%)</b>	<b>RR * (IC 95%)</b>
<b>SEXO</b>			
<b>MASCULINO</b>	16 (57,1)	12 (75)	2,664 (0,858 a 8,274)
<b>FEMININO</b>	12 (42,9)	04 (33,3)	1,0
<b>IDADE</b>			
<b>&gt; 60 ANOS</b>	05(17,9)	05 (100)	3,735 (1,209 a 11,536)†
<b>&lt;= A 60 ANOS</b>	23 (82,1)	11 (47,8)	1,0
<b>bcl-2</b>			
<b>POSITIVO</b>	24 (85,7)	13 (54,2)	0,854 (0,238 a 3,064)
<b>NEGATIVO</b>	04 (14,3)	03 (75,0)	1,0

\* Risco Relativo estimado através da regressão de Cox.

† P= 0,022

Tabela VI: Análise Univariada de Cox das metástases viscerais em relação a sexo, idade e presença da proteína bcl-2.

	<b>Total (%)</b>	<b>Óbitos N (%)</b>	<b>RR * (IC 95%)</b>
<b>SEXO</b>			
<b>MASCULINO</b>	08 (47,1)	06 (75)	1,689 (0,403 a 7,076)
<b>FEMININO</b>	09 (52,9)	03 (33,3)	1,0
<b>IDADE</b>			
<b>&gt; 60 ANOS</b>	02 (11,8)	01 (50)	0,699 (0,085 a 5,742)
<b>&lt;= A 60 ANOS</b>	15(88,2)	08 (53,3)	1,0
<b>bcl-2</b>			
<b>POSITIVO</b>	14 (82,3)	08 (57,1)	0,334 (0,029 a 3,866)
<b>NEGATIVO</b>	03 (17,7)	01 (33,3)	1,0

\* Risco Relativo estimado através da regressão de Cox.

Tabela VII: Análise Multivariada de Cox das metástases subcutâneas em relação a sexo, idade e presença da proteína bcl-2.

	<b>Total (%)</b>	<b>Óbitos N (%)</b>	<b>RR * (IC 95%)</b>
<b>SEXO</b>			
<b>MASCULINO</b>	16 (57,1)	12 (75)	3,376 (1,057 a 10,787)†
<b>FEMININO</b>	12 (42,9)	04 (33,3)	1,0
<b>IDADE</b>			
<b>&gt; 60 ANOS</b>	05 (17,9)	05 (100)	5,062 (1,570 a 16,325)††
<b>&lt;= A 60 ANOS</b>	23 (82,1)	11 (47,1)	1,0
<b>bcl-2</b>			
<b>POSITIVO</b>	24 (85,7)	13 (54,2)	0,760 (0,207 a 2,797)
<b>NEGATIVO</b>	04 (14,3)	023 (75)	1,0

\* Risco Relativo estimado através da regressão de Cox.

† P=0,040

†† P=0,007

Figura I: Fotomicrografia de metástase linfonodal de MC apresentando reação intensa após coloração com a proteína bcl-2 (a coloração marrom escura e com padrão granular reflete a presença do pigmento melanina) (200x).

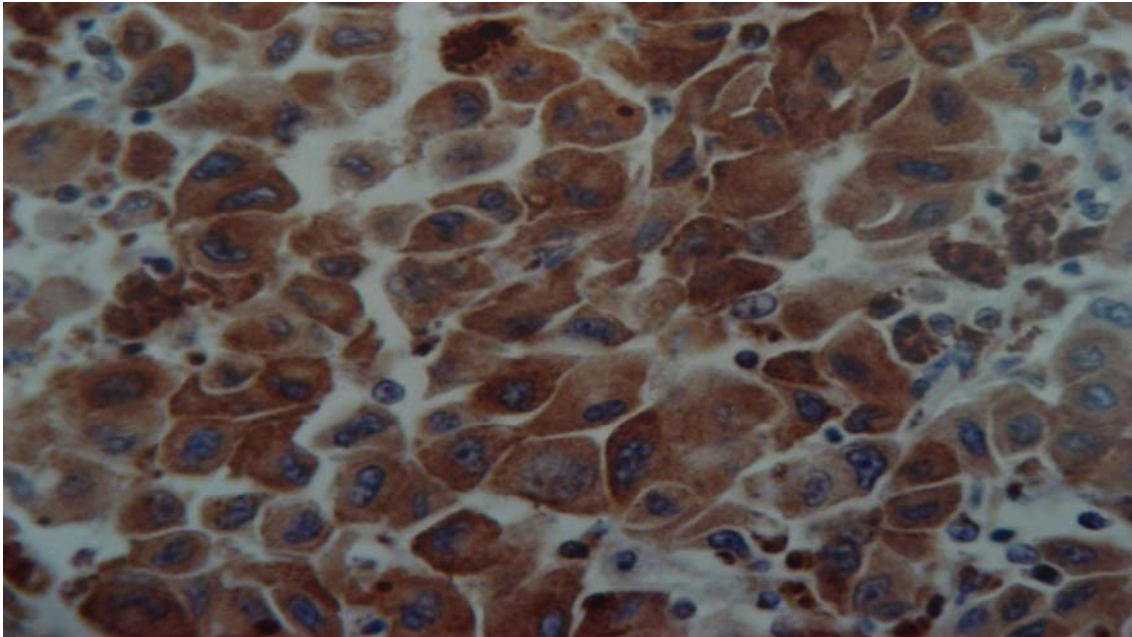


Figura II: Fotomicrografia de metástase linfonodal de MC exibindo reação fraca a proteína bcl-2 (Presença de melanófagos – macrófagos que fagocitaram melanina) (200x).

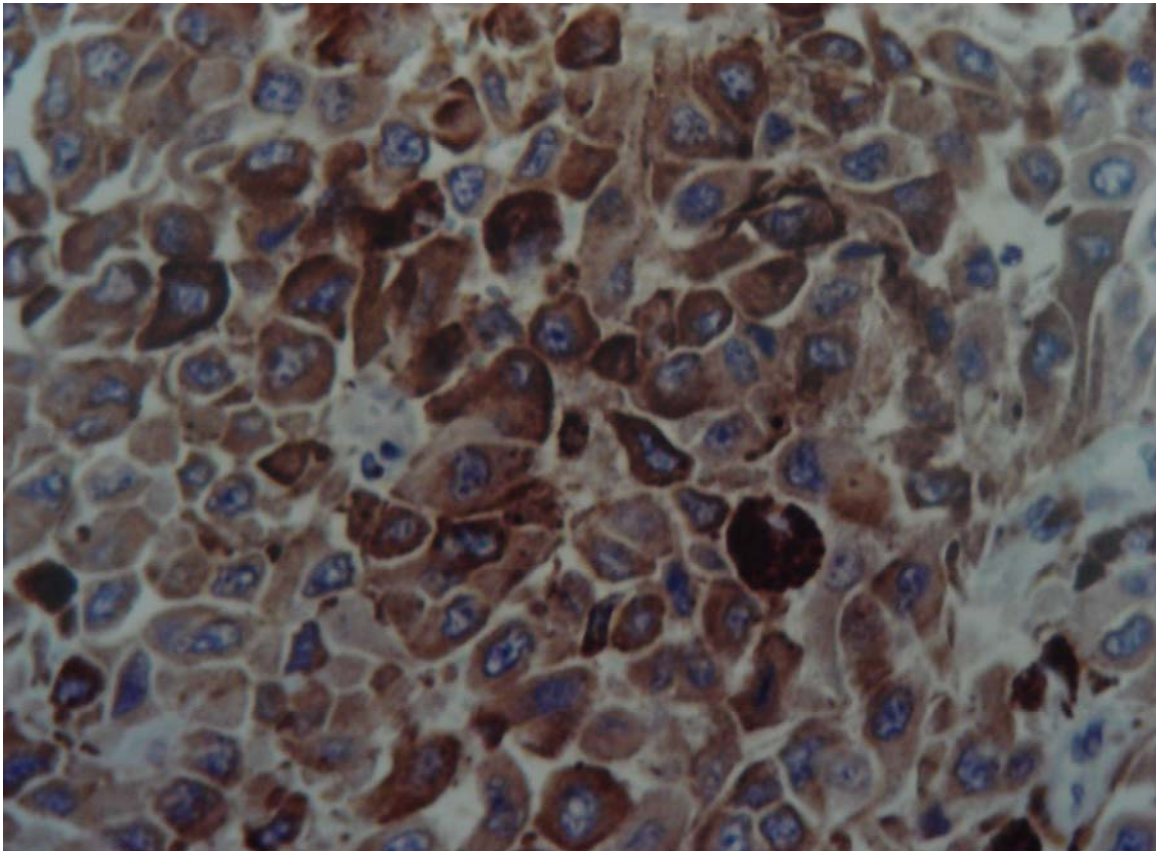




Figura III: Fotomicrografia de reação negativa à proteína bcl-2 em metástase linfonodal de MC (200x).

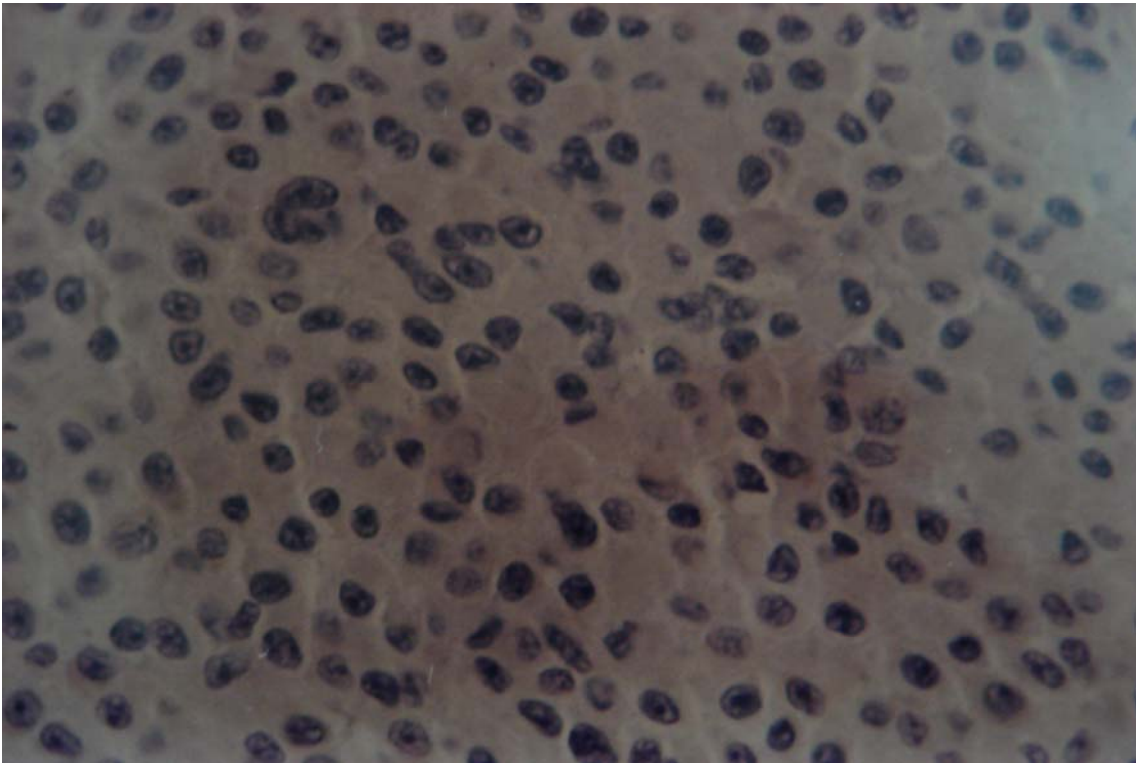


Figura IV: Fotomicrografia de metástase subcutânea de MC apresentando expressão forte da proteína bcl-2 (200x).

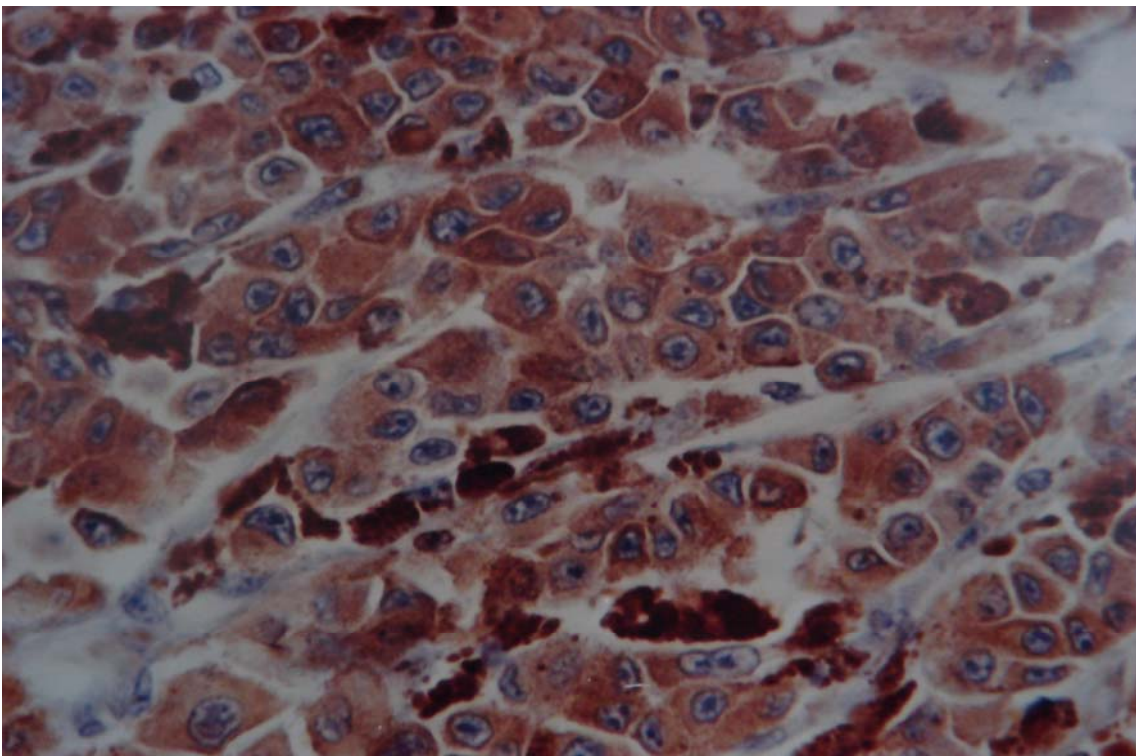


Figura V: Fotomicrografia de metástase subcutânea de MC exibindo coloração fraca da proteína bcl-2 (presença de melanina) (200x).

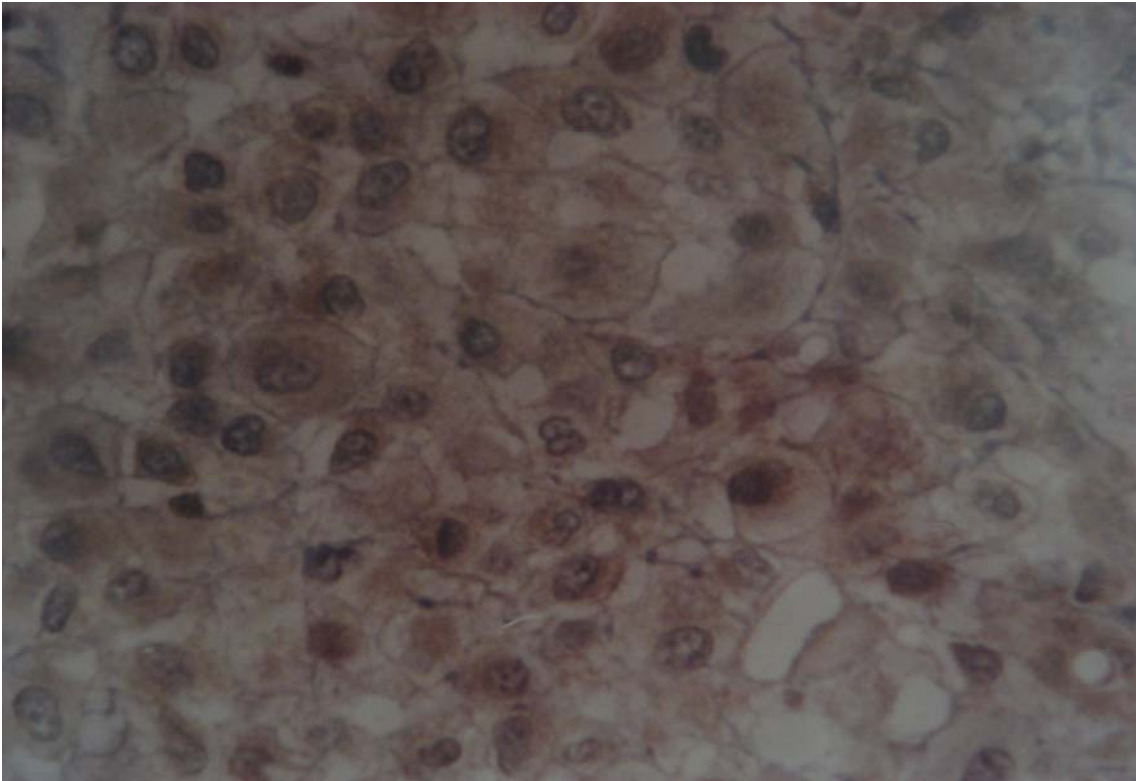


Figura VI: Fotomicrografia de reação negativa à proteína bcl-2 em metástase subcutânea de MC (200x).

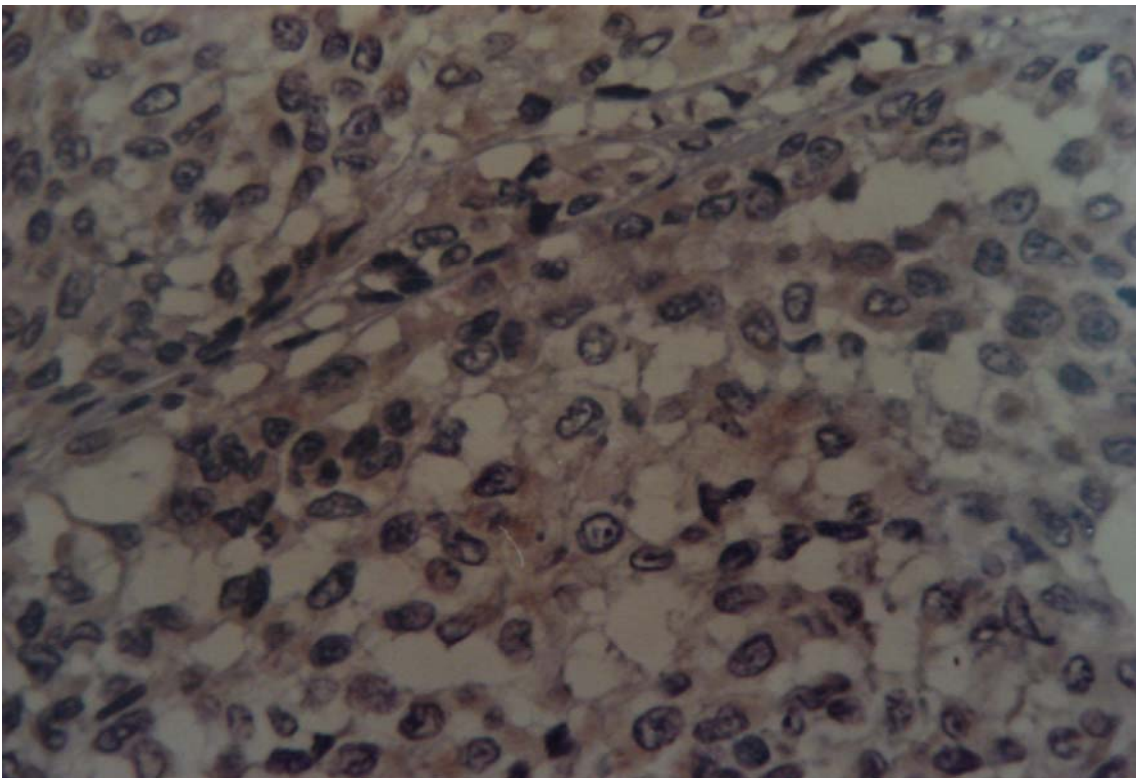




Figura VII: Fotomicrografia de metástase visceral de MC exibindo coloração intensa da proteína bcl-2 (200x).

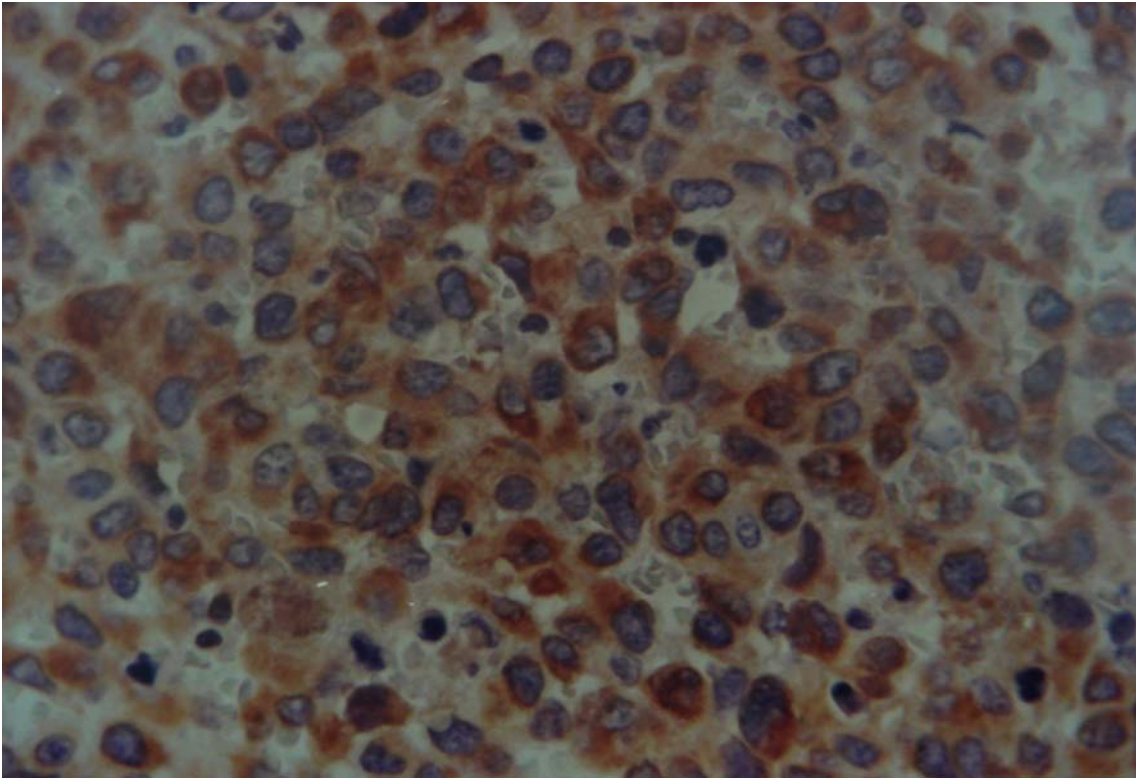


Figura VIII: Fotomicrografia de metástase visceral de MC apresentando reação fraca à proteína bcl-2 (200x).

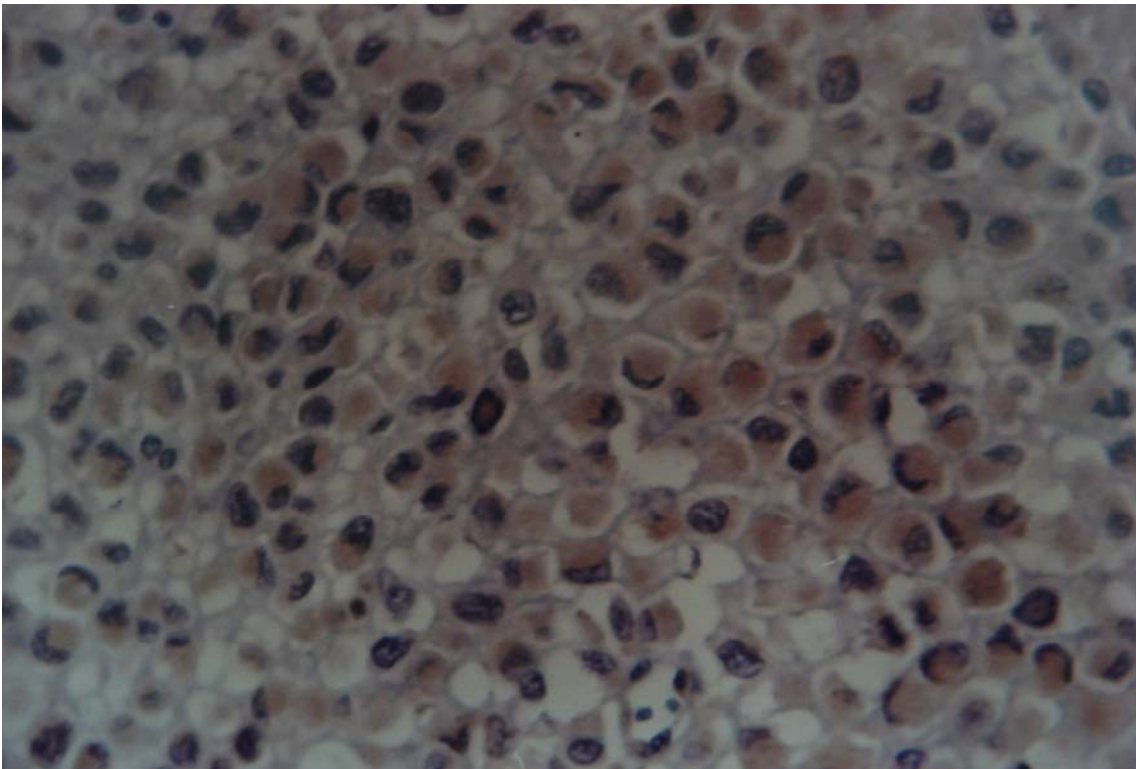
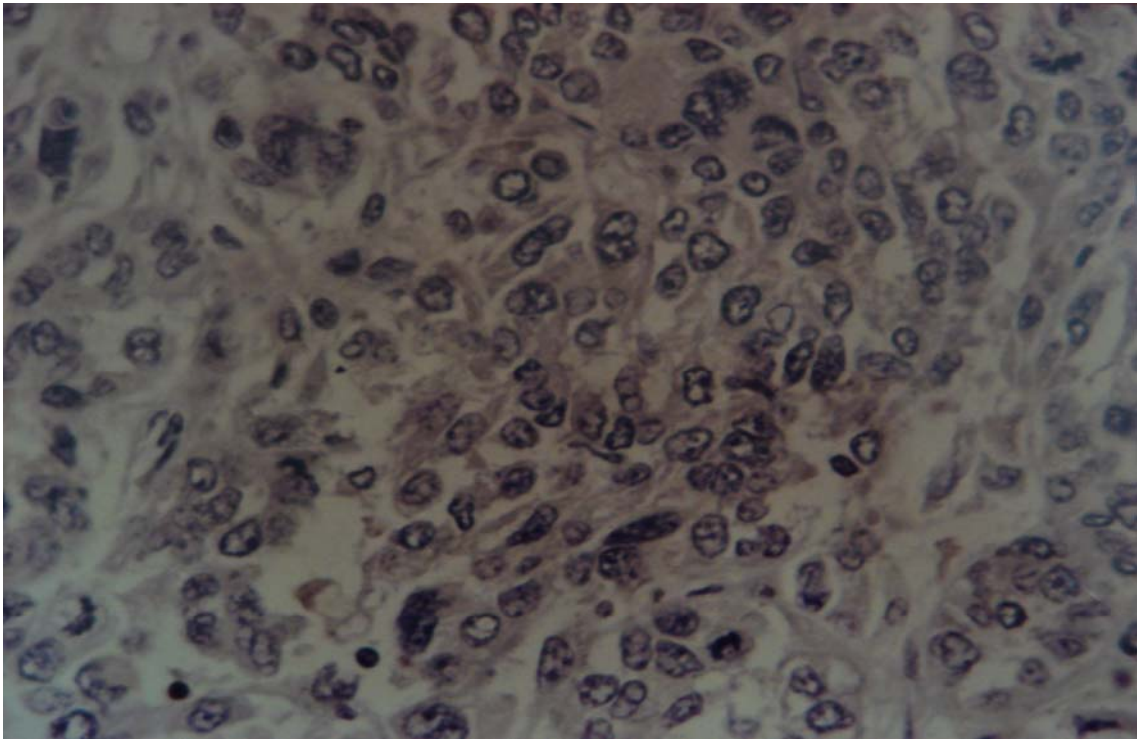


Figura IX: Fotomicrografia de reação negativa à proteína bcl-2 em metástase visceral de MC (200x).



## REVISÃO DE LITERATURA

O melanoma origina-se de células denominadas melanócitos, localizadas na camada basal da epiderme. Os melanócitos originam-se da crista neural e têm por função produzir melanina, um pigmento endógeno, não derivado da hemoglobina, com coloração marrom-escura. A melanina pode ser transferida a células vizinhas (queratinócitos), sob a forma de grânulos, através de prolongamentos celulares que se encontram entre as camadas mais superiores da epiderme (3). A melanina tem por função a proteção da pele da radiação ultravioleta. Essa função torna-se evidente após a exposição solar, aguda ou crônica, quando se nota um escurecimento da pele, denominado bronzeamento, que pode ser mais ou menos intenso conforme o tipo de pele do indivíduo .

Embora o MC represente apenas 4% das neoplasias malignas de pele, é o responsável por 79% das mortes por câncer de pele. Sua incidência tem aumentado grandemente nas últimas décadas. Uma taxa de aumento de 3 a 4% ao ano vem sendo observada, maior que a de qualquer outro câncer em humanos (20). Entre os nascidos na década de 1930, estimava-se que um entre cada 1.500 americanos desenvolveria MC durante a vida. Essa estimativa mudou para um em cada 74 nascidos na década de 2000 (21 e 22). Desde 1973, a incidência anual de MC nos Estados Unidos aumentou de 5,7 para 14,3/100.000 habitantes. A Sociedade Americana de Câncer estima que, no ano de 2002, naquele país, sejam diagnosticados cerca de 53.600 casos novos de MC (1). A maior taxa de incidência no mundo é em Queensland na Austrália, onde a incidência dobrou em homens, entre 1979 e 1987, chegando a 55,8 casos/100.000 habitantes e aumentando mais do que a metade em mulheres, totalizando 42,9 casos em 100.000 habitantes. Apesar de que uma grande proporção desse aumento foi representada por lesões de pouca espessura (até 0,75mm), que têm excelente prognóstico, a incidência de

lesões mais espessas (>3,00 mm), com pior prognóstico, quase dobrou em homens e aumentou cerca de 40% em mulheres (11). No Brasil, a incidência obtida a partir dos Registros de Câncer de Base Populacional de São Paulo, Porto Alegre, Recife e Fortaleza para os anos de 1978 a 1982 variou de 4,0 a 1,3 casos por 100.000 habitantes. A estimativa para incidência no ano de 2001 era de 2.930 casos no Brasil, com uma taxa/ano de 1,66/100.000 habitantes em homens e 1,70/100.000 habitantes em mulheres (4).

As taxas de mortalidade para melanoma, apesar das melhorias no diagnóstico e tratamentos cada vez mais eficientes, continuam aumentando. De 1973 a 2000, a taxa de mortalidade nos Estados Unidos cresceu de 1,6 para 2,3/100.000 habitantes e estima-se que cerca de 7.400 pessoas morrerão ao ano, a partir de 2001, por MC naquele país (1). Já a mortalidade na Austrália aumentou de 5,2 para 8,8/100.000 habitantes em homens e de 3,6 para 4,7/100.000 habitantes em mulheres, durante o período de 1965 a 1985 (11). No Brasil, previu-se uma taxa de mortalidade de 1.050 pessoas no ano de 2001, com uma taxa de 0,66/100.000 habitantes em homens e 0,50/100.000 habitantes em mulheres (4). Levando-se em conta o sub-registro, freqüente em nosso país, esses números devem, com certeza, ser bem maiores. Nos Estados Unidos, as taxas de mortalidade vêm mantendo-se estáveis nos últimos dez anos (1).

O aumento da incidência dos cânceres de pele não é ainda totalmente compreendido, mas o aumento da exposição solar total e, no caso do melanoma, a alteração no padrão de exposição solar têm sido fortemente implicados. O risco de melanoma é maior em pessoas de pele clara, especialmente aquelas com cabelo ruivo ou loiro que se queimam facilmente ao exporem-se ao sol, e naquelas com sardas. A incidência de melanoma em pessoas de pele clara é inversamente proporcional à

latitude de sua residência. A maior incidência mundial é na Austrália, um país subtropical com a maioria da população de origem celta. Os melanomas são incomuns em pessoas de pele escura. Nos Estados Unidos, a incidência entre negros é somente 1/10 da incidência entre brancos. Em negros e asiáticos, os melanomas tendem a ocorrer em sítios de pele não expostos ao sol, como leito ungueal e regiões palmar e plantar (melanoma acral) (11). Em famílias predispostas ao surgimento de nevus melanocíticos atípicos e melanomas por mutação do gene CDKN2A que codifica as proteínas supressoras de tumor p16 e p19 e possivelmente de outros genes, uma análise retrospectiva sugere que o aumento na incidência de melanoma, nas últimas gerações, deva-se ao aumento na exposição solar como fator de risco independente (23). O Rio Grande do Sul também possui uma grande parte de sua população de origem européia (pele, cabelos e olhos claros) e possui também um clima subtropical, com grandes períodos de exposição solar, o que poderia explicar o número crescente de casos de melanoma observado em nossos hospitais e clínicas.

A radiação solar divide-se em ultravioleta A (UVA) (320-400 nm) e ultravioleta B (UVB) (280-320 nm). Um dos fatores de risco para MC é o número de queimaduras solares, como medida de excesso de exposição. Como as queimaduras solares são primariamente causadas por radiação UVB, essa é a que tem sido implicada na patogênese do MC (24). Além disso, a radiação UVB é a radiação responsável pela formação de lesões principais no DNA (dímeros de pirimidina ciclobutano e fotoprodutos pirimidina (6-4) pirimidona) que se não forem corretamente corrigidas levam a mutações; também está relacionada com a indução de carcinoma epidermóide em ratos (23). Porém a largura de banda da radiação UVA (80 nm) é duas vezes a da radiação UVB (40 nm), e 90% a 95% da radiação solar UV (medida em watts por metro quadrado) que atinge a superfície da Terra é radiação UVA; somente 5% a 10%

correspondem a radiação UVB. Além da exposição à radiação solar, altas doses de radiação UVA podem ser emitidas por lâmpadas de bronzeamento artificial e unidades de terapia PUVA (psoralen e radiação UVA), para tratamento da psoríase (25). A radiação UVA tem maior comprimento de onda e, portanto, penetra mais profundamente na pele. Estima-se que cerca de 19% a 50 % da radiação solar UVA alcancem a profundidade dos melanócitos, enquanto somente cerca de 9% a 14% da radiação solar UVB consigam penetrar nesse nível. Essa propriedade de grande comprimento de onda da radiação UVA também lhe permite ultrapassar através da maioria das janelas de automóveis, escritórios e casas, enquanto a radiação UVB é bloqueada pelos vidros dessas janelas (23 e 24). Wang *et al.* demonstraram que a radiação UVA também causa dano ao DNA mediante reações de fotossensibilização, que resultam em radicais de oxigênio. As espécies reativas de oxigênio podem causar a quebra de uma das fitas de DNA, mutações, trocas entre as cromátides irmãs e aberrações cromossômicas que podem resultar em citotoxicidade e carcinogênese. Entretanto os ânions de oxigênio isolados e superóxidos, gerados pela radiação UVA1 (340 a 400 nm), podem causar lise da mitocôndria e induzir a apoptose em células em cultura. Wenczel *et al.* demonstraram que a pró-melanina e/ou a melanina intermediária são os cromóforos que mais comumente reagem com a radiação UVA, levando à quebra de uma das fitas de DNA. Marrot *et al.* sugerem que o pigmento endógeno ou moléculas relacionadas à melanina aumentam o dano ou quebra do DNA após irradiação UVA. Há evidências de que a quebra do DNA é maior em melanócitos que em fibroblastos, em células com alto conteúdo de melanina, e em células estimuladas para melanogênese por cultura em meios ricos em tirosina. Além disso, eles demonstraram um aumento no nível de expressão de p53 em melanócitos irradiados, sugerindo dano no DNA. Burren *et al.* sugerem, também, que o dano na pele humana é

causado tanto pela radiação UVA, quanto pela radiação UVB. A radiação UVA também induz imunossupressão, ao menos parcialmente, por uma via oxidativa (24).

Outras evidências sobre a ação da radiação solar causando danos no DNA foram obtidas pela observação de pacientes com Xeroderma Pigmentoso, uma doença familiar caracterizada por redução à metade da capacidade de reparo de fotoprodutos do DNA, induzidos por radiação ultravioleta. Os pacientes apresentam um risco de fotocarcinogênese multiplicado por 1.000, quando comparados à população em geral (23).

A radiação UVB é cerca de 1.000 vezes mais efetiva que a radiação UVA na produção de queimaduras solares. A radiação UVA, por outro lado, é muito mais potente em induzir escurecimento imediato e escurecimento persistente da pele em pessoas de pele mais escura (Fitzpatrick tipo III e IV) (Tabela V). Como a radiação UVA não produz eritema ou pigmentação em pessoas de pele mais clara (Fitzpatrick tipo I e II) e como a maioria dos protetores existentes no mercado não produz proteção efetiva para a radiação UVA, seus efeitos são virtualmente “silenciosos”. Isso também poderia explicar o aumento da incidência de melanoma, visto que pessoas, utilizando protetores solares, acabam expondo-se a um período maior de sol do que se exporiam sem o mesmo, e por fim recebem uma quantia bem maior de radiação UVA. Sobre a relação causal entre a exposição à radiação UVA e MC, até o momento as evidências epidemiológicas e de observações clínicas não foram conclusivas, embora sejam consistentes com a hipótese (24).

Tabela V: Classificação dos tipos de pele e dermatoheliose segundo Fitzpatrick

<b>Tipo de Pele</b>	<b>Cor da pele</b>	<b>Características</b>
<b>I</b>	Branca	Sempre queima, nunca bronzeia
<b>II</b>	Branca	Em geral queima, bronzeando menos que a média
<b>III</b>	Branca	Às vezes queima pouco, com bronzeamento mais ou menos médio
<b>IV</b>	Branca	Raras vezes queima, bronzeando mais que a média
<b>V</b>	Parda	Raras vezes queima, bronzeando profusamente
<b>VI</b>	Negra	Raras vezes queima, sendo profundamente pigmentada

O aumento na incidência de melanoma também tem sido relacionado com o número de queimaduras solares e período de sua ocorrência na vida. A existência de um período crítico da vida no qual haveria alta suscetibilidade à iniciação do MC, devido a excessivas doses de radiação UV, tem sido sugerida por alguns autores baseados em resultados de estudos em populações migrantes e em alguns outros do tipo caso-controle. Para avaliar essa hipótese, Pfahlberg *et al.*, analisaram dados sobre história de queimaduras solares em um estudo multicêntrico em países europeus, com 603 casos de melanoma e 627 controles da população. Ele analisou grupos com queimaduras na infância (até 15 anos) e na idade adulta (> 15 anos), não tendo encontrado diferença entre eles no risco para MC. Além disso, observou que um número maior do que cinco queimaduras solares durante a vida dobraram o risco de melanoma, independentemente do período da vida em que elas ocorreram (26).

Em melanócitos, uma única exposição a altas doses de radiação UV pode causar dano substancial no DNA, mas não causa apoptose (morte celular



programada – vide abaixo). Conseqüentemente, os melanócitos que sobrevivem podem conter mutações genéticas e continuarem a ter divisão celular. De fato, o surgimento de sardas em crianças, após uma exposição aguda a altas doses de radiação solar, é consistente com essa especulação, já que se acredita que as sardas representem clones de melanócitos com mutações e que sua presença esteja associada a um aumento no risco de MC. Os melanócitos que sobrevivem são muito lesados por exposições intermitentes a altas doses de radiação ultravioleta, quando o seu conteúdo de melanina e sua capacidade basal de reparo de danos do DNA são baixos, ou menos lesados durante exposições freqüentes a baixas doses de radiação UV, quando seu conteúdo de melanina e sua capacidade de corrigir danos no DNA são altos. Assim, espera-se que exposições intermitentes a altas doses de radiação UV sejam mais relacionadas com a gênese de MC do que exposições mais freqüentes a doses mais baixas radiação UV, pela baixa capacidade de reparo do DNA e acúmulo de danos celulares no primeiro caso. Conseqüentemente, o efeito final da radiação UV não deve ser atribuído simplesmente à dose cumulativa - a soma aritmética de todas as exposições individuais durante a vida - mas deve ser fortemente influenciado pela dose por exposição e pelo padrão de exposições (23).

Para evitar os potenciais efeitos deletérios da radiação UV, as atuais recomendações da Academia Americana de Dermatologia são que se evite a exposição ao sol do meio-dia, utilizem-se protetores solares de amplo espectro e roupas com capacidade reconhecida de proteção contra radiação UV (22).

Os fatores de risco aceitos para o desenvolvimento do MC são os seguintes: exposição solar cumulativa durante a vida; episódios de exposição solar intensa aguda; número de queimaduras solares durante a vida; síndrome do nevo displásico; imunossupressão; história familiar positiva para MC em familiar de primeiro

grau; uso de câmeras de bronzamento ou PUVA; nível socioeconômico elevado; número de nevos melanocíticos; pele clara; olhos claros; cabelos loiros ou ruivos; presença de ceratoses actínicas e xeroderma pigmentoso (22 e 25).

Após o diagnóstico de MC, vários fatores clínicos e patológicos são reconhecidos como de valor prognóstico: sexo, localização anatômica da lesão primária, idade, espessura tumoral (índice de Breslow – Tabela I), presença de ulceração, nível de invasão histológica (nível de Clark – Tabela II), padrão de crescimento, presença de regressão, presença de microsatelitoses (à microscopia) e atividade mitótica (11 e 27). Garbe *et al.*, em um estudo multicêntrico que reuniu 5.264 pacientes de quatro centros germânicos de dermatologia, utilizando análise multivariada de Cox, encontraram a espessura do tumor, sexo, localização anatômica, como fatores prognósticos independentes altamente significativos ( $P < 0,0001$ ). Entretanto os subtipos histológicos nodular e acral, bem como a idade foram menos significantes ( $P < 0,05$ ). Como fatores de pior prognóstico, eles encontraram a espessura tumoral (quatro mm pior que três mm; três mm pior que dois mm; dois mm pior que um mm; um mm pior que 0,9mm); o nível de Clark (III ou maior, pior que II); sexo (masculino pior que feminino); localização anatômica (tórax, membros superiores, região cervical e couro cabeludo – regiões denominadas “TANS” pior que outras localizações) (28); subtipo histológico (acral e nodular piores que lentigo maligno e espalhamento superficial) e idade (mais de 60 anos de idade pior que 60 anos ou menos). Entretanto esses autores, por basearem seus estudos em dados retrospectivos, não puderam avaliar a influência da ulceração, regressão e mitoses, pois esses dados não estavam disponíveis em todos os registros (29).

Com relação à localização anatômica, Wong *et al.* realizaram uma análise retrospectiva de um banco de dados de 3.428 pacientes, acompanhados de 1971

a 1989, com MC primário com ou sem metástases linfonodais regionais, comparando MC nas chamadas áreas “BANS” (região dorsal, braços, cabeça e pescoço). Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição dos níveis de Clark ou na extensão do envolvimento linfonodal entre zonas “BANS” e não-“BANS”. A sobrevida, em cinco anos, dos pacientes com MC primário sem metástases linfonodais foi de 87% nos localizados em zonas “BANS” e de 89% nas zonas não-“BANS”. A sobrevida, em cinco anos, no grupo com metástases linfonodais foi de 38% nos localizados em zonas “BANS” e de 69%, em zonas não-“BANS”. Os dados parecem correlacionar um pior prognóstico para pacientes com MC originados nessas áreas e com metástases linfonodais regionais (30).

Büttner *et al.*, analisando dados de 5.093 pacientes de quatro centros germânicos de dermatologia, encontraram uma relação linear entre a espessura do tumor e o risco de morte causada por MC com até seis mm de espessura (31).

Com relação à possível influência do gênero na sobrevida do MC, Shaw *et al.* analisaram dados computadorizados de 780 pacientes com MC atendidos na Clínica de Melanoma do Hospital de Sydney entre janeiro de 1950 e março de 1978, sendo 372 homens e 408 mulheres. Foram examinados a espessura do tumor, evidência de regressão, tipo histopatológico e atividade mitótica. A média da espessura do tumor foi menor nas mulheres e maior nos homens. Tanto em homens, quanto em mulheres, provou-se uma correlação direta entre a espessura do tumor e a sobrevida em cinco anos, mas as mulheres apresentaram uma taxa de sobrevida maior do que os homens em cada nível de espessura. Esses últimos dois achados, em combinação, podem contribuir para a superioridade feminina geral na sobrevida. Não foram encontradas outras correlações entre o sexo e a sobrevida ao comparar-se outras características histopatológicas (32). Stadelmann *et al.* estratificaram os fatores de risco pelos estágios

do MC. Os fatores do MC estágios I e II foram espessura do tumor, presença de ulceração, localização anatômica, tipo de tratamento cirúrgico (margens), nível de invasão e sexo. As sobrevidas estimadas em cinco anos para os estágios I e II são 93% e 77%, respectivamente. Já em estágio III, detectou-se que a cada metástase linfonodal desenvolvida, as características do tumor primário assumem significado cada vez menor na predição da sobrevida. Na base de dados da Universidade do Alabama e da Unidade de Melanoma de Sydney (UAB-SMU), em análise multivariada, não houve diferença estatisticamente significativa entre sexos, tamanho de linfonodos palpáveis, intervalo livre de doença e idade do diagnóstico inicial em pacientes em estágio III. Quanto ao número de linfonodos comprometidos houve uma variação de sobrevida da seguinte ordem: um linfonodo, 40%; dois a quatro linfonodos, 26% e cinco ou mais linfonodos, 15% em 10 anos ( $P < 0,001$ ). Em melanoma, como na maioria dos tumores sólidos, um dos mais poderosos indicadores prognósticos de sobrevida é a extensão do envolvimento linfonodal. Em pacientes com MC, a presença de linfonodos metastáticos reduz a sobrevida em cinco anos em 40%, quando comparados com pacientes sem comprometimento linfonodal. Embora muitos outros fatores relacionados ao tumor primário devam ser levados em consideração, como determinantes do prognóstico para modelos de sobrevida, todos são relativamente sem importância quando se considera a presença de metástases linfonodais. A sobrevida média em pacientes em estágio III é de cerca de 41% em cinco anos. Pacientes em estágio IV (metástases a distância) apresentam um pior prognóstico, com uma média de sobrevida, após o diagnóstico da metástase a distância, de 6,0 a 7,5 meses e sobrevida, em cinco anos, de aproximadamente 6%. Perdem sua importância prognóstica nesse estágio o sexo, a localização do tumor primário e a idade, embora pacientes em estágio IV tendam a ser mais velhos que pacientes em estágios I e II. Já o intervalo livre de doença, se maior

que 12 meses, associa-se a melhor prognóstico. Outro fator de grande importância é o sítio da metástase a distância. Existe uma diferença importante entre sítios viscerais e não viscerais. Em análise multivariada, a presença de metástase não visceral isolada (por exemplo, tecido celular subcutâneo ou tecido muscular esquelético) apresenta uma média de sobrevida após o diagnóstico, de oito meses, com uma sobrevida, em um ano, de 48%. A presença de metástases viscerais, com ou sem metástases não viscerais associadas, reduz a sobrevida média para três meses, após o diagnóstico, e a sobrevida, em um ano, para 18%. O número de sítios metastáticos também é de importância, sendo que quanto menor o número de sítios, melhor o prognóstico. Outros fatores de bom prognóstico são o sexo feminino, bom estado geral (“*status performance*”), ausência de envolvimento hepático e presença de envolvimento ósseo isolado (11).

Em uma outra série, Barth *et al.* analisaram retrospectivamente dados armazenados de 1.521 pacientes em estágio IV tratados no *John Wayne Cancer Institute*, durante o período entre 1971 e 1993. A média de sobrevida foi de 7,5 meses, e a taxa estimada de sobrevida, em cinco anos, foi de 6 %. Três variáveis independentes foram positivas na predição de sobrevida: sítio inicial da metástase, intervalo livre de doença antes da metástase a distância e o estágio da doença antes do surgimento da metástase a distância. As metástases linfonodais, subcutâneas ou gastrointestinais (não-hepáticas) apresentaram uma média de sobrevida de 12,5 meses, com uma sobrevida estimada, em cinco anos, de 14%. Já as metástases pulmonares obtiveram uma média de sobrevida de 8,3 meses, com sobrevida estimada, em cinco anos, de 4% e as metástases hepáticas, cerebrais ou ósseas, uma média de sobrevida de 4,4 meses e a sobrevida, estimada em cinco anos, de 3%. Não houve modificação significativa na taxa de sobrevida em cinco anos para pacientes com estágio IV a despeito das novas modalidades de tratamento surgidas (33). Ryan *et al.*, Eberlein e Presant *et al.*

encontraram resultados semelhantes em relação à presença de metástases hepáticas, pulmonares, número de sítios metastáticos não ósseos, baixo estado geral (“*status performance*”) e presença de sintomas relacionados à metástase como indicativos de pior prognóstico (34, 35 e 36).

Markowitz *et al.*, em uma série de 231 pacientes com MC metastático, encontraram como sítio primário de recorrência linfonodos regionais (41%), tecido celular subcutâneo (36%) e vísceras (23%). A média de intervalo livre de doença foi de 32 meses (um a 218 meses). Não houve diferença estatisticamente significativa no intervalo livre de doença entre metástases subcutâneas (média de 37 meses), linfonodais (média de 30 meses) e viscerais (média de 25 meses). Não houve diferença estatisticamente significativa na sobrevida dos grupos de recorrência subcutânea e linfonodal, porém os com metástases viscerais tiveram um pior prognóstico. Após a análise multivariada, o fator mais importante foi o sítio inicial da recorrência, com a metástase visceral com apenas 11% de sobrevida em cinco anos; porém, se a ressecção cirúrgica foi completa e quimioterapia agressiva, cinco (25%) dos 20 pacientes sobreviveram até cinco anos. Estágio da doença no momento do diagnóstico inicial foi o segundo fator de risco independente mais importante. O fator de risco final foi o gênero: 1,4 homem para cada mulher. Shaw, Karakousis e Reingten, ao avaliarem séries diferentes de pacientes inicialmente em estágio I que evoluíram para lesões metastáticas, também encontraram que a sobrevida depende apenas, ou principalmente, do sítio metastático, com pior sobrevida esperada para pacientes com metástases viscerais (20). Já Schlagenhauff *et al.*, analisando metástases cutâneas, subcutâneas, linfonodais e viscerais de MC de sítio primário indeterminado, encontraram uma sobrevida semelhante entre os estágios com os casos de MC de sítio primário conhecido (37).

O tratamento para o MC metastático permanece basicamente cirúrgico sendo que a ressecção de lesões metastáticas está associada à melhora nas taxas de sobrevida. Tradicionalmente a eficácia da quimioterapia contra o MC tem sido desapontadora. Dacarbazina (DTIC) permanece como a única droga aprovada pelo FDA para tratamento quimioterápico do MC e tem uma taxa de resposta de cerca de 25%. O Interferon alfa 2b (IFN) é atualmente aprovado pelo FDA para imunoterapia do MC estágios IIb e III (Tabela III e IV), com efeito positivo confirmado no intervalo livre de doença, mas não na sobrevida e associado com alta toxicidade e custo elevado. Outra citocina é a Interleucina-2 (IL-2), com atividade antimelanoma reprodutível e taxas de resposta de 10% a 20%. Apresenta uma taxa de resposta completa de 6% apesar de suas taxas também altas de toxicidade. A radiorresistência do MC é algo bastante conhecido, embora alguns pacientes respondam bem ao tratamento radioterápico, principalmente, em metástases ósseas (fraturas patológicas) e em sistema nervoso central (SNC), como tratamento paliativo. Um aumento na sobrevida foi encontrado ao combinar-se ressecção cirúrgica e radioterapia em metástases de SNC, com taxas de resposta à radioterapia variando de 60% a 70%. Algumas outras formas de tratamento estão sendo alvo de grandes investigações científicas, como modificadores da resposta imunológica, bioquimioterapia, marcadores imunológicos, imunoterapia e terapia genética (22).

Esses baixos resultados de sobrevida e de resposta a tratamentos não cirúrgicos em pacientes com MC metastático têm levado muitos investigadores a buscar marcadores que identifiquem quais pacientes têm um maior potencial de responder a tratamentos mais agressivos com agentes citotóxicos, ou que independentemente do tipo de tratamento apresentarão uma má evolução (38). Numerosos marcadores biológicos e moleculares com relevância clínica estão sendo

continuamente estudados. Alguns seguramente ajudarão a refinar as variáveis clínicas e patológicas que predizem o desfecho clínico e o padrão de metástases. Entretanto, não é provável que cada melanoma respondera de uma maneira previsível, deixando claro por que foi considerado de comportamento caprichoso e randômico (8). Dentre esses marcadores, encontram-se o ICAM-1, MUC-18, Cd44, DOPA, 5-S-cysteinyldopa (5-S-CD), 6H5M12C, p53, p16 e Bcl-2, entre outros (8 e 39).

A via final da maioria dos tratamentos não-cirúrgicos das neoplasias é a indução da apoptose (morte celular programada). Kher *et al.*, em 1972, cunharam o termo “apoptose” de uma palavra grega utilizada para descrever a queda das folhas das árvores ou das pétalas das flores, referindo-se a um tipo particular de morte de células isoladas em termos morfofisiológicos (12, 13, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 e 48). Kehr *et al.* também enfatizaram que a morte celular programada (apoptose) não é randômica, mas tem características morfológicas distintas, que incluem a compactação da cromatina contra a membrana nuclear, contração celular com preservação das organelas, perda da adesão às células vizinhas, “embolhamento” nuclear e citoplasmático para formar fragmentos “envelopados” por membrana, conhecidos como “corpos apoptóticos”, que são rapidamente fagocitados por células parenquimatosas adjacentes ou macrófagos. Apoptose geralmente afeta células individuais. Caso todas as células de uma área particular sejam iniciadas, então o processo é bastante rápido, podendo levar apenas uma hora para ser concluído (42 e 48). A ingestão de células apoptóticas pelos macrófagos não induz a liberação de enzimas proteolíticas ou radicais livres de oxigênio. A fragmentação celular ocorre sem a liberação de conteúdo celular no espaço extracelular e a remoção dos corpos apoptóticos não causa resposta inflamatória. A ausência de inflamação é uma característica crucial, já que permite a morte celular sem lesar as células adjacentes. Apoptose tem lugar durante a



embriogênese, no curso da renovação tecidual normal, e em tecidos hormônio-responsivos, após a retirada de hormônios tróficos. Exemplos de apoptose em células somáticas adultas incluem: queratinócitos, descamação do epitélio de revestimento intestinal, atrofia prostática após castração, involução mamária após a lactação e morte de neutrófilos maduros. A homeostase tecidual é mantida através de um delicado balanço entre a proliferação celular e a apoptose. Ao contrário da necrose, a apoptose necessita energia, sob a forma de ATP (*adenosin triphosphate*), para ocorrer (42 e 43). A célula pode responder a uma gama de lesões de várias maneiras: ela pode interromper a divisão celular até que o dano seja reparado, ela pode submeter-se à apoptose ou prosseguir no ciclo celular sem interrupção (42). Defeitos na apoptose estão implicados na gênese de diversas doenças. Por exemplo, doenças auto-imunes, como a tireoidite de Hashimoto e Lúpus Eritematoso Sistêmico são causadas por morte celular excessiva na tireóide e em outros órgãos alvo. Por outro lado, a diminuição da apoptose nas células imunes auto-reativas, além da sua indução e proliferação, desempenha um papel importante no desenvolvimento de auto-imunidade. Apoptose neuronal tem um papel importante no desenvolvimento de doenças degenerativas do SNC, por exemplo, nas doenças de Parkinson e Alzheimer, e nas desordens do sistema nervoso periférico, como diversas neuropatias (40 e 43). A apoptose também está relacionada a doenças como síndrome da imunodeficiência adquirida, infarto agudo do miocárdio e doenças vasculares cerebrais. A apoptose é um excelente método de prevenir a transformação maligna. Apoptose anormal pode contribuir para o desenvolvimento do câncer, tanto por acúmulo de células em divisão, quanto por obstruir a remoção de variantes genéticas com potencial maligno. O que determina o caminho que a célula vai seguir após o dano no DNA, quer seja parar o ciclo celular para reparo, quer seja induzir a apoptose não é ainda totalmente entendido, mas sabe-se

que alguns oncogenes que estimulam a divisão celular –como o *c-myc* – podem ajudar a encaminhar a célula para apoptose (42). Entre os oncogenes relacionados com a carcinogênese, existem os que promovem a apoptose e que, quando funcionam mal, estimulam o crescimento tumoral, tais como o p53 selvagem (denominado de “guardião do genoma”), o FAS e os membros pró-apoptóticos da família BCL-2; os que inibem a apoptose, como o p53 mutante e os membros antiapoptóticos da família BCL-2 (41).

Os mecanismos genéticos e moleculares da apoptose foram pela primeira vez caracterizados perto do final dos anos 1980 e início dos anos 1990 em estudos no verme *Caenorhabditis elegans*. A morte celular programada durante o desenvolvimento do *C. elegans* é extremamente precisa e previsível: genes específicos são ativados para destruírem exatas 131 células, deixando 959 células no adulto normal. Os estudos nesse verme revelaram que a apoptose consiste em quatro passos sequenciais bem definidos: I) disparo de estímulos de morte intra ou extracelulares; II) morte (execução) celular pela ativação de proteases intracelulares (caspases); III) fagocitose dos corpos apoptóticos por células circunvizinhas ou macrófagos e IV) degradação desses corpos apoptóticos dentro das células fagocíticas. No *C. elegans*, os produtos dos genes *ced-3* e *ced-4* (proteínas) são necessários para a execução da apoptose, e o produto do gene *ced-9* previne a apoptose por inibir a ação do *ced-3* e *ced-4*. A proteína *ced-9* é uma proteína multifuncional que está localizada na membrana externa da mitocôndria e de outras organelas intracitoplasmáticas (48).

O gene Bcl-2 (*B-cell lymphoma/leukemia-2*), homólogo funcional do *ced-9* nos mamíferos, foi identificado na translocação 14:18 (q32;q21) em linfomas foliculares de células B e correlacionado com a inibição da apoptose (morte celular programada), sem, porém, interferir na proliferação celular (12, 14, 17, 18, 21, 49, 50, 51, 52, 53, 54 e 55). O Bcl-2 inibe a apoptose induzida por uma série de insultos

citotóxicos como, por exemplo, a radiação ultravioleta e gama, retirada de citocinas, dexametazona e drogas citotóxicas. A proteína codificada por esse gene (bcl-2) é uma proteína integral de membrana (26kdA) que se localiza no núcleo, membrana externa da mitocôndria e retículo endoplasmático (12, 13, 14, 38, 41, 45, 48 51 e 56). Além de presente em linfócitos B, o Bcl-2 também está habitualmente presente nos seguintes epitélios adultos normais: I - células ductais de todas as glândulas exócrinas, incluindo pâncreas, glândulas salivares e sudoríparas; II - células basais ou proliferativas, como os queratinócitos basais, melanócitos e as células da base das criptas intestinais; III - células epiteliais responsivas a estímulos hormonais como as do endométrio, próstata, e glândulas mamárias; e IV - neurônios (12, 13, 14, 38, 51, 52, 55 e 56). Em tumores o Bcl-2 está presente, em tumores como linfoma de células B, câncer de próstata e mama, carcinoma de pulmão não-pequenas células, neuroblastoma, câncer de cólon, câncer de ovário, câncer de tireóide e melanoma cutâneo e uveal (12, 14, 15, 16, 49 e 51). Elevados níveis de bcl-2 aumentam a resistência às drogas e estão relacionados com pior prognóstico em alguns tumores sólidos, como o carcinoma de próstata. Não há, entretanto, correlação entre altos níveis de bcl-2 e pior prognóstico em outras neoplasias malignas como tumores de mama, ovário, pulmão e tireóide. Há uma relação inversa entre a expressão de bcl-2 e prognóstico em câncer de cólon e não há relação entre a expressão de bcl-2 e melanoma uveal (15 e 57).

O Bcl-2 é um dos membros de uma família de muitos genes envolvidos com a morte e sobrevivência celular, sem afetar a proliferação celular. Todos possuem um de quatro domínios homólogos. Entre os membros da família BCL-2 com função antiapoptótica em células de mamíferos, estão Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1, NR-13, ORF 16, KS-Bcl-2 e o E1B-19K. Já os membros com função pró-apoptótica são: Bax, Bcl-x<sub>s</sub>, Bak, bok, Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bim<sub>L</sub>, Bad, Bid e EGL-1 (50 e 54). O

oncogene antiapoptótico mais bem estudado entre os que regulam a morte celular apoptótica é o Bcl-2 (52).

A expressão de Bcl-2 tem sido relatada em epitélios normais (tanto hormônio-responsivos, como não) e doenças malignas epiteliais. Apesar de o maior número de células epiteliais que expressam bcl-2 encontrar-se nas zonas de proliferação, sua expressão não está diretamente relacionada com a proliferação celular. O Bcl-2 também está relacionado com células-tronco comissionadas à diferenciação e morfogênese. A vantagem na sobrevivência advinda da presença de bcl-2 prolonga o tempo de vida das células epiteliais com potencial de diferenciação e permite que a proliferação, diferenciação e morfogênese aconteçam. A superexpressão de bcl-2 protege as células epiteliais da morte, mas não é capaz de imortalizar a célula, nem de causar transformação maligna (56).

Rodriguez-Villanueva *et al.*, analisaram, por método imunoistoquímico, a expressão de bcl-2 em pele normal e cânceres de pele não-melanoma, utilizando anticorpo monoclonal específico para bcl-2 (*anti-bcl-2 monoclonal antibody – DAKO*). Esse estudo demonstrou a presença de bcl-2 em queratinócitos basais, melanócitos, papilas dérmicas dos folículos pilosos, camadas queratinizadas de Henle e Huxley e nas células queratinizadas do istmo e infundíbulo piloso. Além disso, intensa coloração foi observada nas células da espiral secretória das glândulas sudoríparas écrinas. A distribuição da proteína bcl-2 na pele normal, não demonstrou correlação com a localização histológica conhecida dos compartimentos de células basais. O carcinoma basocelular apresentou altos níveis de proteína bcl-2. Já o carcinoma epidermóide não exibiu reação imunoistoquímica detectável para bcl-2 (52).

Em relação à expressão de bcl-2 no MC, os achados são contraditórios. Tron *et al.*, analisando a expressão imunoistoquímica da proteína bcl-2, utilizando

anticorpo monoclonal (em diluição 1:100) (*DAKO 124, mouse monoclonal*), demonstraram forte coloração em melanócitos normais (três de quatro amostras), em nevus comuns adquiridos (cinco de sete). Já em MC, somente três dos 23 melanomas primários e três dos nove melanomas metastáticos coraram fortemente quando comparados a melanócitos da pele normal e de nevus adquiridos. É interessante observar que nenhum dos seis nevus displásicos, precursores do melanoma, coraram fortemente com bcl-2, comparados com melanócitos e nevus, mas com expressão similar aos melanomas. Sua conclusão foi de que a expressão de bcl-2 em melanócitos diminui com a malignização e que isso pode estar relacionado à aquisição de características autonômicas de crescimento durante o processo de transformação maligna (51).

Já Morales-Ducret *et al.*, utilizando anticorpo monoclonal bcl-2 (em diluição 1:500) (*M887, DAKO*) em técnica de imunistoquímica, encontraram expressão positiva de bcl-2 nos 23 carcinomas basocelulares analisados, em dois dos 20 carcinomas epidermóides (pequenos focos ou coloração difusa e bem fraca), em nenhum dos oito carcinomas epidermóides “*in situ*”, em nenhum dos oito casos de ceratose actínica e em 16 dos 18 casos de MC. Os autores sugeriram que a expressão de bcl-2 em MC pode ser somente um reflexo da presença de bcl-2 nos melanócitos ou pode ser um interessante marcador de resistência tumoral à quimioterapia e radioterapia (55).

Tang *et al.*, empregaram técnica imunistoquímica para detecção de bcl-2 (*bcl-2 mouse monoclonal; DAKO*), encontraram uma expressão diminuída de bcl-2 em todos os casos de MC quando comparados aos nevus benignos. Sua conclusão é de que outros genes relacionados com a apoptose, como o Bcl-x<sub>L</sub>, tenham maior importância na evolução do MC que o Bcl-2 (15).

Leiter *et al.*, ao utilizarem PCR, identificaram forte expressão de bcl-2 em 14 de 16 melanomas metastáticos (87,5), em sete de 13 casos de MC primários (53%), sete de 15 nevus (46%) e sete de 16 amostras de pele normal (43%) ( $P < 0,05$ ). Eles sugeriram que a expressão de bcl-2 aumenta com a progressão do tumor (21).

Collins *et al.*, analisaram a expressão de bcl-2 por imunistoquímica em MC *in situ*, primário e metastático, e graduaram a intensidade de 0-4+. Dos melanomas *in situ*, 75 % apresentaram coloração de média intensidade (1-2+). Já os melanomas primários (80%) e metastáticos (95%) apresentaram coloração de média a forte intensidade (2-4+) (18).

Grover *et al.*, utilizaram citometria de fluxo e anticorpo monoclonal contra bcl-2 humano (*Dako Ltd. UK*) em diluição 1:20 e avaliaram 1.000 eventos (células) por amostra. Seus achados revelaram a expressão de bcl-2 como fator prognóstico independente na determinação da sobrevida em pacientes com metástases linfonodais regionais de MC ( $\chi^2 = 7,02$ ;  $P < 0,01$ ) (14).

Atualmente, um dos grandes desafios da medicina moderna está em obter dados suficientes para um adequado prognóstico dos pacientes com MC. Apesar de a maioria dos MC primários com espessura inferior a 0,76 mm apresentar um bom prognóstico, vários estudos têm demonstrado que 5% a 22% desses pacientes morrerão por doença metastática. Ao contrário, há um grupo de pacientes com melanomas espessos (>3,6 mm) que apresentam uma longa sobrevida (mais de 10 anos) (18). Muito ainda há a descobrir-se na biologia molecular do MC que certamente ajudará a entendermos o porquê de diferenças como as discutidas acima.

## TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

A expressão de bcl-2 foi avaliada por método imunoistoquímico. Realizaram-se cortes de cada bloco das metástases e foi realizada coloração convencional por Hematoxilina e Eosina. Após a avaliação do patologista e da pesquisadora, foram escolhidos os blocos com maior representação tumoral. Desses foram realizados cortes de quatro  $\mu\text{m}$  e deixados em estufa a 56° C por 24 horas. Procedida a desparafinização e hidratação por meio de imersão seriada em xilol e álcool em concentrações decrescentes (100 a 20%) à temperatura ambiente, foi realizada a recuperação antigênica com o objetivo de recuperar os sítios antigênicos inibidos pelo processo de fixação. Para tanto se utilizou o método de irradiação em forno de microondas em que os cortes são incubados em tampão citrato com pH seis e levados ao forno de microondas na potência máxima por três vezes de cinco minutos, com descanso de dois minutos entre cada vez. Após, são deixados em descanso de 20 minutos dentro do aparelho e a seguir em descanso de 15 minutos em temperatura ambiente. São então lavados em água corrente, em água destilada e imersos em tampão PBS por cinco minutos. Para bloquear as enzimas do tecido que podem interferir na reação, foi utilizado o método de bloqueio da peroxidase endógena, que consiste em dois banhos de 20 minutos cada, em peróxido de hidrogênio a 5 % em água destilada, e lavagem em água corrente, água destilada e imersão em tampão PBS por cinco minutos. Com o objetivo de bloquear as reações inespecíficas que determinariam um resultado falso positivo, utilizou-se um banho com leite em pó desnatado, reidratação em tampão PBS a 5 % por 40 minutos, com posterior lavagem em água corrente, água destilada e imersão em tampão PBS por cinco minutos. A reação de anticorpo específico foi realizada com anticorpo Bcl-2 (*IgG  $\mu$ , kappa, 280mg/L - Monoclonal Mouse Anti-Human bcl-2 Oncoprotein Clone 124 Code no. M0887 Lot 018 / DAKO*

*CORPORATION –Carpinteria, CA 93013 USA*) diluído em tampão PBS (1:500). Os cortes são então levados à câmara escura por uma hora a 37° C ou deixados durante a noite em geladeira a 4°C. As lâminas são lavadas individualmente com três banhos em tampão PBS de cinco minutos cada. Utilizou-se o anticorpo secundário do Kit *DAKO/LSAB (Dako Liquid DAB Large Volume Substrate-Chromogen System Code N°: K3466/ DAKO CORPORATION –Carpinteria, CA/USA)*, por 30 minutos. Após, ocorreram três banhos de cinco minutos cada com tampão PBS. Para revelação, utilizou-se o kit DAB. A contracoloração foi realizada com Hematoxilina de Harris, por 20 segundos, após lavagens seqüenciais com água corrente, água amoniacal a 2%, álcool e xilol, com posterior montagem.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- American Cancer Society: What are key statistics for melanoma skin cancer? [Available in 2007 May 30] [1 Screen]. Available from URL: [http://www.cancer.org/docroot/cric/content/cric\\_2\\_4\\_1x\\_what\\_are\\_the\\_key\\_statistics\\_for\\_melanoma\\_50.asp](http://www.cancer.org/docroot/cric/content/cric_2_4_1x_what_are_the_key_statistics_for_melanoma_50.asp).
- 2- A pele e seus anexos. In: Lesson e Lesson. Atlas de histologia. Primeira edição. Rio de Janeiro: Editora Interamericana;1980. p.133-43.
- 3- Murphy GF, Mihm Jr MC. The skin. In: Cotran RS, Kumar V,Robbins SL. Pathologic Basis of Disease. 5<sup>th</sup> Edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company;1994. p1173-81.
- 4- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer: Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil – Melanoma maligno da pele – 2006. [capturado 2007 Out 08] [2 telas] Disponível em : [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=335](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335)
- 5- Gershenwald JE, Sussman JJ, Lee JE. Melanoma. In: Feig BW, Berger DH, Fuhrman GM. The M. D. Anderson surgical oncology Handbook. Second edition. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins; 1999. p.38-68.
- 6- Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer: Melanoma Cutâneo. [capturado em 2002 Jan 3] [1 tela] Disponível em: <http://www.inca.org.br/cancer/tipos/melanoma.html>.
- 7- Dong Y-B, Yang H-L, Elliot MJ, Liu T-J, Stilwell A, Atienza C, et al. Adenovirus-mediated E2F1 gene transfer efficiently induces apoptosis in melanoma cells. Cancer 1999 Nov 15;86(10):2021-33.

- 8-** Stadelmann WK, Rapaport DP, Soong S\_J, Reintgen DS, Buzaid AC, Balch CM. Prognostic Clinical pathologic features. In: Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong S-J. Cutaneous Melanoma. Third edition. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc. 1998. p.11-35.
- 9-** Brossart P, Schmier J-W, Krüger S, Willhauck M, Scheibenbogen C, Möhler T, et al. A polymerase chain reaction-based semiquantitative assesment of malignant melanoma cells in peripheral blood. *Cancer Res* 1995 Sep 15;55:4065-68.
- 10-** Meyers ML, Balch CM. Diagnosis and treatment of metastatic melanoma. In: Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong S-J. Cutaneous Melanoma. Third edition. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc. 1998. p.325-60.
- 11-** Coit DG. Patient surveillance and follow-up. In: Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong S-J. Cutaneous Melanoma. Third edition. St. Louis, Missouri: Quality Medical Publishing, Inc. 1998. p.313-21.
- 12-** Plettenberg A, Ballaun C, Pammer J, Mildner M, StrunkD, Weninger W, et al. Human melanocytes and melanoma cells constutively Express the bcl-2 proto-oncogene *in situ* and in cell culture. *Am J Pathol* 1995 Mar;146(3):651-59.
- 13-** Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998 Aug 28;281:1317-21.
- 14 -** Grover R, Wilson GD. Bcl-2 expression in malignant melanoma and its prognostic significance. *Eur J Surg Oncol* 1996;22(4):347-49.

- 15** -Tang L, Tron VA, Reed JC, Mah KJ, Krajewska M, Li G, et al. Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma. Clin Cancer Res 1998 Aug;4:1865-71.
- 16** -Jansen B, Schlagbauer-Wadl H, Brown BD, Bryan RN, Elsas AV, Müller, et al. bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. Nat Med 1998 Feb;4(2):232-34.
- 17** - Jansen B, Wacheck V, Heere-ress E, Schlagbauer-Wadl H, Hoeller C, Lucas T, et al. Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. Lancet 2000Nov 18;356:1728-33.
- 18** -Collins KA, White WL. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and bcl-2 are differentially expressed in early evolving malignant melanoma. Am J Dermatopathol 1995;17(5):429-38.
- 19** – Instructions to authors. Applied Cancer Research. [capturado 2007 Nov 30 Disponible en <http://appliedcr.org/ojsystem/index.php/appliedcr/about/submissions#onlineSubmissions>].
- 20** - Markowitz JS, Cosimi LA, Carey RW, Kang S, Padyk C, Sober AJ, et al. Prognosis after initial recurrence of cutaneous melanoma. Arch Surg 1991 Jun;126:703-08.
- 21** - Leiter U, Schmid RL, Kaskel P, Peter RA, Krähn G. Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced melanoma. Arch Dermatol Res 2000;292:225-32.
- 22** Bonaccorsi P, Ansel JC, Armstrong CA. Management of high-risk melanoma. Dermatol Clin [periódico online] 2001 Oct [capturado 2002 Jan 27]; 19(4) [12 telas] Disponible em:

<http://home.mdconsult.com/das/article/body/1/jorg=journal&source=&sp=12040567&sid>.

- 23** -Gilchrest BA, Eller MS, geller AC, Yaar M. The patogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. NEJM 1999 Apr 29;340(7):1341-48.
- 24** - Wang SQ, Setlow R, Berwick M, Polsky D, Marghoob AA, Kopf AW, et al. Ultraviolet A and melanoma: a review. J Am Acad Dermatol 2001 May;44(5):837-46.
- 25** – Stern RS. The risk of melanoma in association with long-term exposure to PUVA. J AM Acad Dermatol 2001 May;44(5):755-61.
- 26** – Pfahlberg A, Kölmel K-F, Gefeler O. Tming of excessive ultraviolet radiation and melanoma: epidemiology does not support the existence of a critical period of High susceptibility to solar ultraviolet radiation induced melanoma. Br J Dermatol 2001 Mar;144(3):471-75.
- 27** - Drzewiecki KT, Andersen K. Survival with malignat melanoma – A regression analysis of prognostic factors. Cancer 1982 Jun 01;49:2414-19.
- 28** – Garbe C, Büttner P, Bertz J, Burg G, d’Hoedt B, Drepper H, et al. Primary cutaneous melanoma – prognostic classification of anatomic localization. Cancer 1995 May 15;75(10):2492-98.
- 29** - Garbe C, Büttner P, Bertz J, Burg G, d’Hoedt B, Drepper H, et al. Primary cutaneous melanoma – prognostic classification of anatomic localization. Cancer 1995 May 15;75(10):2484-91.
- 30** – Wong JH, Wanek L, Chang L-JC, Goradia T, Morton DL. The importance of anatomic site in prognosis in patients with cutaneous melanoma. Arch Surg 1991 Apr;126:486-89.

- 31** - Büttner P, Garbe C, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, et al. Primary cutaneous melanoma – optimized cutoff points of tumor thickness and importance of Clark's level for prognostic classification. *Cancer* 1995 May 15;75(10):2499-2506.
- 32** - Shaw HM, McGovern VJ, Milton GW, Faraco GA, McCarthy WH. Histologic features of tumors and the female superiority in survival from malignant melanoma. *Cancer* 1980 Apr 01;45:1604-08.
- 33** - Barth A, Wanek LA, Morton CL. Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. *J Am Coll Surg* 1995 Sep;181(3):193-201.
- 34** - Ryan L, Kramar A, Borden E. Prognostic factors in metastatic melanoma. *Cancer* 1993 May 15;71(10):2995-3005.
- 35** - Eberlein TJ. Prognosis of patients with advanced melanoma. *J Am Coll Surg* 1995 Sep;181:263-65.
- 36** - Presant CA, Bartolucci AA, Southeastern Cancer Study Group. Prognostic factors in metastatic malignant melanoma – the southeastern cancer study group experience. *Cancer* 1982 May 15;49:2192-96.
- 37** – Schlagenhauff B, Stroebel W, Ellwanger U, Meier F, Zimmermann C, Breuninger H, et al. Metastatic melanoma of unknown primary origin shows prognostic similarities to regional metastatic melanoma. *Cancer* 1997 Jul 1;80(1):60-65.
- 38** - Reed JA, Albino AP. Update of diagnostic and prognostic markers in cutaneous malignant melanoma. *Dermatol Clin* 1999 Jul;17(3):631-43.

- 39** – Piepkorn M. Melanoma genetics: An update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressors. *J Am Acad Dermatol* 2000 May;42(5 Pt 1):705-22.
- 40** - Miller LJ, Marx J. Apoptosis [editorial]. *Science* 1998 Aug 28;281:1301.
- 41** - Meterissian SH. Apoptosis: its role in the progression of and chemotherapy for carcinoma. *J Am Col Surg* 1997 Jun;184:658-66.
- 42** - Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *The Lancet* 1993 May 15;341:1251-54.
- 43** – Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 1999 Nov;107:489-506.
- 44** – Andreoli TE. The apoptotic syndromes. *Am J Med* 1999 Nov;107:488.
- 45** – Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998 Aug 28;281:1309-12.
- 46** – Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998 Aug 28;281:1305-08.
- 47** – Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies Within. *Science* 1998 Aug 28;281:1312-16.
- 48** – Hets SW. to die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998 Jan 28;279(4):300-07.
- 49** - Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 1992 Aug 15;80(4):879-86.
- 50** - Adams JM, Cory S. The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998 Aug 28;281:1322-26.

- 51** - Tron VA, Krajewski S, Klein-Parker H, Li G, Ho VC, Reed JC. Immunohistochemical analysis of bcl-2 protein regulation in cutaneous melanoma. *Am J Pathol* 1995 Mar;146(3):643-50.
- 52** - Rodriguez-Villanueva, Colome MI, Brisbay S, McDonnell TJ. The expression and localization of bcl-2 protein in normal skin and in non-melanoma skin cancer. *Path Res Pract* 1995;191(5):391-98.
- 53** – Tao W, Kurschner C, Morgan JI. Modulation of cell death in yeast by the bcl-2 family of proteins. *JBC Online* [periódico online] 1997 Jun 13 [capturado em 2001 Mar 26];272(24):15547-52 Disponível em <http://www.jbc.org/cgi/content/full/2/2/24/1554/>.
- 54** - O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, et al. Bim: a novel member of the bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* 1998;17:384-95.
- 55** - Morales-Ducret CRJ, van de Rijn M, LeBrun DP, Smoller BR. Bcl-2 expression in primary malignancies of the skin. *Arch Dermatol* 1995 Aug;131:909-12.
- 56** - Lu Q-L, Abel P, Foster C, Lalani E-N. bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol* 1996 Feb;27(2):102-10.
- 57** – Ilyas M, hao X-P, Wilkinson K, Tomlinson IPM, Abbasi AM, Forbes A, et al. Loss of bcl-2 expression correlates with tumour recurrence in colorretal cancer. *Gut* 1998;43:383-87.

## Anexo 1 : Protocolo de coleta de dados

### 1 – Identificação:

1.1 - Nome:

1.2 - Prontuário:

1.3 - Cidade de Nascimento:

1.4 - Cidade de Origem:

1.5 - Profissão:

2 – Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ 3.– Sexo: ( ) Feminino ( ) Masculino

4– Data do primeiro diagnóstico: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

5– Tipo de lesão: ( ) Espalhamento superficial ( ) Lentigo maligno ( ) nodular  
( ) acral ( ) Amelanótico

ulceração: sim( ) não( )

crescimento vertical : sim( ) não( )

índice mitótico: sim( ) não( ) \_\_\_/ campo de grande aumento

infiltrado linfocitário: sim( ) não( )

reação estromal: sim( ) não( )

proliferação vascular: sim( ) não( )

regressão: sim( ) não( )

6 – Breslow: mm

7 – Clark: ( )I ( )II ( )III ( )IV ( )V

8 – Localização anatômica: ( ) cabeça e pescoço ( ) Tronco ( )Membros superiores  
( )Membros inferiores ( )Plantar ( ) Palmar

9 – Recidiva local: Sim( ) Não( )

AP. Peça n°:

10 – Primeira metástase: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

AP. Peça n°:

11 – Localização anatômica: ( ) cabeça e pescoço ( ) Tronco ( )Membros superiores  
( )Membros inferiores ( )Plantar ( ) Palmar

12 – Tratamento: ( )Ressecção cirúrgica ( ) Observação

13 – Doenças associadas:

14 – Tratamento adjuvante:

14.1 Quimioterapia:

- drogas:

- ciclos:

- período: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ a \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

14.2 Radioterapia:

- dose:

- localização:

- período: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ a \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

15 – Metástases à distância:

15.1 Localização anatômica: ( ) cabeça e pescoço ( ) Tronco ( )Membros superiores  
( )Membros inferiores ( )Plantar ( ) Palmar

15.2 Tratamento: ( )Ressecção cirúrgica ( ) Observação

15.3 AP. n° da peça ou local (ex:Geyer,etc):

16 – Última consulta: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

17 – Óbito: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

18 – Bcl-2 : ( ) 0 ( ) I ( ) II



**Anexo 2: Aprovação pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.**

**Anexo 2: Aprovação pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.**



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**  
**Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação**  
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

**RESOLUÇÃO**

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 01-108

**Pesquisadores:**

OLY CAMPOS CORLETA  
MARÍLIA BITTENCOURT ESPÍNDOLA

**Título:** EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA BCL-2 METÁSTASES DE MELANOMA CUTÂNEO E SUA RELAÇÃO COM A SOBREVIDA.

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 18 de Maio de 2001.

  
Profa. Thérésa Reyerbel da Silveira  
Coordenadora de GPPG e CEP-HCPA

105