A proteína p16 e o melanoma cutâneo

P16 protein and cutaneous malignant melanoma

Jorge Antonio Caleffi Fauri[1], Eduardo Schenini Diehl[2], André Cartell[3], Lúcio Bakos[4], Maria Isabel Albano Edelweiss[5]

RESUMO

Nas últimas décadas, é intensa a procura de uma explicação genética sobre a origem, o crescimento e a progressão do melanoma cutâneo. A tentativa de encontrar uma ligação direta entre as mutações gênicas e a origem da doença tem sido o objetivo dos pesquisadores dedicados ao estudo dessa neoplasia. Diversos métodos são utilizados na busca de uma avaliação prognóstica para a progressão do melanoma, citando-se, entre eles, a pesquisa do linfonodo sentinela, a imuno-histoquímica, as técnicas moleculares e a técnica de *microarray*. A necessidade de estabelecer um método, com excelente sensibilidade e especificidade, tem levado os pesquisadores a buscarem melhores evidências. É importante para esses estudos a obtenção de dados confiáveis sobre as técnicas, progressão e sobrevida livre de doença. Por meio da imuno-histoquímica, técnica relativamente simples e de baixo custo, a expressão da proteína p16 pode ser analisada e correlacionada com o prognóstico da doença. No melanoma cutâneo, a expressão da proteína diminui, à medida que aumenta sua agressividade, ou seja, é forte nos nevos e melanomas *in situ* e fraca ou ausente nos melanomas metastáticos. Em alguns estudos, a comparação com outros marcadores é analisada. A finalidade deste estudo é fazer uma revisão da literatura internacional sobre o uso da proteína p16 como fator prognóstico para o melanoma, bem como avaliar a importância das alterações do gene p16INK4a, corresponsáveis pela gênese e evolução do melanoma.

UNITERMOS: Melanoma Cutâneo, P16INK4a, Imuno-histoquímica, Prognóstico.

ABSTRACT

In the last decades there has been an intense search for a genetic explanation of the origin, growth and progression of cutaneous melanoma. The attempt to find a direct link between gene mutations and the root of the disorder has been the aim of researchers devoted to the study of this neoplasia. Many are the methods used in the search of a prognostic evaluation for the progression of melanoma, e.g. research on the sentinel lymph node, immunohistochemistry, molecular techniques and the microarray technique. The need for a method with optimal sensitivity and specificity has led researchers to search for better evidence. For these studies it is important to obtain reliable data on the techniques, progression and survival free of disease. By means of immunohistochemistry, which is a relatively simple, low cost technique, the p16 protein expression can be assessed and correlated with disease prognosis. In cutaneous melanoma, p16 expression decreases as its aggressiveness increases, i.e. it is strong in the nevi and melanomas in situ *and weak or absent in the metastatic melanomas. Other studies have analyzed how it compares with other markers. The purpose of this study is to make a review of the international literature on the use of p16 protein as a prognostic factor for melanoma, as well as to evaluate the importance of alterations in the p16INK4a gene, co-responsible for the genesis and progress of melanoma.*

KEYWORDS: *Cutaneous Malignant Melanoma, P16INK4a, Immunohistochemistry, Prognosis.*

INTRODUÇÃO

Epidemiologia

Considerado o mais agressivo dos tumores da pele, o melanoma cutâneo mantém-se na liderança das mortes por câncer de pele nos países industrializados (1). A sua incidência vem aumentando, significativamente, em todo o mundo, mais rapidamente do que qualquer outro tipo de neoplasia maligna.

A Organização Mundial de Saúde – *World Health Organization* (WHO) – estima que, anualmente, ocorram em torno de 132 mil casos novos de melanoma no mundo, com uma prevalência em torno de 2,5% (2).

Nos Estados Unidos, é considerada a doença com crescimento mais rápido, em ambos os sexos, no período de 1973 a 1997, e, em 2002, a incidência foi seis vezes maior do que em 1950. Estima-se a duplicação dessa incidência a cada 10-20 anos. Em média, variando entre populações, o aumento da incidência anual está na ordem de 3 a 7% em

[1] Mestre em Ciências Cirúrgicas pela Faculdade de Medicina da UFRGS. Médico – Cirurgião Plástico.
[2] Mestre em Clínica Médica pela Faculdade de Medicina da UFRGS – Médico Dermatologista.
[3] Médico Dermatopatologista. Professor Auxiliar do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFRGS.
[4] Doutor – Dermatologista. Professor Titular de Dermatologia da Faculdade de Medicina da UFRGS.
[5] Doutora – Patologista. Professora Associada do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da UFRGS.

19-458_a_proteína_p16t.pmd 81 31/3/2010, 10:53

caucasianos.[3] Na Austrália, é o quarto tipo mais comum de câncer entre os homens (depois de câncer de próstata, intestino e pulmão), e o terceiro mais comum entre as mulheres (depois de câncer de mama e intestino) (3).

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se 2.950 casos novos de melanoma em homens e 2.970 em mulheres, totalizando 5.920 casos novos da doença somente em 2008. As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sul. Também para o ano de 2008, a previsão é que ocorram 870 novos casos no Rio Grande do Sul, sendo 140 na capital, Porto Alegre. O melanoma de pele é menos frequente – 4% dos casos de neoplasias da pele – do que os outros tumores de pele (basocelulares e de células escamosas). No entanto, sua letalidade é maior (2).

A ocorrência do melanoma familial foi reconhecida, há mais de 50 anos. Aproximadamente, 10% dos casos de melanoma surgem em ambientes familiares. Supõe-se que carreguem uma susceptibilidade hereditária para a doença. Estudos epidemiológicos, reconhecendo a importância da história familiar na determinação do risco para o surgimento do melanoma, salientam, também, a importância da exposição solar, o número de nevos congênitos de determinado indivíduo, o tipo de pele, cor do cabelo e dos olhos, bem como a distribuição dos nevos na pele (4).

Observa-se um expressivo crescimento na incidência desse tumor em populações de pele branca. Quando os melanomas são detectados em estádios iniciais, possuem um bom prognóstico quanto à sua cura. Nos últimos anos, verifica-se uma grande melhora na sobrevida dos pacientes com esse tipo de câncer, principalmente devido a essa detecção precoce. Nos países desenvolvidos, a sobrevida média estimada, em cinco anos, é de 73%, enquanto, nos países em desenvolvimento, é de 56%. A média mundial dessa sobrevida estimada é de 69% (2).

A maioria dos cânceres de pele ocorre devido à exposição excessiva ao sol. No Brasil, país tropical, o câncer mais frequente é o de pele, correspondendo a 25% de todos os tumores diagnosticados em todas as suas regiões geográficas. Os raios ultravioletas (UV) são classificados, de acordo com seu comprimento de onda, em UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm) e UV-C (100 a 280 nm). Em decorrência da destruição da camada de ozônio, os raios UV-B, intrinsecamente relacionados ao surgimento do câncer de pele, têm aumentado, progressivamente, sua incidência sobre a terra. Os raios UV-A, por sua vez, independem dessa camada e causam câncer de pele em indivíduos que se expõem a essa radiação em horários de alta incidência, continuamente, e ao longo de muitos anos.

As pessoas de pele clara, habitantes em regiões de alta incidência de luz solar, apresentam maior risco. Sendo a população brasileira constituída de mais de 50% de pessoas de pele clara (Quadro 1) que se expõem, muito e descuidadamente, ao sol, independentemente do motivo (trabalho ou lazer), e, sendo o Brasil um país situado, geograficamente, em zona de alta incidência de raios UV, é previsível a alta ocorrência do câncer de pele entre a população rural ou urbana (2).

Os cânceres de pele são classificados em tumores de pele não melanoma e melanomas. Dentre os não melanomas, estão o carcinoma basocelular e o epidermoide.

O melanoma cutâneo origina-se nos melanócitos – células produtoras de melanina – e tem predominância em adultos brancos. Embora represente apenas 4% dos tipos de câncer de pele, é o mais grave, devido à sua alta potencialidade para gerar metástases (2).

Características clínicas e histológicas

Variáveis clínicas, incluindo número de linfonodos ou metástases a distância e histológicas que podem predizer a sobrevida, como a espessura do tumor (índice de Breslow), tamanho do tumor, ulceração ou invasão vascular e índice mitótico, têm sido valorizadas no melanoma cutâneo (Figura 1).

Segundo Barnhill (6), a maioria dos melanomas inicia como proliferações intraepiteliais que podem, ou não, ter relação com nevos melanocíticos preexistentes.

O critério histopatológico para o diagnóstico e as tentativas na classificação do melanoma relacionam-se com as propriedades mais importantes dessas lesões que resultaram

QUADRO 1 – Quadro referente à escala de classificação de Fitzpatrick sobre tipos de pele (5)

Tipo de pele	Cor da pele	Características
I	Branca; muito pálida; cabelo loiro ou ruivo; olhos azuis; sardas	Sempre queima, nunca bronzeia
II	Branca; pálida; cabelo loiro ou ruivo; olhos azuis, verdes ou marrom-esverdeados	Normalmente queima, bronzeia com dificuldade
III	Pele menos pálida com qualquer cor de cabelo ou olhos; muito comum	Às vezes queima, bronzeia gradualmente
IV	Morena; típica pele mediterrâneo-caucasiana	Raramente queima; bronzeia com facilidade
V	Morena escura; tipo de pele do Oriente Médio	Muito raramente queima; bronzeia muito facilmente
VI	Preta	Nunca queima; bronzeia muito facilmente

19-458_a_proteína_p16t.pmd 82 31/3/2010, 10:53

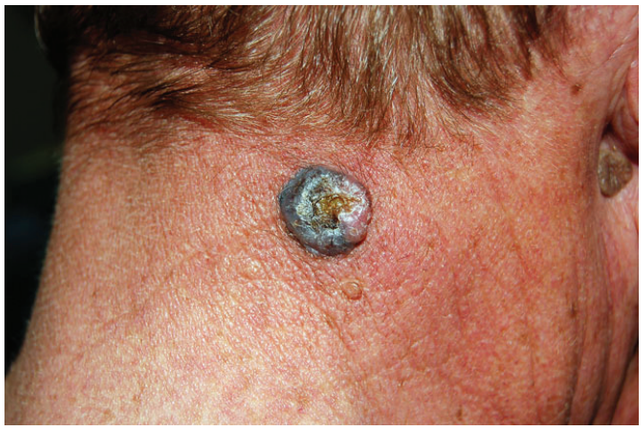


FIGURA 1 – Aspecto clínico de um melanoma cutâneo nodular.

em recorrências e metástases em pacientes sob criterioso acompanhamento. Esses vários critérios são avaliados juntamente com as informações clínicas, como idade, localização da lesão, grau de exposição ao sol, origem em nevo de qualquer tipo ou outra lesão precursora.

Uma vez que não há critério absoluto para o diagnóstico do melanoma, toda informação deve ser, sistematicamente, reunida ao realizar-se uma interpretação diagnóstica. Em geral, a classificação em uso é falha e artificial, pois faltam muitas informações biológicas. Partindo desse princípio, foi proposta uma maneira prática para classificação do melanoma, que pode ser observada no Quadro 2.

Essa classificação faz referência, por outro lado, à classificação histórica do melanoma, porque ainda é utilizada por muitos e, sob certos aspectos, é útil.

Clark (7) e Clark et al. (8) classificaram os melanomas de acordo com o seu grau de crescimento horizontal ou de invasão dérmica (Figura 2), em cinco níveis, como pode ser visto no Quadro 3.

A classificação, segundo Breslow, baseou-se na espessura do tumor (em mm), como pode ser visto no Quadro 4 (10).

A exposição ao sol e a susceptibilidade genética, como mencionado anteriormente, têm sido propostas como principais fatores etiológicos que, de certa forma, explicam a incidência aumentada da doença.

Os melanomas metastáticos apresentam resposta muito pobre a qualquer tipo de terapia, com uma probabilidade de sobrevida em cinco anos variando entre 0 e 30%. Geralmente, o melanoma cutâneo maligno desenvolve-se em três diferentes estágios: fase de crescimento radial; fase de crescimento vertical e doença metastática (1).

QUADRO 2 – Classificação prática do melanoma maligno, segundo Barnhill (6)

Melanomas convencionais
Componente intraepitelial categorizado como pagetoide, lentiginoso, aninhado, ou dois ou mais padrões
Melanomas *in situ* (intraepiteliais).
Melanomas intraepiteliais com invasão dérmica, subcutânea, etc.
Ausência de componente intraepitelial
Melanomas convencionais subclassificados por diferenças etiológicas/anatômicas
Melanomas solares
Melanomas acrais
Melanomas de mucosa
Variantes raras ou não usuais de melanoma
Desmoplástico-neurotrópico
Neurotrópico
Melanomas lembrando nevos (melanoma nevoide; melanoma spitzoide)
Melanomas surgindo em, ou lembrando nevo azul (nevo azul maligno)
Melanomas surgindo em nevo intradérmico
Melanomas surgindo em nevo congênito
Melanomas lembrando melanomas espontâneos e induzidos em animais
Melanoma verrucoso
Pleomórfico (sarcomatoide)
Melanoma de pequenas células
Melanoma de células em balão
Melanoma em anel de sinete
Rabdoide
Mixóide
Sarcoma de células claras (melanoma maligno de partes moles)

Cirurgia com abordagem do linfonodo sentinela

Antes do advento da técnica de pesquisa do linfonodo sentinela (LNS), o tratamento cirúrgico era realizado por meio da ressecção da lesão primária com margens ampliadas, já na primeira abordagem, não havendo consenso em relação à profundidade da ressecção. Discutia-se, inclusive, se a aponeurose muscular deveria ou não ser removida na região correspondente à ressecção da pele e subcutâneo. Essa conduta cirúrgica mudou, drasticamente, do ponto de vista tático-operacional, após o surgimento da técnica da pesquisa do LNS.

A controvérsia sobre a abordagem cirúrgica dos linfonodos regionais, em estágios precoces do melanoma, inicia com Herbert Snow, em 1892, que preconizava a excisão ampliada da lesão primária e a dissecção linfonodal eletiva como um método de controle da permeação linfática de metástases. Seus estudos sugeriam uma conexão direta entre a lesão primária e os linfonodos regionais, indicando que o tratamento do melanoma deveria, rotineiramente, incluir a excisão desses linfonodos (11).

Em 1977, Cabanas (12) estudou o tratamento de 100 casos de carcinoma de pênis, em detalhe, utilizando-se de linfoangiogramas, dissecções anatômicas e/ou avaliação mi-

19-458_a_proteína_p16t.pmd 83 31/3/2010, 10:53

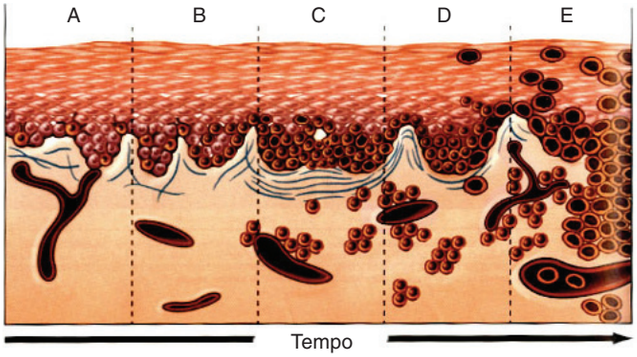


FIGURA 2 – Fases da progressão tumoral no nevo displásico até melanoma: A – hiperplasia melanocítica lentiginosa; B – nevo juncional lentiginoso; C – nevo composto lentiginoso com arquitetura anormal e aspectos atípicos citológicos (nevo displásico); D – fase de crescimento radial do melanoma; E – fase de crescimento vertical, com disseminação maligna na derme e vasos (9).

QUADRO 3 – Classificação dos melanomas segundo os níveis de Clark (10)

Nível	Grau de invasão – pele/subcutâneo
I	Lesões envolvendo apenas a epiderme (melanoma *in situ*)
II	Invasão da derme papilar, mas não atinge a interface papilar-reticular da derme
III	A invasão preenche e expande a derme papilar, mas não penetra na derme reticular
IV	Invasão da derme reticular, mas não do tecido subcutâneo
V	Invasão do subcutâneo através da derme reticular

QUADRO 4 Classificação simplificada segundo a espessura do melanoma (10), conforme Breslow

Espessura	Classificação
0,75 mm ou menos	Melanomas finos
0,76 mm a 4,0 mm	Melanomas intermediários
4,0 mm ou mais	Melanomas espessos

croscópica. Os linfoangiogramas eram realizados através dos linfáticos do dorso do pênis, demonstrando a existência de um linfonodo específico, chamado LNS, que parecia ser o local primário das metástases do carcinoma do pênis. O LNS é visualizado, radiograficamente, na incidência ântero-posterior, na junção da cabeça femoral e ramo ascendente do púbis. Anatomicamente, neste local, o LNS é parte do sistema linfático em torno da veia epigástrica superficial. Quarenta e seis biópsias de LNS foram realizadas, sendo quinze positivas para doença metastática. Nesses quinze pacientes, uma dissecção ínguino-femoral foi realizada; em doze casos, não havia envolvimento de outros linfonodos. Canais linfáticos, drenando para os linfonodos ilíacos, sem primeiro drenar para o LNS, nunca foram demonstrados, nem os linfonodos ínguino-femorais comprometidos na ausência de envolvimento do LNS.

Baseado nisso, Cabanas recomendava biópsia bilateral do LNS, seguida da dissecção ínguino-fêmoro-ilíaca, quando a biópsia fosse positiva. Se negativa, nenhum procedimento cirúrgico adicional era recomendado (12).

Em 1992, Morton et al. (13), tratando, cirurgicamente, o melanoma cutâneo, descreveram, pela primeira vez, um procedimento, utilizando um corante vital que permitia a identificação intraoperatória do linfonodo sentinela (LNS), ou seja, o linfonodo mais próximo do local do melanoma primário, na via de drenagem direta. Sendo o local mais provável de metástases precoces, o LNS poderia ser removido para estudo intraoperatório imediato, a fim de identificar células de melanoma clinicamente ocultas. Nesse trabalho, identificaram, com sucesso, o LNS em 194 de 237 bacias linfáticas. Encontraram metástases em quarenta espécimes (21%) que possuíam um LNS detectável no exame de lâminas coradas pela hematoxilina & eosina (H&E) (12%) ou, exclusivamente, nas preparações de coloração por imuno-histoquímica (9%). Metástases estavam presentes em 47 (18%) de 259 LNS, enquanto linfonodos não sentinelas eram o único local de metástases em somente dois de 3.079 linfonodos de 194 espécimes de linfadenectomia que possuíam um LNS identificável, uma taxa de falso-negativo menor do que 1%. Portanto, essa técnica identifica, com alto grau de acurácia, pacientes com estágios precoces de melanoma com metástases linfonodais e passíveis de se beneficiar da linfadenectomia radical.

Essner et al. (14), em 2000, padronizaram a utilização da linfocintilografia para todos os casos de melanoma, seguida da pesquisa intraoperatória do LNS, pelo uso do "Gama Probe", um aparelho portátil composto de sonda de detecção e sistema de registro digital da radiação gama (15).

Com mais de dez anos de experiência, Essner (11) confirmou a baixa taxa de recorrência linfonodal e mínima morbidade, utilizando o mapeamento linfático e a biópsia do LNS. Permanece, entretanto, a controvérsia: o método do mapeamento linfático e biópsia do LNS é procedimento diagnóstico ou intervenção terapêutica? Três grandes estudos examinam a utilidade terapêutica desse método. O primeiro, denominado *Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial I*, iniciado em 1994, por Essner (11), avaliou o benefício terapêutico da pesquisa do LNS e a acurácia da técnica. Comparou a excisão ampliada do tumor primário associada à pesquisa do LNS com a excisão ampliada (somente) do tumor primário, em pacientes estádios I e II (AJCC). Em março de 2002, já haviam entrado, no estudo, 2.001 pacientes. Os resultados preliminares validaram a acurácia do mapeamento linfático e a biópsia do LNS como proce-

19-458_a_proteína_p16t.pmd 84 31/3/2010, 10:53

dimentos úteis para estadiamento. O segundo estudo, iniciado em 2005 (*Multicenter Lymphadenectomy Trial III*), avaliou pacientes com LNS positivo, identificados pela coloração com H&E, técnicas de imuno-histoquímica e por RT-PCR (transcriptase reversa-PCR). Os pacientes foram submetidos à linfadenectomia radical – embora, na maioria dos casos, as metástases encontravam-se apenas no linfonodo sentinela –, com o intuito de avaliar o benefício terapêutico desse procedimento. Múltiplos fatores clínico-patológicos, como espessura do tumor ≥ 3mm, idade e elevado índice mitótico, entre outros, sugeriram, mas não são absolutamente preditivos de metástases nos linfonodos não sentinelas (11). Realizado pelo grupo do *Sunbelt Melanoma Trial,* o terceiro estudo, randomizado prospectivo, examinou o valor terapêutico da linfadenectomia radical e o uso de Intron A (INF-∝, Schering-Plough, Kenilworth, NJ), em pacientes com LNS, contendo células tumorais identificadas por coloração convencional com H&E, técnicas de imuno-histoquímica e/ou avaliação por RT-PCR de espécimes frescos. Os organizadores desse estudo antecipam que o ensaio poderá trazer melhor entendimento do valor terapêutico do mapeamento linfático e pesquisa do LNS e subsequente tratamento com Intron A (16).

Com relação ao significado biológico das metástases em LNS, Essner extraiu duas hipóteses: 1ª) Ação incubadora, ou seja, sugere que as metástases se desenvolvem nos linfonodos regionais que permitem a expansão de clones metastáticos e a subsequente disseminação a distância. Estando essa hipótese correta, a remoção precoce dos linfonodos regionais deveria reduzir a incidência de metástases a distância e aumentar a sobrevida, quando comparados a pacientes com remoção tardia dos linfonodos regionais. 2ª) Ação marcadora: sugere que as metástases para os linfonodos regionais são somente indicativas de um fenótipo metastático e a remoção dos linfonodos seria diagnóstica para metástases a distância, ocultas. Portanto, nesse caso, a remoção das metástases linfonodais seria apenas paliativa, sem oferecer nenhum significado terapêutico.

De qualquer forma, seja qual for a hipótese correta, as primeiras metástases do melanoma, geralmente, vão para os linfonodos regionais ou LNS. Por ser o LNS o primeiro local de metástase, sua avaliação é uma oportunidade única para o estudo das fases precoces da interação imunológica tumor-linfonodo. Evidências recentes, pesquisadas por Cochran et al. (17), sugeriram que os LNS estão imunossuprimidos quando comparados com os linfonodos adjacentes não sentinelas. Alitalo et al. (18), ao estudarem a linfoangiogenese, questionaram se a progressão das metástases para outros órgãos (metástases a distância) dar-se-ia por via linfática ou pelos vasos sanguíneos.

Ainda assim, casos com metástase linfonodal podem passar sem identificação. Daí a busca por marcadores tumorais mais específicos. A utilização da imuno-histoquímica para avaliar a expressão da proteína p16 – pelo baixo custo e simplicidade do método –, e correlacioná-la com o prognóstico da doença, é uma das técnicas apresentadas em vários trabalhos da literatura mundial.

Marcadores moleculares do melanoma

O melanoma cutâneo, frequentemente, mostra um comportamento clínico imprevisível. Como já mencionado anteriormente, enquanto a espessura do tumor primário é o fator prognóstico independente mais importante para determinar sobrevivência, observa-se que pacientes com tumores mais espessos, por vezes, não apresentam metástases, e outros, com melanomas finos, morrem em consequência da doença (19).

Por meio da patologia molecular, com seus contínuos progressos tecnológicos, houve a possibilidade de reconhecer a predisposição e identificar estados subclínicos das doenças. Observou-se que metástases podem ocorrer em pacientes com melanomas finos, e a pesquisa do linfonodo sentinela não identifica todos os pacientes com risco para metástases a distância.

Existem novos marcadores correlacionados com a progressão do melanoma. Estudos suplementares como o do Ki-67 (MIB-1) e outros marcadores celulares, p53, proteína S100A6, telomerase, BRAF, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), hibridização genômica comparativa (CGH), análise proteômica funcional ou expressão de grupos de genes (*arrays*) aumentarão a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico de melanoma em casos histologicamente ambíguos e poderão ser úteis na identificação, prognóstico e detecção de doença residual mínima e/ou recorrência precoce. Dados recentes mostram que esses marcadores poderiam ser úteis para determinar quais pacientes se beneficiariam com um determinado tratamento ou para monitorar uma resposta terapêutica (20).

A cada novo gene descoberto, relacionado a determinado tipo de câncer, fica a dúvida se essa descoberta poderá acrescentar algo para o diagnóstico, prognóstico e tratamento do mesmo. Os testes realizados para identificar essas alterações são denominados testes genéticos. A história do teste genético começa com o DNA – uma enorme base de dados químicos localizada no núcleo de cada uma das células do corpo – e carrega um completo conjunto de instruções para produzir as proteínas que as células necessitam.

Gene $p16^{INK4a}$

O gene supressor de tumor CDKN2A ($p16^{INK4a}$), localizado no cromossomo 9p21, codifica duas proteínas de baixo peso molecular, inibidoras do ciclo celular: $p16^{INK4a}$ e $p14^{ARF}$, de uma sequência genômica parcialmente compartilhada. A primeira atua no controle do ciclo celular, no *check point* G1-S, através da ligação a quinases ciclino-dependentes 4 e 6 (CDK4 e CDK6), inibindo a formação

19-458_a_proteína_p16t.pmd 85 31/3/2010, 10:53

dos complexos ativos CDK-ciclina D. A segunda, chamada de $p14^{ARF}$ (em humanos), é também conhecida por $p19^{ARF}$ (em ratos).

O gene $p16^{INK4a}$ (Figura 3) está, frequentemente, alterado em vários tipos de tumores, e torna-se inativo por mutações na linha germinativa em, aproximadamente, 20% das famílias estudadas propensas a desenvolverem melanoma. Tem sido observada uma susceptibilidade desse gene para o melanoma, porque ele promove as funções inibitórias de crescimento do retinoblastoma (Rb). Em melanomas esporádicos, várias alterações do $p16^{INK4a}$ têm sido relatadas (21, 22). Sua inativação resulta em regulagem anormal do ciclo celular de neoplasias em humanos. Tem sido atribuído papel importante aos ativadores da hipermetilação, em mecanismo de inativação do gene $p16^{INK4a}$, na gênese de tumores (23).

Em 1993, Serrano et al. (25) mostraram que o ciclo de divisão de células eucarióticas é regulado por uma família de proteinoquinases conhecidas como quinases ciclino-dependentes (CDKs). A ativação sequencial de membros individuais dessa família e suas consequentes fosforilações de substratos críticos promovem progressão ordenada pelo ciclo celular. Os complexos formados pela CDK4 e o tipo D de ciclinas estão fortemente implicados no controle da progressão celular, durante a fase G1. Esses autores, utilizando técnicas de biologia molecular (uso de plasmídeos), demonstraram que a p16 interage, especificamente, com CDK4.

Para investigar o modo de ação dessa proteína, supressora de tumor, McConnel et al. (26) utilizaram células U2-OS, células epiteliais do osteossarcoma humano, originalmente conhecidas como linha 2T, consagradas em 1964, nas quais a expressão da p16 pode ser regulada pela adição ou remoção de isopropilranosídeo. Como esperado, a indução do $p16^{INK4a}$ resulta na parada do ciclo celular em G1

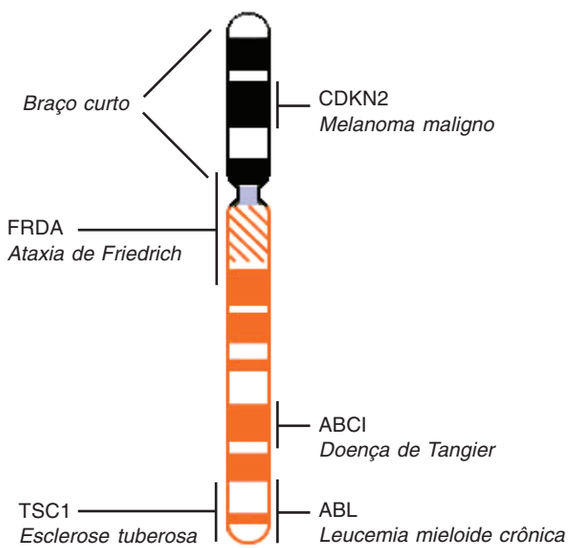


FIGURA 3 – Cromossomo 9 (24).

por inibição da fosforilação da proteína Rb (pRb) pelas quinases ciclino-dependentes CDK4 e CDK6. Por outro lado, a indução do $p16^{INK4a}$ também causa marcada inibição da atividade da CDK2.

Mutações de ponto no gene $p16^{INK4a}$, também conhecido como p16, CDKN2, MTS1 e INK4a, são encontradas em vários tipos de tumor. Em virtude da função dos produtos derivados dessas mutações naturais não terem sido completamente exploradas, Wendell et al. (27) investigaram as atividades funcionais de um largo espectro de ocorrências naturais de mutações em proteínas p16. Para isso, dezesseis proteínas p16 mutantes, associadas ao câncer, resultantes de mutações com sentido trocado (troca de aminoácido – *missense mutation*), foram caracterizadas pela sua habilidade em se unir e inibir as quinases ciclino-dependentes – CDK4 e CDK6 – e induzir a parada do ciclo celular na fase G1. Concluíram os pesquisadores que, entre as dezesseis mutações examinadas, nove tinham defeitos funcionais detectáveis, e três mutantes (D84V, D84G e R87P) tinham defeitos na ligação à CDK, na inibição da quinase e na parada do ciclo celular. As mutações correspondentes estão localizadas na terceira sequência de aminoácidos, em torno de 33, conhecida como *ankyrin repeats* (Figura 4), numa região altamente conservada, onde se acredita seja produzida a clivagem para a ligação da CDK.

Três mutantes (P48L, D74N e R87L) têm defeito na inibição da quinase e na parada do ciclo celular. Entre as dez mutantes, com ligação normal à CDK e atividade inibitória, três (N71S, R80L e H83Y) têm defeito somente na sua habilidade de induzir a parada do ciclo celular. Então, as proteínas mutantes p16 que mantêm as ligações com CDK4 e CDK6 podem ter outros defeitos funcionais sutis. Todas as nove mutações que levam à incapacidade funcional mapeiam a porção central da proteína p16. As sequências de aminoácidos II e III (*ankyrin repeats*) parecem ser mais críticas para a função da p16, enquanto as mutações, nas sequências I e IV, são menos capazes de interromper a função da p16 (27).

Antes das análises que correlacionaram a susceptibilidade ao melanoma, a forma da herança do melanoma familial não havia sido estabelecida, e os pesquisadores discutiam a possibilidade de um gene responsável. Um local, no cromossomo encarregado dessa susceptibilidade – CDKN2 (p16, MTS1) – foi encontrado, no braço curto do cromossomo 9, como mencionado anteriormente, onde foram detectadas várias deleções, tanto em casos de melanoma como em outros tumores. Entretanto, a demonstração conclusiva do papel desse gene na susceptibilidade ao melanoma tem sido difícil de definir (4).

Em 2005, Carlson et al. descreveram, baseados nos trabalhos de Hayward e Carlson, mutações com perda de função, no *locus* CD2KA (p16INK/p14ARF), que conferem uma suscetibilidade para o melanoma, e são encontradas em, aproximadamente, 25% das famílias propensas a desenvolver melanoma (20).

19-458_a_proteína_p16t.pmd 86 31/3/2010, 10:53

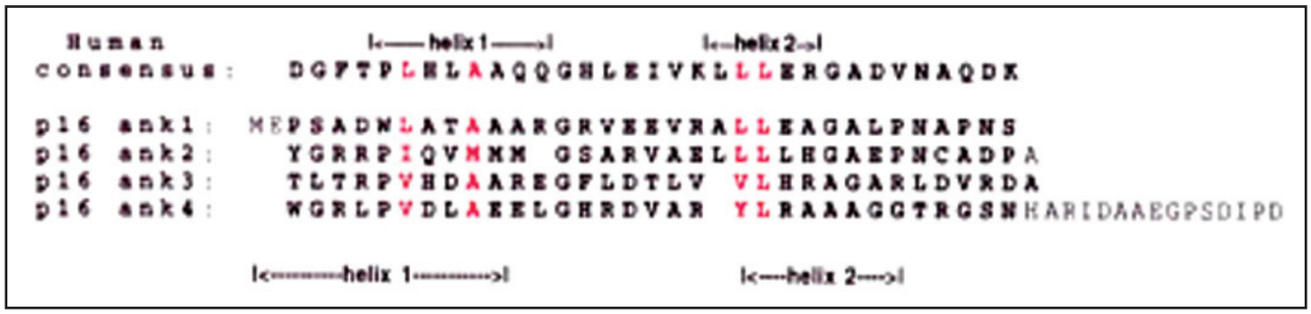


FIGURA 4 – Um alinhamento da sequência de aminoácidos da p16 com a sequência de consenso (sequência de DNA com estrutura e função similares em diferentes organismos) para repetições tipo anquirinas. O consenso humano foi gerado utilizando sequências de repetições tipo anquirinas de 62 proteínas humanas diferentes, usando um método desenvolvido por Anthony-Cahill et al. (1992). O alinhamento mostra a sequência completa de aminoácidos da p16. Os resíduos em letras pretas são aqueles identificados como parte da sequência de consenso tipo anquirinas. Acima da sequência de consenso, observam-se duas hélices previstas, baseadas na conservação da sequência, hidrofobicidade e periodicidade. Os resíduos hidrofóbicos, altamente conservados, são mostrados em vermelho (28).

Straume et al., em estudo realizado e publicado em 2000, para investigar se as diferenças de expressão da p16 estão associadas à proliferação celular tumoral, progressão do tumor e sobrevivência do paciente, avaliaram a expressão imuno-histoquímica da proteína p16, numa série de 202 melanomas em fase de crescimento vertical e 68 metástases correspondentes, e compararam os resultados com a expressão da Ki-67, p53, variáveis clínico-patológicas e dados de sobrevivência. Dos tumores primários, 45% mostraram ausência ou mínima expressão nuclear para a proteína p16. Esses casos estavam, significantemente, associados com expressão alta do Ki-67 ($P < 0.0001$), ulceração ($P = 0.0001$) e invasão vascular ($P = 0.03$). Concluíram os pesquisadores que a ausência ou a mínima expressão da p16 prediz, de maneira significativa (*log-rank test*, $P = 0.0003$), prognóstico pobre quanto à sobrevida, com 37% e 67% de taxa de sobrevida em dez anos para os casos com ausência ou presença da expressão do p16, respectivamente. Na análise multivariada, a expressão da p16 aparece como um fator prognóstico independente (*hazard ratio* – razão de chance – 2,5; intervalo de confiança de 95%, 1.5 a 4.2; $P = 0.0008$), juntamente com a expressão da p53, da Ki-67, localização anatômica, nível de invasão de Clark e invasão vascular. Os achados desses autores indicaram que a perda da expressão nuclear da proteína p16, nos melanomas em fase de crescimento vertical, está associada à proliferação celular do tumor (Ki-67) e, independentemente, prediz piora da sobrevida. Mostraram, também, que casos sem a expressão da p53 tinham melhora na sobrevida do paciente (22).

A revisão, feita por Ortega et al. (29), mostrou que a rota das ciclinas CDK4/6 – D/INK4 – Rb é uma das mutadas, mais frequentemente, em câncer humano. Avaliaram a utilização de animais geneticamente modificados (ratos – *knock in e knock out mice*), na detecção do papel dessa rota no controle do crescimento celular, integrando múltiplos estímulos mitogênicos e antimitogênicos. Com relação ao câncer humano, nessa revisão, enfocaram as mutações que, efetivamente, afetaram as atividades das quinases CDK4 e CDK6 ou a sua regulação. A CDK4 está amplificada e superexpressa em grande variedade de tumores (gliomas, sarcomas, tumores da mama e carcinomas da cérvice uterina) e linhagens de células tumorais. O gene CDK6 está amplificado em certos tipos de doenças malignas, incluindo carcinoma de células escamosas, gliomas e tumores linfoides. Translocações cromossômicas também contam para o alto nível de expressão de CDK6 em tumores linfoides. Mutações de ponto nas sequências de códigos de CDK4 e CDK6 têm sido descritas em tumores humanos e linhagens celulares tumorais, incluindo melanoma e linhagens celulares do neuroblastoma. Essas mutações levam à desregulação das atividades das suas quinases, impedindo a ligação da família de inibidores celulares INK4, sem afetar a afinidade da ciclina CDK4, pela ciclina D1. Provavelmente, nesses pacientes, a atividade da quinase CDK4, embora não aumentada, permanece ativa, por tempo inapropriado, devido à ausência de uma regulação negativa promovida pelos inibidores INK4. A perda da heterozigosidade, em 9p21, ocorre na metade dos tumores da bexiga e em melanomas, e deleções homozigóticas são frequentes em vários tipos de neoplasias. Embora deleções que levam à perda do $p16^{INK4a}$ e $p15^{INK4b}$, assim como do supressor de tumor $p14^{ARF}$, constituam o tipo de mutações mais frequentes, as mutações de ponto, afetando, exclusivamente, o $p16^{INK4a}$, também ocorrem com frequência no câncer de pâncreas e no melanoma. Mais recentemente, tornou-se evidente que os *loci* INK4a-ARF e INK4b participam, frequentemente, no desenvolvimento do tumor por mecanismos epigenéticos que envolvem perda de expressão devido à hipermetilação do promotor. Por exemplo, $p16^{INK4a}$ não é expresso em várias doenças como gliomas, tumores do pulmão ou em tumores da cabeça e pescoço devido à hipermetilação do promotor. Outro evento comum é a perda de um alelo e a metilação de outro. Uma vez que $p16^{INK4a}$ e $p14^{ARF}$ usam promotores diferentes, estudos de metilação dão informação de acor-

19-458_a_proteína_p16t.pmd 87 31/3/2010, 10:53

do com o gene seletivamente silenciado, em cada tipo de tumor (29).

A importância das alterações na patogênese dos nevos displásicos e melanomas esporádicos permanece controversa. Um estudo realizado para descobrir se as alterações do p16/9p21 ocorrem precocemente em lesões precursoras, assim como as relacionadas ao melanoma esporádico, foi feito utilizando microdissecção do DNA. Utilizaram 44 melanomas cutâneos, 14 nevos displásicos e 6 nevos sem atipia e mediram as alterações do p16, na região 9p21, pela análise da perda da heterozigosidade, como detecção das deleções homozigóticas para o p16 éxon 2. A análise revelou que a perda da heterozigosidade em 9p21, circundando diretamente o $p16^{INK4a}$, ocorreu em, aproximadamente, 40% (17/44) dos melanomas, representando todos os níveis de Clark. A perda da heterozigosidade também foi descoberta em 64% (9/14) dos nevos displásicos e 50% (3/6) dos nevos benignos. Deleção homozigótica do p16 foi encontrada em 29% (4/14) de nevos displásicos, mas nunca em nevos benignos. Esses estudos revelam que a perda da heterozigosidade e deleção homozigótica podem afetar, precocemente, o 9p21 e o local do $p16^{INK4a}$, em lesões conhecidas como precursoras do melanoma, mesmo antes do aparecimento citológico evidente da histologia aberrante. Comparações de alterações em nevos e melanomas, em um mesmo indivíduo, revelaram um padrão de eventos progressivos, mas heterogêneos, sugerindo que processos sistêmicos podem afetar esta região 9p21, em vários momentos, durante a progressão do melanoma (30).

Bachmann et al. mostraram que os resultados obtidos em seu trabalho parecem confirmar que a rota p16-Rb possui um papel importante na progressão do tumor e no prognóstico de melanomas em fase de crescimento vertical, enquanto alterações na rota p14-p53 parecem ser menos importantes (31).

Em um estudo baseado na técnica do *tissue microarray*, Alonso et al. (1), em 2004, utilizaram 39 diferentes anticorpos (para o ciclo celular, apoptose, antígenos de melanoma, fatores de transcrição, reparo de falhas do DNA e outras proteínas) e analisaram 165 amostras de melanoma de 88 pacientes, em diferentes fases de progressão histológica: radial, vertical e metastática. A maioria das alterações encontradas estavam ligadas ao controle do ciclo celular na transição G_1/S. A ciclina D1 estava expressa em 48% dos casos com expansão radial (12 de 25) e com perda significativa da expressão em 14% dos casos com crescimento vertical (9 de 65), P = 0.002, enquanto a p16 (89% em casos com crescimento vertical *versus* 71% nos metastáticos, P = 0.009) e $p27^{K1P1}$ (76% nos radiais *versus* 45% nos casos verticais, P = 0.010) estava diminuída em estágios avançados da doença. Nesse estudo, também fazem uma combinação de marcadores biológicos associados com menor sobrevida global em pacientes em fase de crescimento vertical do melanoma, o que forneceu um modelo preditor com quatro anticorpos: Ki67, $p16^{INK4a}$, $p21^{C1P1}$ e Bcl-6. Esse modelo preditor foi validado usando uma série independente de 72 pacientes com melanoma em fase de crescimento vertical. Os autores mostram que o uso do *tissue microarray* permitiu a integração não somente da capacidade de detectar múltiplas proteínas em uma série grande de pacientes, mas também o reconhecimento de subpopulações discretas de células, como melanócitos intraepidérmicos que se constituem no acúmulo celular das fases iniciais da gênese do melanoma maligno. Cada etapa da progressão do melanoma é caracterizada pela expressão de um perfil específico, incluindo: ciclina D1, ciclina A, CDK1, CDK2 e STAT1, na fase de crescimento radial; Ki67, survivina e PKC-B, na fase de crescimento vertical; e ciclina D1, ciclina D3 e perda da p16, BclII e MUM1, no melanoma metastático. Esse estudo ilustra como as células do melanoma, bem como de outros tumores, progridem ao desregular os mecanismos que controlam a proliferação e evitam a morte celular programada. Curiosamente, a progressão é meticulosamente coreografada, e cada passo é distinguido pela expressão de um grupo característico de proteínas. A maioria das proteínas, encontradas alteradas neste estudo, estavam envolvidas no controle da transição G1/S do ciclo celular, estando, dentre elas, a p16. A perda significativa da expressão da p16, na série desse estudo, está correlacionada com estágios avançados do melanoma (doença metastática). A proteína p16, como já apresentado (21-23, 32), exerce uma função inibitória no ciclo celular, atuando no nível da rota da ciclina D/CDK4-Rb. A inativação do $p16^{INK4a}$, por deleções homozigóticas, deleções de ponto e metilação do promotor, está envolvida na gênese do melanoma familial e esporádico (27-30, 32, 33).

Esse estudo desenvolveu, também, um modelo preditor para sobrevivência, incluindo as proteínas 16, Ki67, $p21^{C1P1}$ e Bcl-6. Os dados obtidos do modelo de sobrevivência global identificaram um grupo de pacientes com uma sobrevivência relativamente curta (<6 anos) que parece depender de uma associação entre a ausência da p16 ou a presença da expressão da proteína Bcl-6 em conjunto com alta proliferação (Ki67 > 20) ou com positividade da $p21^{C1P1}$. Concluíram os pesquisadores que a espessura de Breslow e os biomarcadores constituem informações independentes, pois a inclusão do índice de Breslow não produziu nenhuma mudança significativa no modelo preditivo. As séries independentes usadas para validar o modelo confirmaram o valor prognóstico adverso, tanto da perda de expressão da p16 como da aquisição de marcadores do retinoblastoma (1).

Zhang et al., em 2004, apresentaram um estudo, utilizando o método *Western Blotting*, imuno-histoquímica e a técnica de PCR, na tentativa de esclarecer a importância das alterações da p16 no melanoma. Examinaram as deleções do $p16^{INK4a}$ e a expressão da proteína p16 em oito linhagens celulares de melanomas primários e metastáticos humanos não selecionados. Melanócitos normais da pele foram usados como controles internos. Detectaram deleções de éxons inteiros do $p16^{INK4a}$, por meio da técnica de

19-458_a_proteína_p16t.pmd 88 31/3/2010, 10:53

PCR. A expressão da proteína p16 foi examinada pelo *Western Blotting* e imuno-histoquímica. Os resultados mostraram que fragmentos dos éxons 2A, 2C e 3, no gene $p16^{INK4a}$, foram totalmente deletados nas linhas celulares FM28.7 dos melanomas metastáticos, e o fragmento do éxon 3 estava deletado na linha celular FM55M2 de melanoma metastático. A proteína p16 estava fortemente expressa em duas linhas celulares de melanomas primários (FM55P e RaH3), fracamente expressa em uma das linhas celulares de melanoma metastático (FM55M1) e negativa nas outras metástases (FM55M2), quando comparadas às células similares de melanoma primário (FM55P). A proteína p16 estava fortemente expressa em melanócitos da pele normal. A imuno-histoquímica mostrou que a proteína p16 estava localizada, principalmente, no núcleo das células de melanoma e dos melanócitos normais, quando expressa. Deleções do gene $p16^{INK4a}$ foram incomuns, e a perda da expressão da proteína p16 foi um evento comum no melanoma, especialmente nos estágios mais tardios. A expressão da p16 em melanomas está associada, principalmente, ao grau de invasão e metástases, e não à transformação inicial do tumor. Concluíram que a disfunção da proteína p16 libera sua função inibitória da fosforilação da proteína Rb (retinoblastoma), resultando em um descontrole do crescimento celular e, consequentemente, desenvolvimento e progressão tumoral. Sugeriram, também, a hipótese de que a deleção de todos os éxons do gene $p16^{INK4a}$ seja um evento incomum no desenvolvimento do melanoma, pois constataram deleção completa dos éxons em apenas duas das cinco linhagens de células de melanoma metastático. Com relação à expressão "proteica", linhas celulares de melanócitos da pele normal estavam fortemente expressas para a proteína p16, enquanto todas as linhas celulares dos melanomas metastáticos apresentavam perda parcial ou total da expressão da proteína p16, indicando que a perda da expressão dessa proteína é frequente na progressão do melanoma (32).

A expressão da p16 em melanomas primários está associada ao prognóstico e à condição linfonodal, segundo demonstraram Mihic-Probst et al. (34). O estado linfonodal é um importante fator prognóstico em pacientes com melanoma. A expressão da p16 e a taxa de proliferação (MIB-1) de melanomas primários têm sido sugeridas como marcadores de potencial metastático. Neste estudo, a correlação da expressão da p16 e a taxa de proliferação (MIB-1), com a condição linfonodal e a sobrevivência tumor-específica, foram investigadas nos melanomas primários. Analisaram, por meio da imuno-histoquímica, a expressão da p16 e da MIB-1 em 64 pacientes com melanoma cutâneo primário. Trinta e quatro nevos foram usados como controle. Todos os pacientes foram submetidos ao estadiamento do linfonodo sentinela (LNS). Três padrões de coloração da p16 foram observados: uma combinação de coloração nuclear e citoplasmática, somente citoplasmática e ausência de expressão da p16. Os 34 nevos mostraram coloração da p16, tanto nuclear como citoplasmática, enquanto a expressão da p16 era negativa em 14 de 64 (22%) melanomas. O nível de expressão da p16 diminuía, gradativamente, do nevo benigno para o melanoma sem metástase, e para o melanoma com metástase. Houve uma correlação significativa entre a expressão citoplasmática da p16 e a ausência de metástase ($p<0.05$). Morte pela doença estava correlacionada com a ausência da imunocoloração ($P=0.01$). A expressão da MIB-1 não estava associada à sobrevivência. Esses estudos confirmam a relevância da expressão da p16 como marcador prognóstico em pacientes com melanoma. Também foi demonstrado que a imunocoloração citoplasmática da p16, em melanomas primários, poderá servir como preditor da condição linfonodal. Portanto, concluíram que a avaliação da expressão da p16 é de grande valor no planejamento cirúrgico do melanoma (34).

Fearfield et al. (33), em trabalho realizado em março de 2007, informaram ser este o primeiro a demonstrar a perda significativa da expressão da p16 em melanomas muito finos, recidivados. Mostraram, claramente, que a perda de expressão da proteína p16 está relacionada a um pior prognóstico para os pacientes. Embora a grande maioria dos pacientes com melanomas finos (<0,76 mm) obtenha a cura com a ressecção cirúrgica da lesão, 2 a 18% desses pacientes apresentam recidiva da doença. O objetivo desse estudo foi, exatamente, estabelecer o potencial de novos marcadores de prognóstico em melanomas muito finos. Salientaram que esse é o primeiro trabalho a mostrar uma significante perda da p16 em melanomas muito finos que apresentaram recidiva.

Estudos imuno-histoquímicos têm mostrado a correlação entre a perda da expressão da proteína p16 e progressão do melanoma (2, 22, 32, 34), embora nunca tenha sido, especificamente, investigada em melanomas muito finos. A imunocoloração das secções foi medida de três maneiras: imunorreatividade (p16, CD95 e CD95L), percentagem de células positivas ou núcleos (HPA^{*} e p16, respectivamente) e índice de coloração (p16), por meio da imuno-histoquímica. Inicialmente, selecionaram 45 casos de melanoma muito fino com recorrência, e 48 controles com melanomas cutâneos muito finos sem recidiva. Vinte e cinco casos e 15 controles foram eliminados do estudo após revisão clínico-patológica.

A imunocoloração para p16 foi realizada em cortes de 18 casos e suas 17 subsequentes metástases e 28 controles. Comparando casos e controles, com relação à imuno-histoquímica para a p16, os autores descreveram uma mediana do índice de coloração de 2 (IIQ- Intervalo interquartil: 2-4) para os casos, e uma mediana de 4 (IIQ: 2-6) para os controles e um valor $P = 0.03$. Comparando os casos com as metástases, a mediana do índice de coloração foi de 0 (zero) para as metástases (IIQ: 0-2; IC 95%) e um valor $P < 0.001$. Ainda, somente 22% dos cortes de melanomas primários tinham índice de coloração 0 (zero), em comparação com 76% das metástases. Esses resultados mostraram, em todos os sistemas de escores empregados, uma significativa

19-458_a_proteína_p16t.pmd 89 31/3/2010, 10:53

redução da imunocoloração da p16 em melanomas muito finos, nos casos que apresentaram recidiva, quando comparados com os controles (sem retorno da doença). Perda mais significativa da expressão da p16 foi vista nas metástases, comparativamente aos tumores primários. Há, nessa pesquisa, uma autocrítica dos autores com relação à limitação do estudo em função do pequeno número de casos incluídos, e ao fato de ter sido uma análise retrospectiva, embora os dados tenham sido mantidos prospectivamente. Salientam que, por ser um estudo pequeno, mesmo diferenças maiores entre casos e controles não atingiriam significância estatística. Como a recidiva de melanomas muito finos é extremamente rara, também o número de casos seria, inevitavelmente, pequeno.

Perspectivas futuras

Com o avanço no conhecimento da patogênese do melanoma, pela oncologia molecular, novos marcadores, mais específicos, poderão surgir para auxiliar o diagnóstico, prognóstico e tratamento dessa doença.

Até o surgimento de novos marcadores que possibilitem melhor orientar quanto à progressão e/ou prognóstico de um paciente com um determinado melanoma cutâneo, a proteína p16 parece ser um interessante marcador que, além de sugerir uma maior agressividade de um tumor sobre outro, por sua expressão, poderá auxiliar na conduta terapêutica.

De acordo com os trabalhos de vários autores (1, 2, 22, 32, 34), a evidência de uma expressão forte da proteína p16 em nevos benignos e melanomas finos, contrastando com a expressão moderada em melanomas com crescimento vertical e/ou metástases regionais, e a ausência de expressão em melanomas com metástases a distância, mostra a progressão da doença, à medida que se perde a expressão da proteína p16.

Straume et al. (22), em sua série de 202 casos de tumores primários, em fase crescimento vertical, e 68 metástases correspondentes, mostraram que coloração nuclear mínima ou ausente é preditora para sobrevida livre de doença, com 37% e 67% de sobrevida estimada para dez anos para casos com ausência ou presença da expressão da p16, respectivamente.

As técnicas de *microarray* e *tissue array* (1) têm sido úteis tanto na determinação de sequenciamento genético, reconhecendo mutações, como na identificação de diferentes expressões de marcadores (proteínas), relacionando-os com a evolução do melanoma. Provavelmente, em um futuro muito próximo, com a redução de custos do método, ele poderá se tornar muito útil não só na identificação individualizada de casos com maior potencial agressivo, mas na indicação sobre o melhor caminho

Assim, mesmo em casos em que a técnica do LNS tenha mostrado ausência de micrometástases, uma expressão fraca ou ausente na imuno-histoquímica para a proteína p16 poderá indicar uma mudança na conduta terapêutica ou uma busca mais minuciosa de possíveis metástases em outros sítios (*skipping* metástases). Terapêutica a ser seguida para cada paciente.

Os estudos imunológicos que procuram desvendar a existência de imunossupressão no LNS poderão ser, também, um caminho importante na elucidação do comportamento evolutivo do melanoma, isto é, mostrar a rota das metástases e os mecanismos pelos quais eles progridem (17, 18).

A evolução da oncologia molecular, nos próximos anos, certamente, identificará outros genes e/ou proteínas envolvidos na origem, crescimento e progressão do melanoma. Como consequência, haverá novas armas de terapia gênica que permitirão manter um controle sobre o crescimento e evitar a disseminação metastática ou, mesmo, o surgimento desta grave doença – o melanoma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alonso SR, Ortiz P, Pollán M, Pérez-Gómez B, Sánchez L, Acuña MJ, et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles. Am J Pathol, 2004; 164(1):193-203.
2. Ministério da Saúde do Brasil – INCA – Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/> <http://www.inca.gov.br/conteudo_ view.asp?id=335> Acesso: 17. Julho. 2008
3. Lens MB, Dawes M. Global perpectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous melanoma. Br J Dermatol 2004; 150(2):179-85.
4. Skolnick MH, Cannon-Albright LA, Kamb A. Genetic predisposition to melanoma. Eur J Cancer, 1994; 30A(13):1991-5.
5. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. Arch Dermatol. 1988; 124:869-71.
6. Barnhill RL. Criteria for diagnosis and classification of melanoma. In: Barnhill RL, editor. Pathology of malignant melanoma. New York: Springer-Verlag; Dec 2003. p. 2-17.
7. Clark WH Jr. A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis and biologic behavior. In: Montagna W, Hu F, editors. Advances in the Biology of the Skin. New York: Pergamon, 1967; 8:621-47.
8. Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. Cancer Res 1969; 29:705-27.
9. Cotran R, Kumar V, Collins. Robbins Pathologic Basis of Disease. In: Murphy GF, Mihn MCJr., editors. The Skin. 6th ed. Philadelphia, USA: WB Saunders Company; 1999. p. 1178.
10. National Cancer Institute – Melanoma 208/01302. National Cancer Institute p.1-15. Disponível em: <http://cancerweb.ncl.ac.uk/cancernet/101302.html> Acesso: 20. Mar. 2008.
11. Essner R. Sentinel lymph node biopsy and melanoma biology. Clin Cancer Res 2006 April 1; 12(7Suppl):2320s-5s.
12. Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. Cancer 1977 Feb; 39(2):456-66.
13. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. Arch Surg. 1992 Apr; 127(4):392-9.
14. Essner R, Bostick PJ, Glass EC, Foshag LJ, Haigh PI, Wang HJ, et al. Standardized probe-direct sentinel node dissection in melanoma. Surgery 2000; 127:26-31.

19-458_a_proteína_p16t.pmd 90 31/3/2010, 10:53

15. Fonseca LMB. Linfonodo Sentinela. Radiol Bras, vol.35 n. 5 – São Paulo Sept/Oct 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010039842002000500001& script= sci_arttext& tlng =in>. Acesso: 15. Julho. 2008.
16. McMasters KM, Noyes RD, Reintgen DS, Goydon JS, Beitsch PD, Davidson BS, et al. Lessons learned from the Sunbelt Melanoma Trial. J. Surg Oncol 2004; 86:212-23.
17. Cochran AJ, Morton DL, Stern S, Lana AMA, Essner R, Wen DR, et al. Sentinel lymph nodes show profound down-regulation of antigen presenting cells of the paracortex: implications for tumor biology and treatment. Mod Pathol 2001; 16:604-8.
18. Alitalo K, Mohia S, Ruosiahti E. Lymphangiogenesis and cancer: meeting report. Cancer Res 2004; 64:9225-9.
19. Torabian S, Kashani-Sabet M. Biomarkers for Melanoma. Curr Opin Oncol 2005; 17:167-71.
20. Carlson JA, Ross JS, Slominski A, Linette G, Mysliborski J, Hill J, et al. Molecular diagnostics in melanoma. J Am Acad Dermatol 2005 May; 52(5):743-75.
21. Straume O, Smeds J, Kumar R, Hemminki K, Akslen LA. Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. Am J Pathol, 2002 July; 161(1):229-37.
22. Straume O, Sviland L, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. Clin Cancer Res 2000 May; 6:1845-53.
23. Hong SM, Choi J, Ryu K, Ro JY, Yu E. Promoter hypermethylation of the p16 gene and loss of its protein expression is correlated with tumor progression in extrahepatic bile duct carcinomas. Arch Pathol Lab Med 2006 Jan; 130(1):33-8.
24. Genes and Diseases. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres. fcgi/gnd/ch17d1.pdf> Acesso em: 25. Julho. 2008.
25. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control, causing specific inhibition of cyclin D/CDK3. Nature 1993 Dec; 366:704-7.
26. McConnel BB, Gregory FJ, Stott FJ, Hara E, Peters G. Induced expression of p16 ^{INK4a} inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-CDK-inhibitor complexes. Mol Cell Biol, 1999 Mar; 19(3):1981-9.
27. Wendell G, Yarbrough WG, Buckmire RA, Bessho M, Liu ET. Biologic and biochemical analyses of p16INK4a mutations from primary tumors. J Natl Cancer Inst 1999 Sep 15; 91(18):1569-74.
28. Boice JA, Fairman R. Structural characterization of the tumor suppressor p16, an ankyrin-like repeat protein. Protein Sci. 1996; 5:1776-84.
29. Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. Biochim Biophys Acta 2002; 1602:73-87.
30. Tran TP, Titus-Ernstoff L, Perry AE, Ernstoff MS, Newsham IF. Alteration of chromosome 9p21 and/or p16 in benign and dysplastic nevi suggests a role in early melanoma progression. Cancer Causes Control 2002; 13:675-82.
31. Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Altered expression of cell cycle regulators Cyclin D1, p14, p16, CDK4 and Rb in nodular melanomas. Int J Oncol 2004; 25:1559-65.
32. Zhang H, Rosdahl I. Deletion in p16^{INK4a} and loss of p16 expression in human skin primary and metastatic melanoma cells. Intern J Oncol 2004; 24:331-5.
33. Fearfield LA, Larkin JM, Rowe A, A'Hern R, Fisher C, Francis N, et al. Expression of p16, CD95, CD95L and Helix pomatia agglutinin in relapsing and nonrelapsing very thin melanoma. Br J Dermatol 2007 Mar; 156(3):440-7.
34. Mihic-Probst D, Mnich CD, Oberholzer PA, Seifert B, Sasse B, Moch H, et al. p16 expression in primary malignant melanoma is associated with prognosis and lymph node status. Int J Cancer 2006 May 1; 118(9):2262-8.

✉ Endereço para correspondência:
Jorge Antonio Caleffi Fauri
Av. Maryland – 1367/902
90440-191 – Porto Alegre, RS – Brasil
☎ (51) 3222-6295
fauri47@gmail.com

Recebido: 21/7/2009 – Aprovado: 23/7/2009

19-458_a_proteína_p16t.pmd 91 31/3/2010, 10:53