

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

**ESTUDO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA p16 EM  
MELANÓCITOS DE NEVOS MELANOCÍTICOS SUBMETIDOS A TRAUMA  
MECÂNICO OU À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA**

Autor: Andre Avelino Costa Beber

Orientador: Prof. Dr. Lucio Bakos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre

2008

## **DEDICATÓRIAS**

Dedico este trabalho aos meus pais, que apesar do pouco estudo, souberem valorizar e incentivar seus filhos no caminho das letras.

Dedico especialmente à minha esposa Rejane, e aos meus filhos Pedro e Maria Clara, primeiro, porque toleraram a minha ausência física e/ou mental, e o mais importante, porque me fazem perceber que poucas coisas na vida são realmente importantes.

## **AGRADECIMENTOS**

Os agradecimentos aqui colocados estão em ordem cronológica de minha formação, e todos, por um motivo especial, são demasiado importantes.

A Profa. Dra. Shirley Matte, por ter me apresentado ao mundo maravilhoso da Dermatologia.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Bopp Muller, por ter visto em mim as qualidades necessárias e aberto as portas do Serviço de Dermatologia do HCPA.

À Dra. Márcia Zampese, por sua amizade e por ensinar-me que somos responsáveis por aquilo que conquistamos.

Às Dras. Mirian Pargendler, Isabel Kuhl, Ane Simões Pires e Marlene Weissbluth, por seu conhecimento e sorriso amigo.

Aos colegas de especialização, por terem multiplicado nossos momentos alegres e dividido nossas tristezas.

Aos professores do Serviço de Dermatologia do ABC-SP, pelo apoio ao meu ao meu aprimoramento dermatológico.

Ao Prof. Dr. Lucio Bakos, por ter aceitado de volta alguém que havia partido há tanto tempo. Obrigado pela honra de tê-lo como o meu Orientador.

Aos colegas Dr. Renato Bakos, Dra. Taciana Dini e Dr. José Carlos Mariante, por terem me ajudado nos meus primeiros passos na pós-graduação e pelo fornecimento de material de pesquisa.

À Profa. Dra. Tania Cestari, que me corrigiu com dedicação e carinho, para que eu melhorasse sempre.

Ao Prof. Dr. Andre Cartell, por sua amizade e dedicação, e por ter sempre disponibilizado seu grande conhecimento em Dermatopatologia.

A Sra. Bernardete Hahmeyer, por seu auxílio e carinho.

A Sra. Neiva Copetti, por sua dedicação na confecção das lâminas de IHQ, este trabalho só foi concluído graças ao seu esforço pessoal.

Ao Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva, que, sem me conhecer, abriu as portas de seu Serviço para conduzir o meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Mario Wagner, pelo seu conhecimento e competência na análise estatística.

Ao acadêmico Leonardo Gazzi Costa, pelo seu auxílio na realização desse trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da UFRGS, pelo incentivo e conhecimento que oferecem nesta difícil e bem cumprida tarefa de formar novos mestres e doutores.

Ao FIPE – HCPA, pelo auxílio financeiro na confecção das lâminas de histopatologia e IHQ.

## SUMÁRIO

<b>1. RESUMO</b>	<b>06</b>
<b>2. LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>07</b>
<b>3. LISTA DE FIGURAS</b>	<b>10</b>
<b>4. LISTA DE TABELAS</b>	<b>11</b>
<b>5. INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>6. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>15</b>
<b>6.1. Nevos Melanocíticos</b>	<b>15</b>
<b>6.2. Melanoma</b>	<b>21</b>
<b>6.3. Radiação Ultravioleta</b>	<b>27</b>
<b>6.4. Trauma Mecânico</b>	<b>31</b>
<b>6.5. Nevos e melanomas</b>	<b>33</b>
<b>6.6. Gene CDKN2A e a proteína p16</b>	<b>42</b>
<b>7. OBJETIVOS</b>	<b>58</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>59</b>
<b>9. ARTIGO EM INGLÊS</b>	<b>85</b>
<b>10. CONSIDERAÇÕES GERAIS</b>	<b>109</b>
<b>11. ANEXOS</b>	<b>110</b>
<b>11.1. Anexo 1 - Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa</b>	<b>110</b>
<b>11.2. Anexo 2 – Resultados gerais</b>	<b>111</b>

## 1. RESUMO

O número total de nevos melanocíticos (NM) é um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma cutâneo (MC); além disso, em uma significativa fração dos casos os NM podem ser também precursores desta neoplasia.

CDKN2A é o gene supressor tumoral mais implicado na gênese do melanoma. As mutações desse gene ocorrem em aproximadamente 40% dos casos de melanoma familiar, enquanto o silenciamento não mutacional ocorre em até 75% dos melanomas esporádicos. Ele codifica a proteína p16, que tem sua expressão progressivamente diminuída com a evolução do melanoma, sendo bem expressa nos NM e pouco expressa nos melanomas avançados.

O presente estudo avaliou as alterações na expressão imunohistoquímica (IHQ) da proteína p16 nos melanócitos dos NM expostos a duas doses eritematosas mínimas (DEM) de radiação ultravioleta B (RUVB), ou a trauma mecânico controlado. Trinta e sete NM tiveram metade de sua superfície exposta à RUVB enquanto 44 NM foram parcialmente dermoabradidos.

A expressão IHQ da p16 estava significativamente diminuída no lado irradiado dos NM, comparada com o lado controle. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão IHQ da proteína p16 nos NM dermoabradidos.

## 2. LISTA DE ABREVIATURAS

ARF	“frame” de leitura alternativo
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CCNM	cânceres cutâneos não melanoma
CDK4	cinase dependente de ciclina 4
CDKN2A	Inibidor da cinase dependente de ciclina 2A
CDKN2B	Inibidor da cinase dependente de ciclina 2B
CI	intervalo de confiança
CM	melanoma cutâneo
DEM	dose eritematosa mínima
DNA	ácido desoxidorribonucléico
DS	dermabraded side
EUA	Estados Unidos da América
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
FISH	fluorescência de hibridização <i>in situ</i>
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
H-E	hematoxilina e eosina
HMB-45	negro melanoma humano 45
IC	intervalo de confiança
IHQ	imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INK4A	inibidor da cinase 4A

IS	lado irradiado
kDa	quiloDalton
LM	lentigo maligno
LMM	lentigo maligno melanoma
MC	melanoma cutâneo
MDM2	murine double minute 2
MED	dose eritematosa mínima
MES	melanoma de espalhamento superficial
MLA	melanoma lentiginoso acral
mm	milímetros
MMP	metaloproteinase da matriz
MN	nevo melanocítico
MTS	supressor tumoral múltiplo
NCI	National Cancer Institute
nm	nanômetro
NM	nevo melanocítico
NMA	nevo melanocítico adquirido
NMC	nevo melanocítico congênito
NDS	lado nao dermoabradido
NIS	lado nao irradiado
OR	<i>odds ratio</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
p16	proteína de 16 kDa



p53	proteína de 53 kDa
PCR	reação em cadeia de polimerase
RGB	vermelho, verde e azul
Rb	retinoblastoma
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
ROS	espécimes reativos de oxigênio
RR	risco relativo
RT-PCR	reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa
RUV	radiação ultravioleta
RUVB	radiação ultravioleta B
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results
TNF	fator de necrose tumoral
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USA	United States of America
UV	ultravioleta
UVA	ultravioleta A
UVB	ultravioleta B
UVC	ultravioleta C
VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular
µm	micrômetro

### 3. LISTA DE FIGURAS

#### REVISÃO DA LITERATURA

- FIGURA 1:** Representação esquemática do cromossomo 9 43
- FIGURA 2:** O *locus* CDKN2A codifica 2 proteínas envolvidas  
ciclo celular 45
- FIGURA 3:** Os genes p16 e p15, localizados no braço curto  
do cromossomo 9 46
- FIGURA 4:** As mutações do p16 (INK4A) e do ARF afetam  
os mecanismos do Rb e do p53 no ciclo celular 48

#### ARTIGO EM INGLÊS

- FIGURE 1:** Panoramic view of immunohistochemical expression p16  
in a compound nevus (x25) 106
- FIGURE 2:** High magnification of immunohistochemical expression  
of protein p16 in melanocytes (x400) 106
- FIGURE 3:** Manual counting of positive melanocytes 107
- FIGURE 4:** Automatically measurement of brown areas 107
- FIGURE 5:** Different immunohistochemical expression of  
p16 protein in an irradiated nevus. A – irradiated side;  
B – non irradiated side (x400) 108

## 4. LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DA LITERATURA

<b>TABELA 1.</b> Estatísticas do melanoma em 4 países	24
<b>TABELA 2.</b> RR para MC a partir do nº de NM comuns	36
<b>TABELA 3.</b> RR para MC a partir do nº de NM atípicos	37
<b>TABELA 4.</b> Famílias com mutações germinativas para o melanoma	51
<b>TABELA 5.</b> Expressão IHQ da proteína p16 em malanomas	52

### ARTIGO EM INGLÊS

<b>TABLE 1:</b> Comparison of p16 expression on the treated and the non treated sides of nevi, according to irradiation or dermabrasion	105
---	-----

## 5. INTRODUÇÃO

Os nevos melanocíticos (NM) são normalmente definidos por sua descrição histopatológica, ou seja, são coleções de células produtoras de pigmento, de origem melanocítica, que são restritos à epiderme ou à derme, ou acometer ambas. São malformações resultantes de uma desordem do desenvolvimento embrionário, e podem estar presentes ao nascimento ou surgir posteriormente durante a vida (1). Os nevos melanocíticos adquiridos (NMA) surgem usualmente a partir dos 6 a 12 meses de vida e crescem em tamanho e quantidade durante a infância e a puberdade, sendo este o período de maior aumento no número de lesões (2).

O interesse pelo estudo dos NM aumentou consideravelmente nas últimas décadas, concomitante ao aumento da incidência do melanoma cutâneo (MC). O melanoma é o tumor maligno que se desenvolve a partir dos melanócitos (3;4) e sua incidência aumentou na população caucasiana em todo o mundo, sendo a neoplasia com maior elevação na incidência nas últimas décadas (5) Apesar de representar apenas 4% dos cânceres cutâneos, é responsável por 80% das mortes por neoplasias de pele (6).

Em 1978 Clark e colaboradores descreveram famílias com vários indivíduos com melanoma de surgimento precoce, que apresentavam mais de uma centena de NM e nevos grandes e atípicos (7); após isso, vários pesquisadores analisaram a relação entre os NM e o MC. Estudos epidemiológicos demonstraram de forma clara que a presença de mais de 50 NM ou mais de 5 NM atípicos são os fatores de risco

individuais mais importantes para o desenvolvimento do MC (8-13). Entretanto, os NM não podem ser considerados apenas marcadores de risco para o MC, em uma proporção considerável dos casos eles constituem lesões precursoras dessa neoplasia e a maior evidência disso é a presença de remanescentes histológicos de NM benignos em 20 a 60% dos MC (14). Ademais, há relatos de pacientes que referem a existência de uma lesão antiga, estável, sobre a qual se desenvolveu o melanoma, às vezes relacionado a traumatismo agudo ou de repetição (15).

A exposição à radiação ultravioleta (RUV) solar é o principal fator de risco ambiental para o desenvolvimento tanto para dos NM, quanto dos MC (10;14;16;17). Sob essa perspectiva, Tronnier e colaboradores avaliaram as alterações histopatológicas e imunoistoquímicas (IHQ), *in vivo*, dos NM submetidos experimentalmente a queimaduras por radiação ultra-violeta B (RUVB) e eles constataram que em alguns casos estes NM simulavam um melanoma inicial (18-20).

O estudo das famílias que apresentavam vários indivíduos acometidos pelo melanoma levou à identificação de um gene supressor tumoral no cromossoma 9, o *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, ou simplesmente CDKN2A, que apresenta mutações e rearranjos em 40% dos indivíduos com diagnóstico de melanoma, dentro dessas famílias (21-25). Este é o principal gene conhecido implicado no desenvolvimento do melanoma e codifica duas proteínas: p16 e ARF, que agem no ciclo celular impedindo a progressão da fase G1 para a fase S (26).

Uma proteína p16 intacta é essencial para impedir a progressão do ciclo celular (4). Os estudos que avaliam a expressão da p16 mostram que os NM, em

sua quase totalidade, expressam homoganeamente essa proteína, enquanto a maioria dos melanomas avançados não o faz (27-29). Entretanto, não existe consenso na literatura se essa diminuição é um evento inicial na tumorigênese, pois alguns estudos mostram que os melanomas *in situ* expressam uniformemente essa proteína (28;29), enquanto outros mostram diminuição na expressão nestas lesões (27). Não existem estudos que avaliam a expressão da proteína p16 em melanócitos de nevos melanocíticos submetidos experimentalmente, *in vivo*, à RUV ou a trauma mecânico.

Neste estudo de *quasi-experimento*, avaliamos a ocorrência de modificações na expressão da proteína p16 em dois grupos de NM: os que tiveram metade de sua superfície submetida à RUVB, e os que tiveram metade de sua superfície dermoabradida.

O objetivo deste estudo é avaliar se determinadas agressões físicas (RUVB e dermoabrasão) modificam a expressão da proteína p16 - importante no controle do ciclo celular, entre os lados irradiados e não irradiados, e entre os lados dermoabradidos e não dermoabradidos, dos NM. Ou seja, observar se essas formas de agressões físicas interferem na senescência celular, na qual a p16 tem papel primordial, levando ao desbloqueio do ciclo celular e ao início de um processo proliferativo que poderia levar ao MC.

## 6. REVISÃO DA LITERATURA

### 6.1. Nevos Melanocíticos

Não existe uma definição precisa para nevos melanocíticos (NM) nos principais livros-texto de Dermatologia (2;3;30), nos quais são descritos como agrupamentos de células melanocíticas alteradas, também chamadas “células névicas”, que têm origem nos melanoblastos e migram da crista neural para a epiderme (3).

Os NM podem ser classificados em congênitos ou adquiridos. Os nevos melanocíticos congênitos (NMC) são aqueles presentes ao nascimento. Os NM que surgem em crianças entre 1 mês e 2 anos de vida, com achados clínicos e histológicos indistinguíveis dos NM congênitos são chamados *nevus tardive* (2;31). Os NM que surgem posteriormente são os NM adquiridos (NMA) (2).

#### Nevos Melanocíticos Congênitos

A incidência dos nevos melanocíticos congênitos (NMC) entre 0,1 – 2,1% dos neonatos (32;33), mas esse número pode ser maior, pois os NMC nem sempre estão presentes ao nascimento, podendo surgir até os 2 anos de vida (3), e, quando pequenos, ser indistinguíveis dos nevos melanocíticos adquiridos (NMA) (2).

Os NMC são “arbitrariamente” divididos em pequenos, intermediários e gigantes, de acordo com seu diâmetro (1-3;34;35). No adulto, são considerados pequenos os menores de 1,5 cm de diâmetro, os intermediários entre 1,5 e 19,9 cm de diâmetro e grandes ou gigantes os iguais e os maiores de 20 cm de diâmetro.

Outra maneira de classificar os NMC quanto ao seu tamanho é relacioná-lo ao procedimento cirúrgico necessário para sua exérese, isto é: pequenos podem ser submetidos à exérese e sutura simples; intermediários podem necessitar enxerto ou retalho cutâneo enquanto os NMC gigantes freqüentemente não podem ser removidos ou necessitam de remoções seriadas. Também são classificados como gigantes quando cobrem mais de 30% da área corporal (2;31) e dependendo da localização recebem denominações especiais, tais como: nevo em maiô, em calção de banho, pulôver (36).

Os NMC pequenos podem ser clinicamente indistinguíveis dos NMA. Geralmente têm formato arredondado ou oval e bordas regulares e bem delimitadas. Nos neonatos podem ser relativamente pouco pigmentados, planos ou pouco elevados e sem pêlos. Com o crescimento o nevo pode tornar-se progressivamente mais escuro, de marrom a preto, e tornar-se piloso. Sua superfície varia de lisa a rugosa e cerebriforme. Os NMC gigantes apresentam as mesmas características clínicas, mas em grandes proporções, além de apresentarem numerosas lesões satélites menores. O surgimento de nódulos deve ser sempre submetido a exame histológico para avaliação de transformação maligna (2).

#### Nevos Melanocíticos Adquiridos

Os nevos melanocíticos adquiridos (NMA) são classificados por critérios histopatológicos, de acordo com a localização dos ninhos celulares em relação à junção dermo-epidérmica, em juncionais, intradérmicos ou compostos. Nos NM juncionais os ninhos celulares estão agrupados junto à camada basal; nos



intradérmicos há ninhos somente no derma e nos compostos estão junto à basal e também no derma (2).

Os NMA são lesões arredondadas ou ovais, de bordas regulares com diâmetro entre 2 e 6 mm. Sua coloração é habitualmente uniforme, em tons de marrom. Os NM juncionais são usualmente máculas de coloração marrom-escura, os compostos são mais claros e papulosos, enquanto os intradérmicos são mais papulosos, de coloração mais clara ou cor da pele (2;37).

O número de NMA aumenta progressivamente durante a infância e puberdade e vários estudos avaliaram essa evolução. Whiteman e colaboradores relataram que a média do número de NM aumenta de zero, em crianças de 12 – 17 meses, para 12 entre as maiores de 42 meses (16). Numa coorte com 1812 crianças, na Alemanha, o número de NM passou de 3, aos 2 anos, para 19, nas mesmas crianças, aos 7 anos (38). Um estudo na Austrália mostrou um aumento de 130,1 nevos/m<sup>2</sup> na faixa etária dos 12 – 13 anos para 215,5 nevos/m<sup>2</sup> após um seguimento de 4 anos (39). O pico ocorre na terceira década de vida, em torno de 33 NM nas mulheres e 22 NM nos homens, com posterior declínio, chegando a números similares aos das crianças pré-púberes na 8<sup>a</sup> década de vida (2;39;40).

A exposição à luz solar nos primeiros anos de vida é o único fator ambiental consensualmente aceito no desenvolvimento dos NM e do MC (16), embora o tipo de associação não esteja completamente esclarecido. Alguns estudos identificaram as queimaduras solares na infância e a exposição solar prolongada com o surgimento dos NM (39;41;42).

Entretanto, além dos fatores externos, os fatores constitucionais e familiares também determinam a quantidade de NM. Wiecker e colaboradores, examinando 1812 crianças, concluíram que a quantidade dos NM está mais fortemente associada com a contagem de NM nos pais, e basta a exposição solar moderada ao sol no verão alemão, sem queimaduras, para a indução dos NM (17). Somam-se a isso os resultados de vários estudos que apontam a pele clara, cabelos ruivos, olhos azuis e a propensão a queimaduras solares como fatores de risco individuais para o desenvolvimento dos NM e MC (43-47).

A propensão individual também fica clara ao observarmos o estudo realizado com gêmeos por Bataille e colaboradores, no qual a concordância no número de NM foi muito maior nos gêmeos monozigóticos de que nos gêmeos dizigóticos (48).

### Nevo Atípico

O nevo atípico também é chamado de nevo displásico ou nevo de Clark. É geralmente uma variação do NM composto, com características que ora se assemelham a NMA e ora ao MC (3). São usados vários critérios para o diagnóstico clínico dos nevos atípicos: assimetria, bordas irregulares e mal definidas, tamanho entre 5 e 15 mm, superfície plana, eventualmente podem ter o centro papuloso e uma complexidade de cores maior do que os NM adquiridos, porém menor do que os MC (8;16).

Devido à falta de consenso sobre os critérios diagnósticos do nevo atípico (49), sua prevalência é variável nos estudos. Roush e colaboradores examinaram biópsias de 91 NM classificados clinicamente como atípicos e, destes, só 23 foram

classificados histologicamente como displásicos (50). Klein procurou características histopatológicas de displasia em 58 NM juncionais ou compostos, que não tinham evidências de displasia ao exame clínico, e encontrou uma característica histológica de atipia em 87,8%, duas em 69% e três em 29,3% dessas lesões (51). Um estudo com caucasianos norteamericanos encontrou nevos atípicos em 53% das pessoas, considerando apenas o critério histopatológico (52).

A importância clínica dos nevos atípicos surgiu após a descrição, por Clark (7), da sua presença em pacientes de seis famílias com história de melanoma familiar, dando origem à “Síndrome B-K”, que consiste na presença de 100 ou mais nevos melanocíticos, sendo que pelo menos um é maior ou igual a 8 mm de diâmetro e pelo menos um é considerado atípico; mas podem ocorrer de forma esporádica, não relacionada ao melanoma familiar. Existem divergências entre os critérios clínicos e histopatológicos para o diagnóstico do nevo atípico e mesmo sobre sua denominação (nevo atípico *versus* nevo displásico) (49).

### Outros Nevos Melanocíticos

Os principais tipos de NM foram descritos acima. Segue uma breve descrição dos principais aspectos dos subtipos menos freqüentes.

#### *Nevo de Spitz*

É uma variante do nevo composto visto mais comumente em crianças e que apresenta achados histopatológicos que tornam difícil sua diferenciação com o MC (53). Foi descrito por Spitz em 1948 como melanoma juvenil, sendo também

denominado nevo de células fusiformes ou células epitelióides (3;54;55). Surge na 1ª e 2ª décadas como um pequeno nódulo marrom ou avermelhado, mais comumente na face e nas pernas, que cresce rapidamente até 1 a 2 cm em um período de 3 a 6 meses, permanecendo após inalterado (3). Sua maior importância reside na dificuldade de diferenciação com o MC, e a ocorrência de metástases neste último é o padrão-ouro para o diagnóstico diferencial (56). O nevo de Reed corresponde a uma variante pigmentada do nevo de Spitz (3;57).

#### *Nevo Halo*

É também conhecido como nevo de Sutton. Ocorrem geralmente na infância e adolescência (58). Caracteriza-se pela formação de um halo de despigmentação no NM, que evolui para a absorção e regressão deste nevo central. Pode ser único ou múltiplo e há relatos de ocorrência familiar (58;59)

O mecanismo responsável pelo surgimento do halo é pouco conhecido. Há duas teorias sobre sua patogênese, alguns autores sugerem um fenômeno auto-imune contra alterações antigênicas decorrentes de alterações nas células névicas (displasia), enquanto outros sugerem que é um fenômeno auto-imune contra melanócitos névicos, inclusive com reação cruzada com melanócitos à distância, como ocorre no vitiligo. Em ambas teorias existem mecanismos imunológicos envolvidos (2;58;59).

#### *Nevo Azul*

Supõe-se que os nevos azuis sejam lesões constituídas por melanócitos dérmicos que falharam na migração da crista neural para a epiderme durante a vida fetal (60;61). Clinicamente são pápulas ou nódulos firmes, isolados, simétricos, com diâmetro entre 0,5 e 1 cm que, por efeito Tyndall, mostram coloração azulada. A face, as nádegas e o dorso das mãos e pés, são as áreas mais acometidas (62).

A existência de formas malignas, nevo azul maligno, é assunto controverso, sem consenso científico (63;64).

#### *Nevus spilus ou nevus salpicado*

Consiste de uma mancha marrom que mede entre 1 e 6 cm de diâmetro, com pequenas máculas ou pápulas salpicadas e mais escuras que a mancha maior. Podem ser congênitos ou adquiridos, surgindo em qualquer idade, geralmente na infância. Podem ocupar grandes áreas, quando são chamados zosteriformes ou segmentares (2). Existem vários relatos de evolução para MC nos nevus salpicados (65;66).

## **6.2. Melanoma**

É o tumor maligno que se desenvolve a partir dos melanócitos (3;4). Apesar de representar apenas 4% dos cânceres cutâneos é responsável por 80% das mortes causadas por neoplasia de pele e apenas 14% dos pacientes com doença metastática atingem sobrevida de cinco 5 anos (6).

Embora 95% dos casos ocorram na pele, o melanoma pode ocorrer em outros sítios, tais como retina, trato gastro-intestinal, genito-urinário, membranas meníngeas e linfonodos (melanoma de sítio primário desconhecido) (67).

Diferente de outros tumores sólidos, que afetam predominantemente idosos, o MC afeta pessoas jovens e de meia-idade. Aproximadamente metade dos casos ocorre entre 35 e 65 anos (68). Nos EUA é o câncer mais comum nas mulheres entre 25 – 29 anos e o segundo entre as mulheres entre 30 e 34 anos, nesse caso perdendo apenas para o câncer de mama (69).

O MC tornou-se um dos principais problemas em saúde pública em muitos países. A sua incidência aumentou muito nas populações caucasianas mundialmente, nas últimas décadas (70). Desde a década de 1960 sua incidência tem aumentado 3 a 6% ao ano na maioria dos países de ascendência europeia (70;71).

Evidências recentes sugerem que esse aumento na incidência do MC esteja relacionado com a mudança dos hábitos de vida - a exposição excessiva ao sol nas atividades de lazer, além do aumento da vigilância e do diagnóstico precoce desta neoplasia (72;73).

Nos EUA a incidência do melanoma aumentou em 270% entre os anos de 1973 e 2002 (68) e atualmente estima-se que o risco de uma pessoa desenvolver melanoma invasivo durante a vida seja de 1/63 e de 1/33, se considerarmos o melanoma *in situ*. No ano de 1935, essa chance era de 1/1500 (74;75). Nos homens brancos americanos, a incidência de 9,4 casos / 100.000 habitantes registrada em 1975, subiu para 32,3 casos /100.000 habitantes em 2005 (76).

A Austrália é o país com maior incidência mundial de MC (74); esta alcançou 59,9 casos / 100.000 habitantes em 2002 e diminuiu para 56,6 casos / 100.000 habitantes em 2004, com uma chance em quinze de vir a desenvolver a doença (77). A região de Queensland tem a maior incidência de MC em uma determinada área geográfica, sua população é predominantemente de origem europeia e o clima varia de subtropical a tropical. Entre os anos de 1982 e 2002 a incidência de MC em homens elevou-se de 5,3 para 49,9 por 100.000 nos melanomas *in situ* e de 46,9 para 82,1 por 100.000 nos melanomas invasivos (78). Devido aos grandes esforços dirigidos para prevenção primária e diagnóstico precoce, a incidência de melanomas *in situ* cresceu muito mais rápido do que a de melanomas invasivos nesse mesmo período, com um aumento anual, em homens, de 10,6% contra 2,6%, respectivamente (78).

No Brasil, a incidência do MC também está aumentando (79-81). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima em 5.920 o número de casos para o ano de 2008. A região sul é a que tem maior incidência e para o Rio Grande do Sul os indicadores são de 8,2 novos casos / 100.000 homens e 7,29 novos casos / 100.000 mulheres (79).

No exterior, alguns estudos mostram que a incidência do MC na faixa etária abaixo de 35 anos está estabilizando, ou mesmo diminuindo, ao mesmo tempo em que aumenta a incidência de melanomas finos (menores de 1 mm de espessura) (78;82;83).

A taxa de mortalidade por MC aumentou, mas não na mesma proporção da incidência, melhorando muito a taxa de sobrevivência global (84;85). Na década de

1960, a sobrevida após o diagnóstico de MC era de 60% e atualmente esse número alcançou 89%; essa é atribuída principalmente ao diagnóstico precoce (71;74;75;78). Entretanto, o MC tem mortalidade elevada nos jovens e pessoas de meia-idade. Estima-se que sejam potencialmente perdidos, em média, 18,6 anos de vida para cada óbito por MC nos EUA, uma das taxas mais altas para neoplasias de adultos (70;71;76)

A tabela abaixo, adaptada de Thompson *et al* (71), mostra as tendências nas taxas de incidência e mortalidade do melanoma em alguns países.

**Tabela 1.** Estatísticas do melanoma em 4 países, adaptada de Thompson *et al* (71)

	Incidência*	Mortalidade*	Risco de desenvolver	Tendência de incidência <sup>#</sup>	Tendência de letalidade <sup>#</sup>	Câncer mais comum
Austrália						
Homens	41,4	5,1	1/25	↑22%	↑2% <sup>&amp;</sup>	4°
Mulheres	31,1	2,6	1/35	↑12%	0% <sup>&amp;</sup>	3°
EUA						
Homens	21,4	3,9	1/53	↑31%	0% <sup>&amp;</sup>	5°
Mulheres	13,8	1,8	1/78	↑25%	↓1% <sup>&amp;</sup>	7°
Holanda						
Homens	11,5	3,1	-	↑21%	↑24% <sup>\$</sup>	-
Mulheres	14,8	2,1	-	↑11%	↑5% <sup>\$</sup>	-
Reino Unido						
Homens	9,7	2,7	1/147	↑59%	↑20% <sup>&amp;</sup>	12°
Mulheres	11,2	1,9	1/117	↑41%	↑3% <sup>&amp;</sup>	7°

\* casos/100.000/ano

<sup>#</sup> em 10 anos

<sup>&</sup> 1991 - 2001

<sup>\$</sup> 1989 - 1998

O MC é classificado em 4 subtipos maiores: melanoma de espalhamento superficial (MES), lentigo maligno / lentigo maligno melanoma (LM/LMM), melanoma nodular (MN) e melanoma lentiginoso acral (MLA) (3;4). Essa divisão foi idealizada por Clark e modificada por Reed (3) e é útil para melhor avaliarmos a epidemia do MC.



Nos EUA os dados do Instituto Nacional de Saúde (Surveillance Epidemiology and End Results / National Cancer Institute - SEER / NCI) mostram que as populações de pele branca têm um risco dez vezes maior de desenvolver MC que os negros, asiáticos e hispânicos (76).

Uma minoria dos pacientes tem MLA, que ocorre predominante nas palmas e plantas. É a forma mais comum em não-brancos, mas sua frequência é semelhante entre os diversos grupos étnicos, em todas as latitudes e não se alterou durante as últimas décadas (86-88). Um estudo interessante realizado no México compara a incidência de MC em serviços de saúde pública e privados. Nos primeiros a maioria da população atendida é descendente de nativos americanos e predomina o tipo MLA. Nos serviços privados de saúde a população atendida é de descendência européia e o tipo predominante é o MES (89).

Forman e colaboradores encontraram, em militares brancos no Texas (EUA), uma maior frequência de LMM, com 56% dos casos (90), entretanto o estudo não correlacionou a frequência com a idade dos pacientes. Sabe-se que o LMM tem pico de incidência mais tardio, em pessoas de pele clara e com grande exposição solar ocupacional (91).

Verifica-se, portanto, que na epidemia do MC mais de 90% dos casos ocorrem em sítios não-acrais, são principalmente do tipo MES e estão relacionados à exposição à RUV (87).

Os fatores de risco para o desenvolvimento do MC podem ser ambientais e individuais. As evidências científicas apontam, de forma contundente, a exposição à RUV como o principal fator ambiental para o desenvolvimento do MC (67;92-94).

Comparando populações de mesmo fenótipo na Austrália e na Escócia, a diferença na incidência do MC demonstra claramente a importância da exposição à luz do sol, principalmente na infância, na gênese do MC (41;82;95). Em nosso meio, Bakos e colaboradores observaram, em um estudo de casos e controles que, nos pacientes com MC, as queimaduras solares foram o principal fator de risco no desenvolvimento da doença, com uma razão de chances de 11,4 (IC 95% 2,6 – 50,5) (96).

Uma meta-análise realizada através de pesquisas no MEDLINE por Gandini e colaboradores (97) identificou 438 artigos relacionando a exposição solar com o risco do desenvolvimento do MC, dos quais 57 preenchiam os critérios de inclusão, sendo 52 estudos de casos e controles e 5 coortes, perfazendo 38.671 casos de MC em 22 países, inclusive com dados brasileiros publicados por Bakos *et al* (96). As conclusões mostram que a exposição solar intermitente tem um risco relativo (RR) de 1,61, favorecendo a relação desta com o surgimento do MC. As queimaduras solares representam o maior fator de risco, com RR = 2,03 e o dado mais interessante é que essas ocorrem em locais de maior latitude, e não junto à Linha do Equador. Talvez isso seja explicado pelo fato de que pessoas de pele mais clara vivam em latitudes mais altas, ou talvez as altas latitudes apresentem uma variação sazonal que propicia a exposição solar intermitente. Nesse estudo, a exposição solar ocupacional refere-se a um padrão de baixa exposição por tempo continuado e apresentou uma pequena relação inversa com o desenvolvimento do MC (97).

Entre os fatores de risco individuais estão: pele clara, olhos claros e cabelos ruivos ou louros, pessoas que facilmente sofrem queimaduras solares e não

bronzear, uma quantidade de NM maior que 50, a presença de nevos atípicos e a história familiar de melanoma (14;39;71;98;99).

### **6.3. Radiação ultravioleta**

A exposição ao sol é o único fator causal exógeno reconhecido e a principal causa da epidemia do MC nas populações brancas em todo o mundo (97). Esse fato levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a reconhecer a RUV como agente carcinogênico (100;101). A RUV do sol promove malignização na pele por ter efeito mutagênico direto sobre o DNA, por estimular constituintes da pele a produzirem fatores de crescimento, por reduzir as defesas imunológicas cutâneas e por produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam dano ao DNA e suprimem a apoptose (71).

A principal fonte de RUV que interage com o ser humano é o sol. A RUV faz parte do espectro eletromagnético, na faixa de onda entre 200 e 400 nm. É classificada de acordo com seu comprimento de onda em: UVA1 (faixa entre 340 e 400 nm), UVA2 (entre 320 e 340 nm), UVB (entre 290 e 320 nm) e UVC (entre 200 e 290 nm). Quanto menor o comprimento de onda, menor a penetração na atmosfera, assim toda a radiação abaixo de 290 nm e grande parte da radiação UVB é barrada pela camada de ozônio e oxigênio. Mais de 95% da RUV que chega à superfície terrestre é da faixa de UVA e varia muito pouco durante o dia. A radiação UVB (RUVB) só alcança a superfície terrestre no eixo perpendicular de incidência, que compreende o horário do meio-dia (102). Por esse motivo, a RUVB também é maior no verão, nas baixas latitudes e nas grandes altitudes. Para cada 1.000 m acima do

nível do mar, a dose de RUV aumenta em torno de 10 a 12%. É importante lembrar que a neve pode refletir até 80% da RUV, enquanto a areia da praia reflete 15% e a espuma do mar em torno de 25% desta radiação (103).

É provável que a redução na camada de ozônio possa agravar os problemas de saúde relacionados com exposição à RUV, pois o ozônio funciona como um eficiente filtro ambiental. Conseqüentemente, os seres humanos e o ambiente estão sendo expostos a níveis maiores de radiação, principalmente UVB. Cálculos matemáticos estimam que uma redução de 10% no ozônio estratosférico pode causar um acréscimo de 300.000 novos casos de cânceres cutâneos não melanoma (CCNM), de 4.500 novos casos de MC e de quase 2.000.000 de novos casos de catarata a cada ano em todo o mundo (103).

As radiações UVA e UVB diferem nos seus efeitos biológicos e na penetração nas camadas da pele. Para produzir uma resposta cutânea, os fótons devem penetrar através das camadas da pele, ser absorvidos por biomoléculas e iniciar uma série de reações biológicas (104).

A RUVA tem comprimento maior, portanto maior penetração, alcançando o derma. O dano causado pelos raios UVA ocorre pela formação de ROS, que podem causar quebras na fita de DNA (ácido desoxirribonucléico) e danos na formação de proteínas e nas membranas celulares (104;105).

A RUVB, com menor comprimento de onda, carrega mais energia e é mais mutagênica que a radiação UVA (RUVA). Os raios UVB são absorvidos diretamente pelo DNA, produzindo os dímeros de pirimidina ciclobutano, que são trocas de aminoácidos C para T ou CC para TT, considerada a “assinatura” do dano causado

pela RUV (106). Quando essas mutações afetam a função de oncogenes, genes supressores tumorais e controladores do ciclo celular ocorre a transformação neoplásica de queratinócitos e melanócitos (104).

A exposição à RUV afeta a sobrevivência e a proliferação das células epidérmicas e dérmicas e altera várias funções cutâneas. Em geral os efeitos da RUV são maléficos, sendo as exceções o estímulo para a síntese da vitamina D, hormônio essencial ao crescimento e desenvolvimento ósseo (105;107) e o tratamento de algumas doenças dermatológicas, sendo a psoríase vulgar o melhor exemplo disso (108).

A exposição a uma dose significativa de RUV leva a uma reação inflamatória caracterizada por eritema, edema, e/ou formação de bolhas, ou seja, à queimadura. O eritema é causado pela vasodilatação superficial e seu pico ocorre entre 8 e 24 horas após a exposição (109).

Os efeitos agudos da RUV sobre a pele são na maioria adversos e incluem dano ao DNA, com surgimento de queratinócitos apoptóticos conhecidos como “sunburn cells”, eritema, supressão da resposta imune, que é evidenciada pela redução no número das células de Langerhans (110) e aumento da pigmentação (105).

Os efeitos a longo prazo da RUV sobre a pele incluem o fotoenvelhecimento e o desenvolvimento de neoplasias de pele. O fotoenvelhecimento é caracterizado clinicamente por ressecamento cutâneo, pigmentação irregular, formação de rugas e telangiectasias. Histologicamente apresenta elastose solar, causada pela degradação do colágeno, e acúmulo de elastina anormal na derme (105).

As células podem responder a agressão com o reparo do DNA para evitar mutações perigosas ou, se o dano for irreparável, induzindo apoptose para remover células potencialmente cancerosas. A insuficiência destes meios leva ao desenvolvimento tumoral, por meio da inativação dos genes supressores tumorais ou da ativação de oncogenes. A vigilância imunológica tem um papel muito importante na proteção contra o desenvolvimento dos cânceres cutâneos. Entretanto, a exposição à RUV suprime a função do sistema imune na pele, criando um ambiente ainda mais favorável ao desenvolvimento e crescimento dos tumores (111).

A pele desenvolveu dois mecanismos principais de defesa contra os danos da RUV: o espessamento epidérmico com paraceratose e o estímulo à produção de melanina pelos melanócitos. Destes, o mais efetivo é a produção de melanina, com a formação do bronzeado, que pode ser imediato por foto-oxidação da melanina pré-existente por ação da RUVA, ou tardio, após 2 a 3 dias, com estímulo à melanogênese tanto pela exposição à UVA e à UVB (105).

A melanina forma uma barreira física que dispersa a RUV incidente e também filtra sua penetração na epiderme. Sua distribuição, ao redor dos núcleos dos melanócitos e queratinócitos, protege o DNA dos raios UV, além de neutralizar os ROS (105). Existem dois tipos principais de melanina: a eumelanina, de coloração marrom-enegrecida, e a feomelanina, de coloração amarelo-avermelhada. A primeira fornece muito mais proteção contra o dano causado pela RUV e é encontrada em muito maior quantidade nas pessoas de fototipo elevado, enquanto as pessoas de pele clara possuem mais feomelanina, que é foto-lábil e potencialmente fototóxica. A

variação na tonalidade de pele dos seres humanos depende da proporção destes subtipos de melanina (105).

Pode-se exemplificar a capacidade de proteção exercida pela melanina: para produzir uma mesma resposta à RUV no fluxo sanguíneo, comparado a um indivíduo caucasiano de pele clara, uma pessoa de fototipo VI necessita um aumento de 100 vezes na dose de RUV (109).

#### **6.4. Trauma Mecânico**

Ao contrário da RUV, que tem sido exaustivamente estudada em sua relação com o MC, pouco se sabe sobre o papel do trauma mecânico na gênese do MC. Entretanto, as especulações sobre a sua relevância são antigas, anteriores à epidemia do MC. Gaskill, em 1913, descreveu um paciente com melanoma acral que relatava traumatismo diário em um NM pré-existente no pé, causado pela bota (112).

Kaskel e colaboradores aplicaram um questionário a todos os pacientes com diagnóstico de MC, interrogando sobre a possível relação deste com algum trauma prévio. Dos 369 pacientes inquiridos, apenas 32 pacientes consideraram a associação entre trauma e o desenvolvimento do MC possível, sendo que destes, 22 relataram um evento único e 10 uma irritação persistente. Não foi investigada a presença de lesão melanocítica benigna prévia no sítio do trauma (15).

Uma ampla revisão da literatura, abrangendo o período entre 1923 e 2004, sobre cicatrizes de queimaduras e desenvolvimento de neoplasias, encontrou 412 neoplasias relatadas em 146 artigos. Destas neoplasias, 71% eram carcinomas epidermóides, 23% eram carcinomas basocelulares e apenas 6% eram MC (113).

Uma recente investigação sueca, de base populacional, avaliou todos os casos de internação hospitalar por queimadura entre os anos 1964 e 1996 e correlacionou com as notificações de neoplasias entre os anos 1964 e 2003. Foram encontrados 37.095 pacientes que sofreram queimaduras e, dentre estes, 2.227 desenvolveram neoplasias de pele (carcinomas basocelulares não foram incluídos por não serem notificados), sendo 68 casos de MC. Esse número representa uma incidência menor que o esperado para uma população semelhante naquele país, sendo a conclusão do estudo que cicatrizes de queimaduras não aumentam o risco para desenvolvimento do MC (114).

Para investigar especificamente a influência do trauma no prognóstico do MC localizado no aparelho ungueal, Bormann e colaboradores revisaram 33 casos de melanomas do aparelho ungueal, dentre os 3.221 casos de MC atendidos entre os anos 1993 e 2003. Destes, apenas 3 relataram trauma prévio ao surgimento do tumor, o que não permitiu considerações sobre trauma como fator etiológico. O estudo concluiu que o trauma foi o fator mais fortemente associado a um pior prognóstico. A explicação seria o aumento de fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), entre outras citocinas, liberadas na tentativa de promover a cicatrização e que contribuiriam para o desenvolvimento do tumor (115).

Já foi relatada a ocorrência de MC em NMC gigantes previamente submetidos a tratamentos por laser (116) ou dermoabrasão (117). Não se pode estabelecer uma relação causal direta entre o procedimento e a neoplasia, pois NMC gigantes por si só podem predispor ao desenvolvimento do melanoma. Entretanto, os autores



desses relatos sugerem cuidado redobrado nos NMC submetidos a laser, pois não se sabe o potencial mutagênico, a longo prazo, do laser nos melanócitos residuais (116).

Existem também registros de MC em área de tatuagem. Paradisi e colaboradores (118), relatam o caso de um homem com uma tatuagem feita na região escapular, sobre um NM pré-existente, onde desenvolveu-se um MC após 10 anos. Kluger e colaboradores (119), relatam dois casos de neoplasia cutânea surgindo sobre tatuagem: um carcinoma basocelular e um MC, este último em um fazendeiro branco aos 70 anos, em área com fotodano acentuado, sobre lesão melanocítica que havia sido tatuada 40 anos antes. Há também relato de MC surgido nas tatuagens que demarcam áreas de radioterapia, sem lesão melanocítica prévia; entretanto, aqui há fatores de confusão representados pela radioterapia e pela existência de outra neoplasia prévia (120). Devido a sua incidência extremamente baixa, o desenvolvimento do MC em tatuagens é provavelmente um achado coincidente (121).

### **6.5. Nevos e melanoma**

A discussão sobre o nevo atípico como possível precursor do MC iniciou em 1978 com a descrição de uma síndrome que compreendia “lesões pigmentadas com características clínicas e histológicas distintas” (122), em 7 famílias com predisposição ao melanoma. Neste mesmo ano, outra publicação (123) descreveu o melanoma familiar num contexto de múltiplos nevos grandes e de coloração variada (14).

Posteriormente, Clark elaborou um modelo para o desenvolvimento do MC que enfatiza a transformação passo a passo do melanócito em melanoma. O modelo representa a proliferação dos melanócitos com a formação dos NM e o subsequente desenvolvimento de displasia, hiperplasia, invasão e metástases (6;124). A relação entre os principais tipos de NM com o MC será descrita a seguir.

#### Nevos melanocíticos congênitos:

Existe consenso sobre os nevos melanocíticos congênitos (NMC) gigantes apresentarem maior risco para o desenvolvimento do MC; no entanto, a relação entre os NMC pequenos e intermediários e o MC permanece controversa (31-33). Swerdlow e colaboradores (125) encontraram um risco aumentado para MC nos NMC maiores que 5% da área corporal.

Um estudo recente comparando a expressão IHQ das proteínas Ki-67, Rb, p16, ciclina D1, p53 e p21/Waf-1 em 41 NMC (12 eram gigantes), 16 melanomas e 20 NMA não encontrou características de malignidade nos NMC, incluídos na avaliação os nódulos proliferativos dos NMC gigantes, indicando o comportamento benigno dessas lesões (126). Um estudo semelhante concluiu que os nódulos proliferativos dos NMC e os próprios NMC conjugam mais similaridades do que diferenças e ambos diferem, em distintos aspectos, dos MC (127).

Uma revisão sistemática sobre NMC calculou em 0,7% o risco para o desenvolvimento de MC nos NMC em geral e que a idade média de diagnóstico de melanoma cutâneo nos portadores de NMC é 15,5 anos, com uma mediana de 7

anos, confirmando o risco máximo de desenvolvimento dessa neoplasia na infância e adolescência (33).

#### Nevos melanocíticos adquiridos

Durante as décadas de 1980 a 1990, foram realizados vários estudos descrevendo os aspectos epidemiológicos dos NM e a relação destes com o MC. Inicialmente, buscou-se estimar a quantidade de NM que representasse um fator de risco aumentado para o desenvolvimento do MC (9-13;128). Um dos primeiros relatos foi publicado por Swerdlow e colaboradores (13), que comparou 180 pacientes com MC com 197 controles, e concluiu que portadores de mais de 50 NM pequenos e sem atipias tinham um risco para desenvolver MC 12 vezes maior que os que não apresentavam nenhum NM. Esse estudo analisou separadamente a presença de lesões grandes (com mais de 7 mm de diâmetro), lesões com variação de cores e lesões com bordas irregulares. A presença de 1 a 4 nevos grandes conferiu um risco aumentado em 5,2 vezes; com mais de 5 nevos grandes o risco subiu para 5,7 vezes; nos nevos de coloração variada o risco aumentou 30 vezes e nos nevos com bordas irregulares o cálculo demonstrou um aumento de risco de 70 vezes.

Um estudo multicêntrico analisou 513 pacientes com MM e 498 controles, e calculou um risco aumentado em 7,6 vezes para portadores de mais de 100 NM, em relação aos com menos de 10 lesões, e também reconheceu como fator de risco independente para o desenvolvimento do MC a presença de mais de 5 NM atípicos (129). Realizado pelo Centro de Registro do Melanoma Maligno da Sociedade Alemã

de Dermatologia em 1994, esse estudo afirmou de forma incisiva que o número total de NM é o fator de risco individual mais importante para o desenvolvimento do MC postulado esse repetido e confirmado pela literatura médica até os dias de hoje.

A maior correlação entre o número de NM e o risco para desenvolvimento do MC foi atribuída ao MES, e em ambos MC e NM, a exposição solar na infância é o fator ambiental predisponente mais importante (14).

Em 2001, Kanzler e Mraz-Gernhard (8), sugeriram que o número de 50 NM seria o ponto de corte que indicaria um risco aumentado para o desenvolvimento de MC, pois 80% de todos os pacientes com MC apresentam contagem igual ou superior a essa. Mais recentemente, foi realizada uma meta-análise, que apontou número menor de NM e nevos atípicos com o fator de risco para o MC (130). Para melhor compreensão seguem duas tabelas, adaptadas desta revisão, com os cálculos do RR para o desenvolvimento do MC a partir de NMA comuns (tabela 2) e a partir de NMA atípicos (tabela 3) (130):

Tabela 2. RR para MC a partir do nº de NM comuns, adaptada de Gandini *et al* (130):

Nº de nevos	RR (IC 95%)
0 – 15	1,00
16 – 40	1,47 (1,36 – 1,59)
41 – 60	2,24 (1,90 – 2,64)
61 – 80	3,26 (2,55 – 4,15)
81 – 100	4,74 (3,44 – 6,53)
101 - 120	6,89 (4,63 – 10,25)

RR: risco relativo

IC: intervalo de confiança

Tabela 3. RR para MC a partir do n° de NM atípicos, adaptada de Gandini *et al* (130):

N° de nevos	RR (IC 95%)
0	1,00
1	1,45 (1,31 – 1,60)
2	2,10 (1,71 – 2,54)
3	3,03 (2,23 – 4,06)
4	4,39 (2,91 – 6,47)
5	6,36 (3,80 – 10,33)

RR: risco relativo

IC: intervalo de confiança

Entretanto, os NM não podem ser considerados somente marcadores de risco para o desenvolvimento do MC. Em uma considerável proporção de casos eles são um dos passos para o desenvolvimento do MC (14). Uma evidência dessa associação é o relato dos pacientes sobre a existência de uma lesão prévia ao surgimento do MC. Um estudo prospectivo recente, com duração de 5 anos, analisou 377 casos de MC e com base na história clínica, encontrou associação do MC com NM pré-existente em 42% dos casos, 34% de MC *de novo*, e 24% não sabiam relatar. Os MC associados a NM eram mais comuns no tronco e em pessoas mais jovens (131).

Uma das evidências mais fortes de que os NM são lesões precursoras do MC é a presença de remanescentes histológicos dos NM benignos em um grupo de 20 a 60% dos MC (14).

Skender-Kalnenas e colaboradores (132) revisaram 289 casos de MC, com espessura máxima de 1,0 mm, para identificar a proporção dos casos em que havia associação com lesões melanocíticas benignas, incluindo proliferação melanocítica lentiginosa. Foram encontrados NM em associação com MC (NM+) em 51% dos

casos; destes nevos, 56% eram displásicos, 41% eram NMA, e 4% eram NMC. Outro dado interessante desse estudo foi que a associação do MC com o NM diminui com o avançar da idade, ou seja, quanto mais velho o indivíduo, menor a chance de encontrar lesão melanocítica benigna associada. A área corporal com maior associação foi o tronco e a menor foi cabeça e pescoço; o subtipo mais identificado em associação foi o MES, com 54% dos casos, e o menor foi o LMM com 12%. Isso sugere que os MC que ocorrem em jovens são mais comumente NM+, enquanto tumores em idosos mais comumente se originam de proliferações melanocíticas lentiginosas

A associação entre NM e MC encontrada por Carli e colaboradores (133) ocorreu predominantemente nos MC distribuídos no tronco e membros, nenhum MC encontrado na cabeça ou pescoço era NM+. Achados fenotípicos, como pele clara e cabelos ruivos, estavam mais relacionados aos MC não associados a NM (NM-) (OR 7,4 - IC95% 2,1 – 25,8), enquanto a história de 5 ou mais queimaduras solares estava mais relacionada com o MC NM+ (OR 6,7 - IC95% 1,3 – 33,7) (133). Após esses resultados, os autores sugerem que pessoas com muitos NM têm maior risco para desenvolver MC a partir de NM do que desenvolver MC *de novo*.

Uma revisão histológica de 1606 casos de MC encontrou lesões melanocíticas benignas associadas aos MC em 26% dos casos e, destes, 43% eram NM atípicos. Os pacientes com essa associação eram mais jovens, o subtipo histológico mais encontrado foi o MES e a localização mais comum foi o tronco (134).

Um estudo realizado por Whiteman e colaboradores gerou uma hipótese sobre exposição solar e NM, baseada em “diferentes caminhos” para ocorrência de MC nas diferentes partes do corpo. Os MC da cabeça e pescoço ocorrem principalmente em pessoas com poucos NM, muitas ceratoses solares e com altos níveis de exposição solar ocupacional. Em contraste, MC que surgem no tronco tendem a afetar pessoas com muitos NM, poucas ceratoses solares e baixos níveis de exposição solar ocupacional. Os autores sugerem que, após a iniciação pela RUV do sol, os melanócitos dos indivíduos com tendência à formação de NM são induzidos a proliferar e tornam-se neoplásicos com pouca ou nenhuma exposição solar adicional. Nas pessoas com baixa tendência à formação de NM é necessária a exposição solar continuada para o desenvolvimento do MC, além da exigida para a iniciação. Nessas pessoas, o MC tende a ocorrer em áreas fotoexpostas e está associado à exposição solar crônica (135).

Essa hipótese foi apoiada por outros estudos. Cho e colaboradores (44) concluíram que a presença de 10 ou mais NM está fortemente associada com o melanoma no tronco. Purdue e colaboradores (136), num estudo multicêntrico em quatro países, relatou que MC NM+ ocorrem em pessoas mais jovens, com maior quantidade de NM principalmente no tronco, são mais finos e predominantemente do tipo MES. Nesses pacientes os indicadores de exposição solar acumulada foram significativamente menores que nos pacientes com MC NM-. Utilizando técnica de IHQ, Winnepeninckx e Oord (137) encontraram perda da expressão da p16 em 85% (11/13) dos MC de áreas fotoexpostas NM-, contra 24% (6/25) dos MC de áreas não fotoexpostas NM+, apoiando a hipótese da existência de mais de um

mecanismo para o desenvolvimento do MC. Foi publicado em 2008 um estudo populacional, baseado no serviço de vigilância epidemiológica dos EUA (SEER – NCI), analisando todos os 48.673 casos de MC durante os anos 2000 a 2004. Os dados confirmam que o MC no tronco ocorre precocemente, com pico de incidência em torno dos 50 anos e depois diminui, enquanto no melanoma de cabeça e pescoço a incidência aumenta progressivamente, com um pico tardio na oitava década (91).

Em resumo, os MC situados na cabeça e pescoço estariam relacionados à exposição contínua à RUV solar e ocorreriam tardiamente na vida, enquanto os situados no tronco estariam relacionados a queimaduras solares principalmente na infância, bem como a presença de um maior número de NM e ocorreriam numa faixa etária mais jovem.

#### Estudos experimentais com Nevos Melanocíticos

Os estudos que analisam a relação dos NM com o MC são observacionais na quase totalidade, havendo poucos estudos experimentais com NM *in vivo*.

Tronnier e colaboradores centraram suas pesquisas nesse tipo de experimento. Em seu primeiro ensaio eles selecionaram 12 NM maiores do que 5 mm de diâmetro, sem sinais clínicos de atipias, e foi determinada a dose eritematosa mínima (DEM) em cada portador. Os NM tiveram metade da superfície coberta com fita foto-opaca e a outra metade foi exposta a duas DEM. Após uma semana as lesões foram excisadas para comparação histopatológica entre as duas metades e foi constatado que no lado irradiado havia alterações morfológicas que os



assemelhavam a nevos atípicos e, em três lesões, ao melanoma *in situ*. Destas alterações, a mais importante foi a presença de melanócitos acima da junção dermo-epidérmica, encontrando-se também camada córnea espessada com paraceratose. Além disso, houve aumento na expressão de HMB-45 em todos os NM, demonstrando a ativação dos melanócitos e a formação ativa de melanosomas no lado irradiado (18).

Usando essa mesma metodologia, eles também examinaram 13 NM que foram excisados seqüencialmente em 1, 2 ou 3 semanas após o experimento. Os achados histológicos da primeira semana coincidiram com os do estudo anterior, mas estavam ausentes na segunda e terceira semanas, demonstrando o caráter transitório dessas alterações (19).

Em um trabalho posterior, essa mesma equipe utilizou um painel IHQ para comparar NM submetidos a uma única irradiação de 2 ou 4 DEM, com NM de pacientes com psoríase submetidos à fototerapia, com doses suberitematosas, por 4 a 6 semanas. Como nos demais estudos, todos os nevos tiveram metade de sua superfície foto-protegida e, após uma semana, foram excisados para comparação entre os experimentos. As maiores alterações morfológicas foram encontradas nos NM submetidos à irradiação única de 4 DEM, mostrando o efeito dose-dependente; e as maiores alterações à IHQ foram encontradas nos NM submetidos à irradiação única, independente do número de DEM. Estes dados demonstram a importância da queimadura solar e da exposição solar intermitente no desenvolvimento das lesões melanocíticas benignas e do MC (20).

Estes trabalhos estimularam várias pesquisas em nossa instituição. Inicialmente, Mariante estudou as alterações clínicas, dermatoscópicas, histopatológicas e IHQ de NM submetidos à RUVB, e concluiu que esta provoca alterações sob todos os aspectos estudados, sendo que em alguns NM os achados são semelhantes aos encontrados nos lentigos malignos e no melanoma *in situ* (138). Posteriormente foi estudada a expressão IHQ das metaloproteinases -2 e -9 (MMP-2 e MMP-9) nos NM submetidos à RUVB (139). Essas gelatinases parecem estar envolvidas no processo de invasão tumoral, na formação de metástases e na neoangiogênese nos melanomas e o estudo mostrou o aumento da expressão da MMP-2 nos queratinócitos, melanócitos, células endoteliais e fibroblastos no lado irradiado, ocorrendo padrão semelhante com a MMP-9, com exceção dos queratinócitos.

Está em andamento, em nossa instituição, um estudo para avaliar as alterações dermatoscópicas, histopatológicas e imunoistoquímicas que ocorrem nos NM após trauma físico superficial provocado por dermoabrasão.

## **6.6. Gene CDKN2A e a proteína p16**

### Histórico

Após a descrição, por Lynch (123) e Clark (7), de pessoas que apresentavam múltiplos nevos melanocíticos comuns e atípicos, agrupadas em famílias com suscetibilidade genética para o desenvolvimento de melanomas cutâneos, vários grupos dedicaram-se ao estudo do genoma de famílias com o mesmo fenótipo,

buscando localizar os genes, ou um gene principal implicado na gênese do MC (140;141).

O primeiro estudo identificando esse gene foi realizado por Cannon-Albright e colaboradores (21), pesquisando 11 famílias com 82 casos de MC, com idade entre 12 e 93 anos, caucasianos, moradores dos Estados de Utah e do Texas (EUA), mas com ancestralidade do norte da Europa. Foram encontrados deleções e rearranjos no cromossomo 9p21 (Fig. 1) em 46% dos melanomas e constatou-se que os portadores dessas mutações apresentaram contagem e densidade de NM maiores do que os não-portadores (21;141). Outros estudos com melanoma familiar realizados em diversos países por grupos independentes, no início da década de 1990, encontraram alterações no mesmo *locus*, confirmando esse achado (22-25).

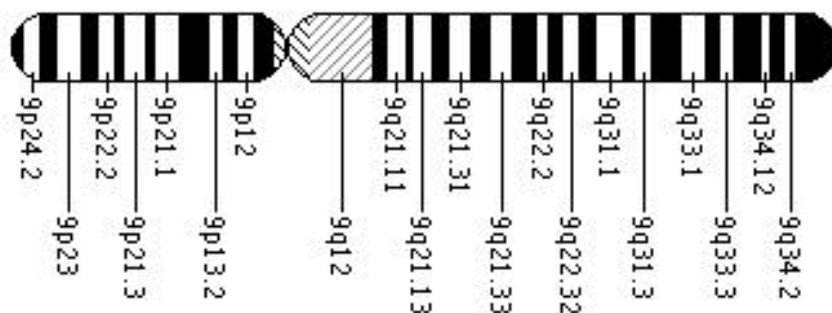


Fig. 1: Representação esquemática do cromossomo 9, de acordo com a Biblioteca Nacional de Medicina dos EUA (142)

Alterações nesse gene, não relacionadas ao melanoma familiar, também foram encontradas em outros cânceres, tais como gliomas, astrocitomas, leucemias, e outros (143;144). O único tumor relacionado ao melanoma familiar e à presença de múltiplos NM e nevos atípicos foi o carcinoma de pâncreas (145;146).

## Sinonímia

Foram utilizadas várias denominações para descrever o gene encontrado no braço curto do cromossomo 9, tais como MTS1 (multiple tumor supressor 1), INK4a (inhibitor of kinase 4a), mas a denominação mais aceita atualmente é CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A). A primeira proteína codificada por esse gene também recebe diferentes denominações, tais como p16<sup>INK4a</sup>, INK4a. A mais utilizada é p16 (proteína com massa de 16kd) (141).

## Estrutura

Um achado incomum do *locus* CDKN2A, virtualmente sem precedentes nos genomas dos mamíferos, é que este codifica não apenas um, mas dois genes, cada um transcrevendo em um *frame* diferente de leitura, codificando duas diferentes proteínas, a p16 e a p14 - mais conhecida como ARF (alternative reading frame). A p16 é uma proteína com 156 aminoácidos produzida a partir dos exons E1 $\alpha$ , E2 e E3, compreendendo *frames* de leitura abertos de 150, 307 e 11 pares de base. A ARF utiliza os mesmos exons E2 e E3, mas em um diferente *frame* de leitura, e a transcriptase inicia no exon E1 $\beta$ , localizado próximo ao exon E1 $\alpha$ . A seqüência resultante tem 132 aminoácidos e não tem homologia com qualquer outra proteína conhecida. Os *exons* 2 e 3 são utilizados para a transcrição tanto da p16 quanto da ARF, em diferentes *frames* de leitura. O p16 inicia no *exon* 1 $\alpha$  e a ARF no 1 $\beta$ . A ilustração a seguir (figura 2), extraída de Piepkorn (141), demonstra a estrutura supracitada.

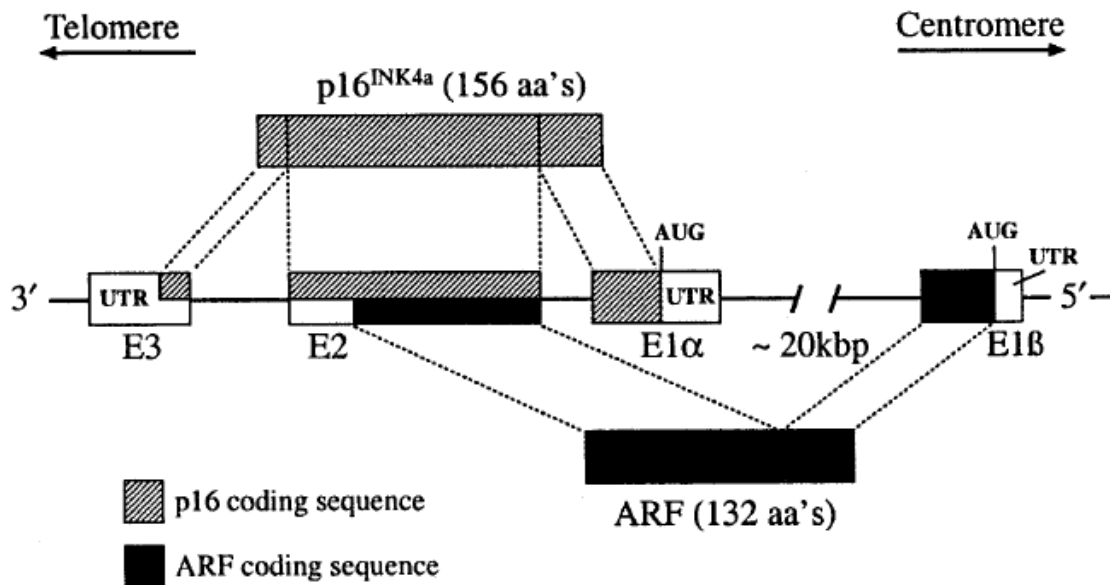


Figura 2: *Locus* CDKN2A: codificação da p16 e ARF.

No cromossomo 9p21 está localizado, além do p16 / ARF, o gene CDKN2B, também conhecido como MTS 2 (fig 3), que codifica a proteína p15, a partir de dois exons localizados a aproximadamente 20 kb do *exon* 1α do CDKN2A, em direção ao centrômero. Os 3 exons do p16 e os 2 exons do p15 estão separados por aproximadamente 20 – 30 kpb. Eles traduzem proteínas de 16 e 15 kd, respectivamente. Apesar de exercer efeito negativo sobre a proliferação celular, não existem evidências do seu envolvimento no melanoma (141;147).

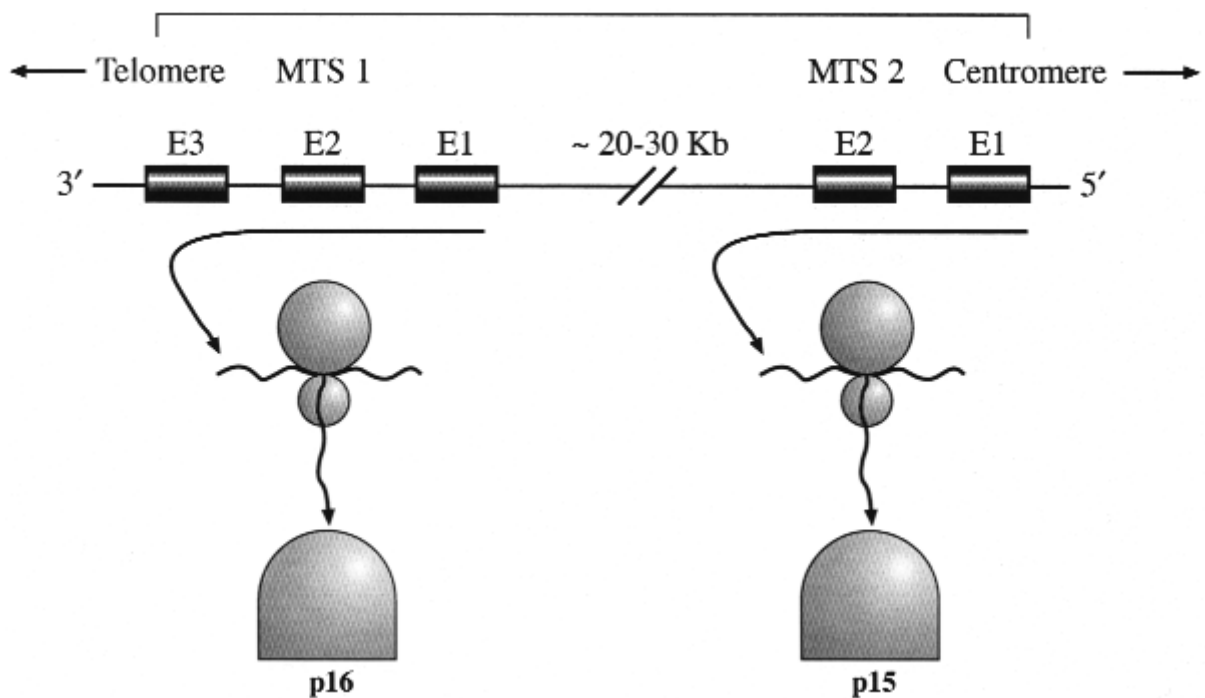


Figura 3: Localização dos genes p16 e p15 no braço curto do cromossomo 9 (141)

#### Ação das proteínas codificadas no *locus* CDKN2A

As proteínas codificadas fazem parte do mecanismo de controle do ciclo celular. As células multiplicam-se por meio de um ciclo celular muito bem regulado, que consiste de 4 fases: G1 = pré-síntese, S = síntese do DNA, G2 = pré-mitose e M = mitose. A progressão do ciclo é controlada por um sistema de ciclinas: cinases ciclina-dependentes (cyclin dependent kinases, CDK) e inibidoras de cinases ciclina-dependentes (cyclin dependent kinase inhibitors, CDKI) (29).

Nas células normais a proliferação celular ocorre quando uma CDK se liga a sua ciclina. Na transição G1 – S a progressão do ciclo é mediada pelos pares ciclina E com a CDK2 (ciclinaE/CDK2) e ciclina D com CDK4 (ciclinaD/CDK4), estes pares promovem a fosforilação e inativação da proteína do retinoblastoma (Rb), que é o controlador deste ponto de transição, permitindo a passagem para a fase S, em que

acontece a síntese do DNA. O mecanismo do Rb é o ponto crítico na progressão do ciclo celular e está corrompido em todos os cânceres humanos (148).

As duas proteínas produzidas pelo CDKN2A - p16 e ARF, têm efeito negativo na proliferação celular, impedindo a progressão da fase G1 para a fase S (149), e os genes que as produzem são considerados genes supressores tumorais (150).

A duração do ciclo celular depende principalmente da fase G1, que está sujeita ao controle dos proto-oncogenes e dos anti-oncogenes, estes representados pelos mecanismos do Rb e do p53. A disfunção das proteínas reguladoras do ciclo celular é um elemento fundamental na iniciação e progressão das neoplasias, e alguns autores vêem a doença neoplásica como uma doença decorrente do distúrbio do ciclo celular (151).

A p16 age como inibidora da CDK4, que quando ativada fosforila o Rb, impedindo que este iniba a progressão do ciclo celular, enquanto a ARF inibe a ligação da proteína MDM2 com o p53, impedindo a destruição deste. A ilustração a seguir (figura 4), extraída de High (150), representa o ciclo celular e os pontos de ação dessas proteínas.

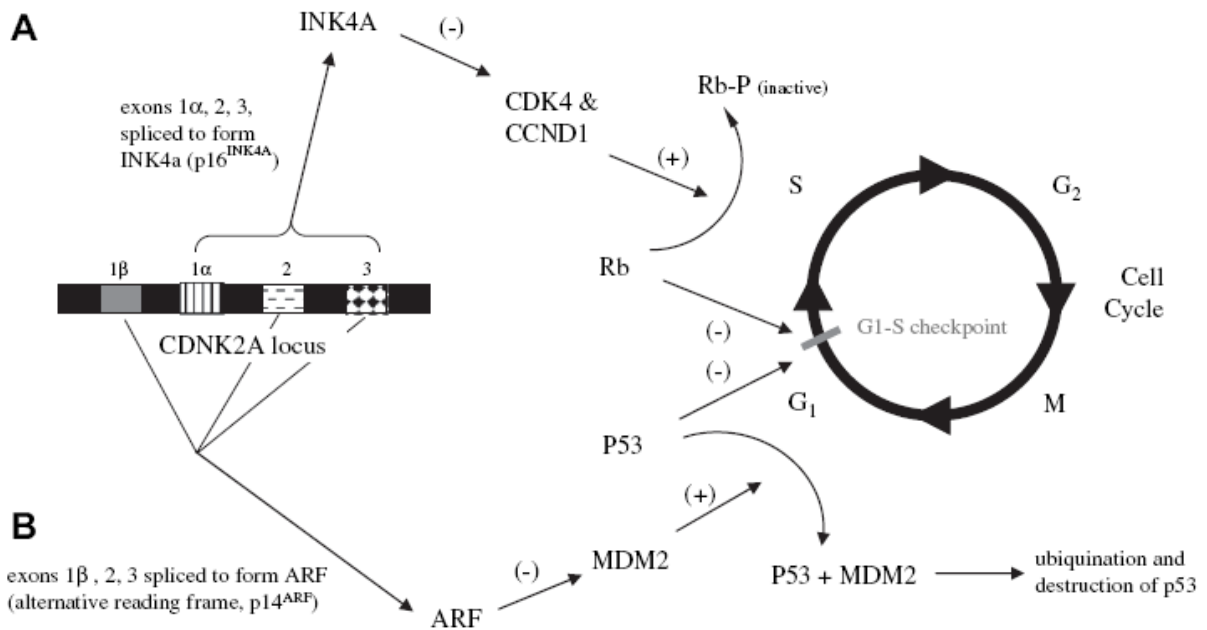


Figura 4: As mutações do p16 (INK4A) e do ARF afetam os mecanismos do Rb e do p53 no ciclo celular, segundo High (150).

+ → ativação

- → inibição

Em resumo, o CDKN2A codifica 2 proteínas: a p16, que ativa o mecanismo do Rb, e a ARF, que ativa o mecanismo do p53, sendo ambos fundamentais no ciclo celular para a transição G1 – S (152). A expressão elevada de qualquer dessas proteínas causa interrupção do ciclo celular. Entretanto, sua função mais importante é o estabelecimento da senescência celular, um estado de interrupção irreversível do desenvolvimento, incitado por diversas formas de estresse celular (26;152-154).

São poucos os estudos que avaliam individualmente as alterações da p16 e da ARF. O conhecimento atual baseia-se nos estudos em que as mutações atingem ambos os genes (155). A contribuição de cada uma destas para o estabelecimento da senescência parece dependente do contexto e da espécie estudada. De acordo



com a maioria dos estudos publicados na literatura mundial, a p16 tem o papel mais importante nas células humanas, enquanto a ARF, nas células dos ratos (26).

### Senescência Celular

A senescência celular foi inicialmente descrita por Hayflick e Moorhead como o fenômeno através do qual as células somáticas diplóides normais, quando em cultura, perdem a capacidade de replicação após um finito número de divisões, em contraste com as células neoplásicas que caracteristicamente apresentam imortalização (156). Esse fenômeno ocorre em decorrência do encurtamento progressivo dos telômeros a cada divisão celular, e que resulta em cromossomos criticamente curtos e sem funcionalidade. O encurtamento dos telômeros é inquestionavelmente o mecanismo que limita o potencial proliferativo das células normais que não possuam telomerase (157).

As células podem também ser submetidas a uma forma mais rápida de senescência, em resposta a várias formas de estresse, sendo chamada de senescência estresse-induzida, a qual pode ocorrer por ativação de oncogenes em células normais, por dano ao DNA e estresse oxidativo (158;159). Nestes casos, os estudos com fibroblastos mostraram que o bloqueio do ciclo está a cargo dos mecanismos do ARF / p53 e do p16 / Rb (153;160), enquanto os estudos com cultura de melanócitos evidenciaram que para o estabelecimento da senescência a atividade da p16 é fundamental (155;161-163).

Os NM são proliferações focais benignas de melanócitos, que podem permanecer estáveis por muitos anos e, ainda assim, agir como precursores do

melanoma. Segundo alguns autores, os NM parecem representar clones de células que sofreram um processo de expansão rápida, seguida da interrupção do crescimento, possivelmente por indução de senescência celular (153;164). A existência de mutações de proto-oncogenes explicaria a expansão dos melanócitos e a formação dos NM, e esses mesmos proto-oncogenes ativariam os mecanismos dos genes supressores tumorais que estabeleceriam a senescência celular (148;160;165). Um dos possíveis genes implicados seria o BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1), um oncogene que está presente em 82% dos NM e em 66% dos MC (166-168).

#### Incidência das alterações do gene CDKN2A

O p16 tem papel fundamental, como gene supressor tumoral, impedindo a progressão do melanoma; as aberrações (mutações, deleções de homozigosidade) atingindo exclusivamente os outros produtos do mesmo cromossomo, ARF e p15, são extremamente raras, tanto no melanoma familiar quanto no esporádico (169). Em outras palavras, mutações no CDKN2A que afetam somente ARF são muito menos comuns que as mutações que afetam p16, com ou sem afetar a ARF (170).

A identificação do CDKN2A ocorreu através de pesquisa em pacientes com melanoma e melanomas nos familiares (143;144;171). Neste contexto, a incidência das alterações desse gene varia conforme o grupo estudado e de acordo com o número de indivíduos com MC dentro de cada família. Assim, a chance de encontrar uma mutação aumenta de 5% - em famílias com dois membros afetados, para 20 a 40% quando três ou mais indivíduos são afetados (170). Em média, considera-se

que em um terço dos casos de melanoma familiar exista alteração do CDKN2A. Segue abaixo uma tabela, extraída de Piepkorn (tabela 4) (141), revisando a incidência de alterações deste gene encontrada em diversos estudos do melanoma familiar.

Tabela 4. Famílias com mutações germinativas para o melanoma, segundo Pieokorn (141)

Nº de famílias	Com mutação	Percentual
18	13	72%
14	7	50%
48	10	21%
15	13	87%
33	5	15%
100	8	8%
27	6	22%
16	6	38%
10	4	40%
48	21	44%
42	9	21%
Média		38%

As mutações no CDKN2A são transmitidas em um modelo autossômico dominante, e conferem um risco extremamente alto para o desenvolvimento do MC, com estudos calculando risco relativo aumentado em até 70 vezes. A penetração dessas mutações é muito influenciada pela idade e pela localização geográfica, com taxas de 13% na Europa, 50% nos EUA, e 32% na Austrália nos indivíduos em torno dos 50 anos, subindo para 58%, 76% e 91%, respectivamente, em torno dos 80 anos (155).

Em nosso meio, Ashton-Prolla e colaboradores avaliaram 30 pacientes com historia familiar de melanoma e encontraram as mutações G-34T e M53I. Ambas as

mutações foram previamente descritas, associadas com melanoma, demonstrando efeito do fundador, de provável etiologia europeia (172).

As mutações no CDKN2A no melanoma esporádico são raras. Estima-se que apenas 0,02% dos casos esporádicos podem ser atribuídos a mutações do CDKN2A (140). É provável que a inativação do mecanismo do Rb nesses casos ocorra por um silêncio não mutacional do gene CDKN2A ou por ativação da ciclina D/CDK4. Embora a precisa incidência do silêncio do CDKN2A não seja conhecida, um estudo recente encontrou evidências de hipermetilação da região promotora deste gene em 75% dos melanomas estudados (148;173).

#### CDKN2A e a progressão para o melanoma cutâneo

Um dos primeiros estudos que analisou a expressão IHQ da proteína p16 em lesões melanocíticas foi realizado por Reed e colaboradores (28). Eles avaliaram 14 melanomas metastáticos, 37 melanomas invasivos primários, 14 melanomas *in situ*, 18 nevos atípicos e 20 nevos comuns. Todos os NM e todos os melanomas *in situ* expressaram homogeneamente a p16. A expressão nos demais melanomas está descrita na tabela abaixo (tabela 5), adaptada do referido trabalho:

Tabela 5. Expressão IHQ da proteína p16 em melanomas (28):

	Expressão em todas as células	Expressão em variável proporção de células	Sem expressão
Melanoma primário invasivo	48%	43%	9%
Melanoma metastático	28%	28%	44%

Este estudo demonstra que nos melanomas invasivos primários o componente *in situ* expressou uniformemente a p16, enquanto houve perda dessa expressão no componente invasivo.

Entretanto, outro estudo recente, utilizando a mesma metodologia, encontrou negatividade na expressão IHQ da proteína p16 em todos os melanomas *in situ* avaliados (3/3); ademais, em um dos melanomas espessos avaliados (1/22), o componente *in situ* expressava fortemente essa proteína, enquanto o componente invasivo pouco ou nada a expressava (29).

Outros estudos realizados confirmaram os dados extremos, ou seja, a expressão homogênea da p16 nos NM e a perda da expressão nas formas avançadas do MC (27;174). Segundo Keller-Melchior e colaboradores, alguns melanomas *in situ* também apresentam redução na expressão IHQ da p16 (27) Nesse estudo, sete melanomas invasivos tinham contigüidade com NM, com a parte névica expressando intensamente p16 e a parte neoplásica com uma expressão bem reduzida

Ghiorzo e colaboradores analisaram a expressão IHQ da p16 em lesões melanocíticas de indivíduos de famílias com melanoma e concluíram que os melanomas *in situ* expressam significativamente menos p16 do que os NM.

Foi encontrado que melanomas invasivos com espessura maior do que 0,8 mm têm uma expressão menor da p16 comparativamente aos melanomas com espessura menor do que 0,8 mm, enquanto não houve diferença na expressão entre melanomas espessos e metástases. Na avaliação dos NM constatou-se que os NM compostos e intradérmicos expressam mais do que os juncionais. Na comparação

entre os NM de indivíduos com e sem mutação do CDKN2A não foram encontradas diferenças quantitativas na expressão da p16; a única diferença encontrada foi na localização do anticorpo, que na ausência da mutação (gene selvagem) era tanto nuclear quanto citoplasmática (13/16 casos), enquanto na presença da mutação o anticorpo é predominantemente nuclear (25/26 casos) (175).

Para tentar esclarecer o envolvimento do gene p16 na patogênese dos nevos melanocíticos como lesões pré-cancerosas, Tran e colaboradores (176) fizeram a análise de 44 MC esporádicos, 14 NM displásicos e 6 NM benignos; em 10 casos de MC foram relacionados também NM comuns ou displásicos dos mesmos pacientes. A investigação avaliou a perda de heterozigossidade (LOH) ou a presença de deleções homozigóticas no cromossoma 9p21 pela técnica de microdissecção a laser, para a captura de células nas áreas de interesse para posterior estudo do DNA empregando reação em cadeia de polimerase (PCR). A perda da heterozigossidade foi detectada em 40% dos MC (17/44), independente da profundidade e do nível de invasão do tumor. Nos NM essa alteração foi detectada em 50% (3/6) dos NM comuns e em 64% (9/14) dos NM displásicos. As deleções homozigóticas ocorreram em 29% (4/14) dos NM displásicos e nenhuma ocorrência deste tipo foi encontrada nos NM benignos, sugerindo que alterações no cromossoma 9p21 podem ocorrer em lesões precursoras e precocemente na evolução do MC (176).

Recentemente, Sini e colaboradores (177) avaliaram a presença de perdas alélicas no cromossoma 9p21 por hibridização fluorescente *in situ* (*fluorescence in situ hybridization* FISH) e a expressão IHQ da proteína p16 nas mesmas lesões

melanocíticas. Foram selecionados blocos histológicos de MC de áreas não-fotoexpostas cronicamente - tronco, braços e pernas - de 32 pacientes com MC esporádico, bem como oito blocos histológicos de metástases de MC ocorridas nesses mesmos pacientes, além de 20 NM comuns e 22 NM displásicos. Foram encontradas deleções hemizigóticas em 10% dos NM comuns, 55% dos NM displásicos, 59% dos MC primários e 62% das metástases. A análise apenas do *locus* CDKN (que inclui os genes CDKN2A e CDKN2B) não encontrou deleções de alelos nos NM comuns (0/20), mas encontrou em 9% dos NM displásicos (2/22), 7% dos MC iniciais (1/14), 28% dos MC avançados (5/18) e em 37% (3/8) metástases. O estudo da expressão IHQ para a proteína p16 mostrou que todos os NM expressam uniformemente a p16, enquanto a perda da expressão ocorreu em 7% (1/14) dos MC iniciais, em 17% (3/18) dos MC avançados e em 62% (5/8) das metástases. Mesmo sendo a deleção de apenas um alelo (o outro pode codificar sozinho a proteína), esses achados sugerem um papel inicial na patogênese do melanoma (177).

Bogdan e colaboradores (178) investigaram MC associados a NM, usando técnicas de microdissecção com agulha fina e PCR para identificar a presença de deleções de alelos no cromossomo 9p21. Foi encontrada uma alta frequência de deleções alélicas nos NM e nos MC associados, sugerindo que NM associados a MC são precursores desta neoplasia.

#### p16 e radiação ultravioleta

Assim como buscou-se estabelecer a variação da expressão da p16 nos NM – os quais são o principal fator de risco individual para o desenvolvimento do MC,

também buscou-se estabelecer a relação do p16 com o principal fator ambiental relacionado ao MC, a RUV.

Um dos estudos pioneiros nesse campo foi realizado por Pavey e colaboradores, que utilizaram pele de prepúcio de recém-nascidos, submentendo-a à cultura de órgãos e RUV. Houve aumento da expressão IHQ da p16, predominantemente nas camadas basal e supra-basal, em todos os casos examinados, com pico em 24 horas após a irradiação, para todas as doses de UV utilizadas (179). Krahn e colaboradores (180) avaliaram a expressão da p16 por reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR) em indivíduos com diagnóstico pregresso de MC e em voluntários sem histórico de doença neoplásica na pele, ambos sem histórico familiar de MC. Foram realizadas biópsias de pele fotoprotegida imediatamente antes do tratamento experimental com duas DEM de RUVB e as biópsias foram repetidas 24 horas e 8 dias após o experimento. Os controles apresentavam níveis iniciais menores da p16, com pequena elevação no primeiro dia após a exposição à RUVB e retorno aos níveis iniciais no oitavo dia. Os casos apresentavam uma expressão inicial maior, mas em metade dos pacientes com história pregressa de MC (3/6) ocorreu uma diminuição importante (26 – 39%) na expressão da p16 que se manteve até o oitavo dia pós exposição.

Utilizando apenas melanócitos em cultura, obtidos de prepúcio de recém-nascidos brancos, expostos a doses crescentes de RUVB, Piepkorn encontrou um aumento da expressão da p16 em torno de 30%, comparado às células não-irradiadas, com expressão máxima em 5 a 12 horas após a irradiação (181).



Dermikan e colaboradores (182) analisaram a expressão IHQ da p16 em NM e MC de áreas cronicamente fotoexpostas e áreas fotoprotetidas. Os resultados sugerem que nos NM localizados em áreas cutâneas com alto risco de exposição à RUV a expressão da p16 é pouco mais freqüente do que nas áreas de baixo risco. A perda da expressão foi similar entre os MC localizados nas áreas fotoexpostas e nas fotoprotetidas.

Os estudos de Tronnier e colaboradores (18;19). mostram que a irradiação provoca alterações transitórias nos NM, os quais, em alguns casos, assemelham-se ao melanoma *in situ*.

Os estudos experimentais encontrados na literatura utilizam células em cultura e não existem estudos experimentais *in vivo* que avaliem as alterações na expressão da p16 nos NM após irradiação com UVB ou após trauma mecânico. Assim, estudos experimentais com nevos melanocíticos submetidos à RUVB podem auxiliar na compreensão dos mecanismos moleculares partícipes na formação dos melanomas.

## **7. OBJETIVOS**

1. Avaliar o efeito da radiação ultravioleta B na expressão imunohistoquímica da proteína p16 em melanócitos de nevos melanocíticos.
2. Avaliar o efeito do trauma mecânico, por meio de dermoabrasão, na expressão imunohistoquímica da proteína p16 em melanócitos de nevos melanocíticos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Crowson AN, Magro CM, Mihm MC. *In* The nondysplastic acquired nevi: Common acquired nevus and other benign acquired nevi. The melanocytic proliferations. Wiley-Liss; 2001. p. 73-96.
- (2) Barnhill RA, Llewellyn K. *In* Benign melanocytic neoplasms. In: Bologna JL, Jorizzo J, Rapini RP, editors. *Dermatology*. Mosby; 2003. p. 1757-88.
- (3) Mackie RM. *In* Disorders of the Cutaneous Melanocyte. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editors. *Rook's Textbook of Dermatology*. 7 ed. Blackwell Publishing; 2004. p. 38.1-38.39.
- (4) Nestle FO, Kerl H. Melanoma. In: Bologna JL, Jorizzo J, Rapini RP, editors. *Dermatology*. Mosby; 2003. p. 1789-816.
- (5) Lens M. Current clinical overview of cutaneous melanoma. *Br J Nurs* 2008 Mar 13;17(5):300-5.
- (6) Miller AJ, Mihm MC, Jr. Melanoma. *N Engl J Med* 2006 Jul 6;355(1):51-65.
- (7) Clark WH, Jr., Reimer RR, Greene M, Ainsworth AM, Mastrangelo MJ. Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. 'The B-K mole syndrome'. *Arch Dermatol* 1978 May;114(5):732-8.

- (8) Kanzler MH, Mraz-Gernhard S. Primary cutaneous malignant melanoma and its precursor lesions: diagnostic and therapeutic overview. *J Am Acad Dermatol* 2001 Aug;45(2):260-76.
- (9) Bataille V, Bishop JA, Sasieni P, Swerdlow AJ, Pinney E, Griffiths K, et al. Risk of cutaneous melanoma in relation to the numbers, types and sites of naevi: a case-control study. *Br J Cancer* 1996 Jun;73(12):1605-11.
- (10) Carli P, Biggeri A, Giannotti B. Malignant melanoma in Italy: risks associated with common and clinically atypical melanocytic nevi. *J Am Acad Dermatol* 1995 May;32(5 Pt 1):734-9.
- (11) Garbe C, Kruger S, Stadler R, Guggenmoos-Holzmann I, Orfanos CE. Markers and relative risk in a German population for developing malignant melanoma. *Int J Dermatol* 1989 Oct;28(8):517-23.
- (12) Holly EA, Kelly JW, Shpall SN, Chiu SH. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1987 Sep;17(3):459-68.
- (13) Swerdlow AJ, English J, MacKie RM, O'Doherty CJ, Hunter JA, Clark J, et al. Benign melanocytic naevi as a risk factor for malignant melanoma. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986 Jun 14;292(6535):1555-9.
- (14) Bauer J, Garbe C. Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment Cell Res* 2003 Jun;16(3):297-306.

- (15) Kaskel P, Kind P, Sander S, Peter RU, Krahn G. Trauma and melanoma formation: a true association? *Br J Dermatol* 2000 Oct;143(4):749-53.
- (16) Whiteman DC, Brown RM, Purdie DM, Hughes MC. Melanocytic nevi in very young children: the role of phenotype, sun exposure, and sun protection. *J Am Acad Dermatol* 2005 Jan;52(1):40-7.
- (17) Wiecker TS, Luther H, Buettner P, Bauer J, Garbe C. Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood: a risk factor study in 1,812 kindergarten children. *Cancer* 2003 Feb 1;97(3):628-38.
- (18) Tronnier M, Wolff HH. UV-irradiated melanocytic nevi simulating melanoma in situ. *Am J Dermatopathol* 1995 Feb;17(1):1-6.
- (19) Tronnier M, Smolle J, Wolff HH. Ultraviolet irradiation induces acute changes in melanocytic nevi. *J Invest Dermatol* 1995 Apr;104(4):475-8.
- (20) Tronnier M, Rudolph P, Koser T, Raasch B, Brinckmann J. One single erythemagenic UV irradiation is more effective in increasing the proliferative activity of melanocytes in melanocytic naevi compared with fractionally applied high doses. *Br J Dermatol* 1997 Oct;137(4):534-9.
- (21) Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Meyer LJ, Lewis CM, Anderson DE, Fountain JW, et al. Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22. *Science* 1992 Nov 13;258(5085):1148-52.

- (22) Fountain JW, Karayiorgou M, Ernstoff MS, Kirkwood JM, Vlock DR, Titus-Ernstoff L, et al. Homozygous deletions within human chromosome band 9p21 in melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Nov 1;89(21):10557-61.
- (23) Goldstein AM, Dracopoli NC, Engelstein M, Fraser MC, Clark WH, Jr., Tucker MA. Linkage of cutaneous malignant melanoma/dysplastic nevi to chromosome 9p, and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 1994 Mar;54(3):489-96.
- (24) Gruis NA, van d, V, Sandkuijl LA, Prins DE, Weaver-Feldhaus J, Kamb A, et al. Homozygotes for CDKN2 (p16) germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds. *Nat Genet* 1995 Jul;10(3):351-3.
- (25) Holland EA, Beaton SC, Becker TM, Grulet OM, Peters BA, Rizos H, et al. Analysis of the p16 gene, CDKN2, in 17 Australian melanoma kindreds. *Oncogene* 1995 Dec 7;11(11):2289-94.
- (26) Peters G. Tumor suppression for ARFicionados: the relative contributions of p16INK4a and p14ARF in melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2008 Jun 4;100(11):757-9.
- (27) Keller-Melchior R, Schmidt R, Piepkorn M. Expression of the tumor suppressor gene product p16INK4 in benign and malignant melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 1998 Jun;110(6):932-8.
- (28) Reed JA, Loganzo F, Jr., Shea CR, Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, et al. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor

suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res* 1995 Jul 1;55(13):2713-8.

- (29) Sanki A, Li W, Colman M, Karim RZ, Thompson JF, Scolyer RA. Reduced expression of p16 and p27 is correlated with tumour progression in cutaneous melanoma. *Pathology* 2007 Dec;39(6):551-7.
- (30) Grichnik JM, Rhodes AR, Sober AJ. Benign hyperplasia and neoplasias of melanocytes. In: Freedberg IM, Eusén AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, editors. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 6 ed. McGraw-Hill; 2003. p. 881-904.
- (31) Tannous ZS, Mihm MC, Jr., Sober AJ, Duncan LM. Congenital melanocytic nevi: clinical and histopathologic features, risk of melanoma, and clinical management. *J Am Acad Dermatol* 2005 Feb;52(2):197-203.
- (32) Ingordo V, Gentile C, Iannazzone SS, Cusano F, Naldi L. Congenital melanocytic nevus: an epidemiologic study in Italy. *Dermatology* 2007;214(3):227-30.
- (33) Krengel S, Hauschild A, Schafer T. Melanoma risk in congenital melanocytic naevi: a systematic review. *Br J Dermatol* 2006 Jul;155(1):1-8.
- (34) Kopf AW, Bart RS, Hennessey P. Congenital nevocytic nevi and malignant melanomas. *J Am Acad Dermatol* 1979 Aug;1(2):123-30.

- (35) Sampaio SAP, Rivitti EA. Nevos Pigmentares e Melanoma Maligno. Dermatologia. 3a ed. Artes Médicas; 2007. p. 1227-46.
- (36) Bechelli LM, Curban GV. Nevos. Compêndio de Dermatologia. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 1963. p. 531-44.
- (37) Kanzler MH, Mraz-Gernhard S. Primary cutaneous malignant melanoma and its precursor lesions: diagnostic and therapeutic overview. J Am Acad Dermatol 2001 Aug;45(2):260-76.
- (38) Bauer J, Buttner P, Wiecker TS, Luther H, Garbe C. Effect of sunscreen and clothing on the number of melanocytic nevi in 1,812 German children attending day care. Am J Epidemiol 2005 Apr 1;161(7):620-7.
- (39) Darlington S, Siskind V, Green L, Green A. Longitudinal study of melanocytic nevi in adolescents. J Am Acad Dermatol 2002 May;46(5):715-22.
- (40) MacKie RM, English J, Aitchison TC, Fitzsimons CP, Wilson P. The number and distribution of benign pigmented moles (melanocytic naevi) in a healthy British population. Br J Dermatol 1985 Aug;113(2):167-74.
- (41) Whiteman DC, Whiteman CA, Green AC. Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. Cancer Causes Control 2001 Jan;12(1):69-82.



- (42) Carli P, Naldi L, Lovati S, La VC. The density of melanocytic nevi correlates with constitutional variables and history of sunburns: a prevalence study among Italian schoolchildren. *Int J Cancer* 2002 Oct 1;101(4):375-9.
- (43) Gallagher RP, McLean DI. The epidemiology of acquired melanocytic nevi. A brief review. *Dermatol Clin* 1995 Jul;13(3):595-603.
- (44) Cho E, Rosner BA, Feskanich D, Colditz GA. Risk factors and individual probabilities of melanoma for whites. *J Clin Oncol* 2005 Apr 20;23(12):2669-75.
- (45) Harrison SL, MacKie RM, MacLennan R. Development of melanocytic nevi in the first three years of life. *J Natl Cancer Inst* 2000 Sep 6;92(17):1436-8.
- (46) Pope DJ, Sorahan T, Marsden JR, Ball PM, Grimley RP, Peck IM. Benign pigmented nevi in children. Prevalence and associated factors: the West Midlands, United Kingdom Mole Study. *Arch Dermatol* 1992 Sep;128(9):1201-6.
- (47) Naldi L, Lorenzo IG, Parazzini F, Gallus S, La VC. Pigmentary traits, modalities of sun reaction, history of sunburns, and melanocytic nevi as risk factors for cutaneous malignant melanoma in the Italian population: results of a collaborative case-control study. *Cancer* 2000 Jun 15;88(12):2703-10.
- (48) Bataille V, Snieder H, MacGregor AJ, Sasieni P, Spector TD. Genetics of risk factors for melanoma: an adult twin study of nevi and freckles. *J Natl Cancer Inst* 2000 Mar 15;92(6):457-63.

- (49) Ackerman AB. "Dysplastic nevus" syndrome: does a survey make it real? J Am Acad Dermatol 2003 Mar;48(3):461-3.
- (50) Roush GC, Dubin N, Barnhill RL. Prediction of histologic melanocytic dysplasia from clinical observation. J Am Acad Dermatol 1993 Oct;29(4):555-62.
- (51) Klein LJ, Barr RJ. Histologic atypia in clinically benign nevi. A prospective study. J Am Acad Dermatol 1990 Feb;22(2 Pt 1):275-82.
- (52) Piepkorn M, Meyer LJ, Goldgar D, Seuchter SA, Cannon-Albright LA, Skolnick MH, et al. The dysplastic melanocytic nevus: a prevalent lesion that correlates poorly with clinical phenotype. J Am Acad Dermatol 1989 Mar;20(3):407-15.
- (53) Kapur P, Selim MA, Roy LC, Yegappan M, Weinberg AG, Hoang MP. Spitz nevi and atypical Spitz nevi/tumors: a histologic and immunohistochemical analysis. Mod Pathol 2005 Feb;18(2):197-204.
- (54) Spatz A, Barnhill RL. The Spitz tumor 50 years later: revisiting a landmark contribution and unresolved controversy. J Am Acad Dermatol 1999 Feb;40(2 Pt 1):223-8.
- (55) Spitz S. Melanomas of childhood. 1948. CA Cancer J Clin 1991 Jan;41(1):40-51.

- (56) Wechsler J, Bastuji-Garin S, Spatz A, Bailly C, Cribier B, ndrac-Meyer L, et al. Reliability of the histopathologic diagnosis of malignant melanoma in childhood. *Arch Dermatol* 2002 May;138(5):625-8.
- (57) Requena C, Requena L, Sanchez-Yus E, Kutzner H, Llombart B, Sanmartin O, et al. Hypopigmented Reed nevus. *J Cutan Pathol* 2008 Jun 10.
- (58) Herd RM, Hunter JA. Familial halo naevi. *Clin Exp Dermatol* 1998 Mar;23(2):68-9.
- (59) Sotiriadis D, Lazaridou E, Patsatsi A, Kastanis A, Trigoni A, vliotou-Panagiotidou D. Does halo nevus without halo exist? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006 Nov;20(10):1394-6.
- (60) Gonzalez-Campora R, Galera-Davidson H, Vazquez-Ramirez FJ, az-Cano S. Blue nevus: classical types and new related entities. A differential diagnostic review. *Pathol Res Pract* 1994 Jun;190(6):627-35.
- (61) Serarslan G, Yaldiz M, Verdi M. Giant congenital cellular blue naevus of the scalp with disseminated common blue naevi of the body. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008 Apr 23.
- (62) Mittal RR, Gupta R, Sethi PS. Cellular blue naevus. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2001 Jul;67(4):200-1.

- (63) Mones JM, Ackerman AB. "Atypical" blue nevus, "malignant" blue nevus, and "metastasizing" blue nevus: a critique in historical perspective of three concepts flawed fatally. *Am J Dermatopathol* 2004 Oct;26(5):407-30.
- (64) Barnhill RL, Argenyi Z, Berwick M, Duray PH, Erickson L, Guitart J, et al. Atypical cellular blue nevi (cellular blue nevi with atypical features): lack of consensus for diagnosis and distinction from cellular blue nevi and malignant melanoma ("malignant blue nevus"). *Am J Surg Pathol* 2008 Jan;32(1):36-44.
- (65) Piana S, Gelli MC, Grenzi L, Ricci C, Gardini S, Piana S. Multifocal melanoma arising on nevus spilus. *Int J Dermatol* 2006 Nov;45(11):1380-1.
- (66) Zeren-Bilgin I, Gur S, Aydin O, Ermete M. Melanoma arising in a hairy nevus spilus. *Int J Dermatol* 2006 Nov;45(11):1362-4.
- (67) Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, et al. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc* 2007 Mar;82(3):364-80.
- (68) Ries LA, Wingo PA, Miller DS, Howe HL, Weir HK, Rosenberg HM, et al. The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. *Cancer* 2000 May 15;88(10):2398-424.
- (69) Gloster HM, Jr., Brodland DG. The epidemiology of skin cancer. *Dermatol Surg* 1996 Mar;22(3):217-26.

- (70) Lens MB, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2004 Feb;150(2):179-85.
- (71) Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005 Feb 19;365(9460):687-701.
- (72) Brochez L, Naeyaert JM. Understanding the trends in melanoma incidence and mortality: where do we stand? *Eur J Dermatol* 2000 Jan;10(1):71-5.
- (73) Marks R. Epidemiology of melanoma. *Clin Exp Dermatol* 2000 Sep;25(6):459-63.
- (74) Beddingfield FC, III. The melanoma epidemic: res ipsa loquitur. *Oncologist* 2003;8(5):459-65.
- (75) Rigel DS. Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. *J Am Acad Dermatol* 2008 May;58(5 Suppl 2):S129-S132.
- (76) National Cancer Institute. SEER. U S National Institute of Health 2008 April 15 [cited 2008 Aug 19];Available from: URL: <http://www.seer.cancer.gov>
- (77) Australian Institute of Health and Welfare. Cancer. Australian cancer incidence statistics update 2008 February [cited 2008 Aug 19];Available from: URL: <http://www.aihw.gov.au/cancer/index.cfm>

- (78) Coory M, Baade P, Aitken J, Smithers M, McLeod GR, Ring I. Trends for in situ and invasive melanoma in Queensland, Australia, 1982-2002. *Cancer Causes Control* 2006 Feb;17(1):21-7.
- (79) Instituto Nacional de Câncer. Estimativas 2008. Incidência de Câncer no Brasil 2007 [cited 2008 Aug 19]; Available from: URL: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>
- (80) Lapa MS, Guedes KF, Schlach FO, Landman G. Melanomas Malignos Cutâneos tratados no Hospital do Câncer de São Paulo: estudo retrospectivo para avaliação de distribuição, fatores prognósticos e sobrevida. *An Bras Dermatol* 2002;77(3):313-20.
- (81) Rachou AMS, Curado MP, Latorre MRDO. Melanoma Cutâneo: Estudo de base populacional em Goiânia, Brasil, de 1988 a 2000. *An Bras Dermatol* 2006;81(5):449-55.
- (82) Whiteman DC, Bray CA, Siskind V, Green AC, Hole DJ, MacKie RM. Changes in the incidence of cutaneous melanoma in the west of Scotland and Queensland, Australia: hope for health promotion? *Eur J Cancer Prev* 2008 Jun;17(3):243-50.
- (83) Downing A, Yu XQ, Newton-Bishop J, Forman D. Trends in prognostic factors and survival from cutaneous melanoma in Yorkshire, UK and New South Wales, Australia between 1993 and 2003. *Int J Cancer* 2008 Aug 15;123(4):861-6.

- (84) Severi G, Giles GG, Robertson C, Boyle P, Autier P. Mortality from cutaneous melanoma: evidence for contrasting trends between populations. *Br J Cancer* 2000 Jun;82(11):1887-91.
- (85) Bosetti C, La VC, Naldi L, Lucchini F, Negri E, Levi F. Mortality from cutaneous malignant melanoma in Europe. Has the epidemic levelled off? *Melanoma Res* 2004 Aug;14(4):301-9.
- (86) Gloster HM, Jr., Neal K. Skin cancer in skin of color. *J Am Acad Dermatol* 2006 Nov;55(5):741-60.
- (87) Rees JL. Melanoma: what are the gaps in our knowledge. *PLoS Med* 2008 Jun 3;5(6):e122.
- (88) Gohara MA. Skin cancer in skins of color. *J Drugs Dermatol* 2008 May;7(5):441-5.
- (89) Saez-de-Ocariz M, Sosa-de-Martinez C, Duran-McKinster C, Orozco-Covarrubias L, Palacios-Lopez C, Ruiz-Maldonado R. Cutaneous melanoma in private vs. public practices of Mexican dermatologists. *Int J Dermatol* 2008 Jun;47(6):637-9.
- (90) Forman SB, Ferringer TC, Peckham SJ, Dalton SR, Sasaki GT, Libow LF, et al. Is superficial spreading melanoma still the most common form of malignant melanoma? *J Am Acad Dermatol* 2008 Jun;58(6):1013-20.

- (91) Lachiewicz AM, Berwick M, Wiggins CL, Thomas NE. Epidemiologic support for melanoma heterogeneity using the surveillance, epidemiology, and end results program. *J Invest Dermatol* 2008 May;128(5):1340-2.
- (92) Kennedy C, Bajdik CD, Willemze R, de Gruijl FR, Bouwes Bavinck JN. The influence of painful sunburns and lifetime sun exposure on the risk of actinic keratoses, seborrheic warts, melanocytic nevi, atypical nevi, and skin cancer. *J Invest Dermatol* 2003 Jun;120(6):1087-93.
- (93) Fink AM, Fialla R, Steiner A. Seasonal pattern of the excision rate of melanoma and naevi. *Melanoma Res* 2001 Oct;11(5):531-4.
- (94) Chaudru V, Chompret A, Bressac-de PB, Spatz A, Avril MF, Demenais F. Influence of genes, nevi, and sun sensitivity on melanoma risk in a family sample unselected by family history and in melanoma-prone families. *J Natl Cancer Inst* 2004 May 19;96(10):785-95.
- (95) Whiteman DC, Bray CA, Siskind V, Hole D, MacKie RM, Green AC. A comparison of the anatomic distribution of cutaneous melanoma in two populations with different levels of sunlight: the west of Scotland and Queensland, Australia 1982-2001. *Cancer Causes Control* 2007 Jun;18(5):485-91.
- (96) Bakos L, Wagner M, Bakos RM, Leite CS, Sperhacke CL, Dzekaniak KS, et al. Sunburn, sunscreens, and phenotypes: some risk factors for cutaneous melanoma in southern Brazil. *Int J Dermatol* 2002 Sep;41(9):557-62.



- (97) Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* 2005 Jan;41(1):45-60.
- (98) Nguyen TD, Siskind V, Green L, Frost C, Green A. Ultraviolet radiation, melanocytic naevi and their dose-response relationship. *Br J Dermatol* 1997 Jul;137(1):91-5.
- (99) Harrison SL, Buettner PG, MacLennan R. The North Queensland "Sun-Safe Clothing" study: design and baseline results of a randomized trial to determine the effectiveness of sun-protective clothing in preventing melanocytic nevi. *Am J Epidemiol* 2005 Mar 15;161(6):536-45.
- (100) WHO. Artificial Tanning Sunbeds. WHO 2003 Available from: URL: <http://www.who.int/uv/publications/en/sunbeds.pdf>
- (101) Egan KM, Sosman JA, Blot WJ. Sunlight and reduced risk of cancer: is the real story vitamin D? *J Natl Cancer Inst* 2005 Feb 2;97(3):161-3.
- (102) Hawk JLM, Young AR, Ferguson J. Cutaneous Photobiology. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editors. *Rook's Textbook of Dermatology*. 7 ed. Blackwell Publishing; 2004. p. 24.1-24.24.
- (103) WHO. Ultraviolet radiation and health. WHO 2008 [cited 2008 Aug 27]; Available from: URL: [http://www.who.int/uv/uv\\_and\\_health/en/index.html](http://www.who.int/uv/uv_and_health/en/index.html)

- (104) Hussein MR. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *J Cutan Pathol* 2005 Mar;32(3):191-205.
- (105) Kadekaro AL, Kavanagh RJ, Wakamatsu K, Ito S, Pipitone MA, bdel-Malek ZA. Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: who will win the final round? *Pigment Cell Res* 2003 Oct;16(5):434-47.
- (106) Williams M, Ouhtit A. Towards a Better Understanding of the Molecular Mechanisms Involved in Sunlight-Induced Melanoma. *J Biomed Biotechnol* 2005;2005(1):57-61.
- (107) Maia M, Maeda SS, Marçon C. Correlação entre fotoproteção e concentrações de 25 hidroxí-vitamina D e paratormônio. *An Bras Dermatol* 2007 Jun;82(3):233-7.
- (108) Stern RS. Psoralen and ultraviolet a light therapy for psoriasis. *N Engl J Med* 2007 Aug 16;357(7):682-90.
- (109) Rees JL. The genetics of sun sensitivity in humans. *Am J Hum Genet* 2004 Nov;75(5):739-51.
- (110) Aubin F. Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. *Eur J Dermatol* 2003 Nov;13(6):515-23.
- (111) Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med* 2002 Dec;4(26):1-22.

- (112) Gaskill HK. Melanotic sarcomas resulting from irritation of pigmented nevi. JAMA 1913;60:341-4.
- (113) Kowal-Vern A, Criswell BK. Burn scar neoplasms: a literature review and statistical analysis. Burns 2005 Jun;31(4):403-13.
- (114) Lindelof B, Krynitz B, Granath F, Ekbom A. Burn injuries and skin cancer: a population-based cohort study. Acta Derm Venereol 2008;88(1):20-2.
- (115) Bormann G, Marsch WC, Haerting J, Helmbold P. Concomitant traumas influence prognosis in melanomas of the nail apparatus. Br J Dermatol 2006 Jul;155(1):76-80.
- (116) Woodrow SL, Burrows NP. Malignant melanoma occurring at the periphery of a giant congenital naevus previously treated with laser therapy. Br J Dermatol 2003 Oct;149(4):886-8.
- (117) Dragieva G, Hafner J, Kunzi W, Dummer R, Meuli M, Stiefel D, et al. Malignant melanoma in a large congenital melanocytic nevus 9 years after dermabrasion in childhood. Dermatology 2006;212(2):208-9.
- (118) Paradisi A, Capizzi R, De SC, Fossati B, Proietti I, Amerio PL. Malignant melanoma in a tattoo: case report and review of the literature. Melanoma Res 2006 Aug;16(4):375-6.
- (119) Kluger N, Phan A, Debarbieux S, Balme B, Thomas L. Skin Cancers Arising in Tattoos: Coincidental or Not? Dermatology 2008 Jul 10;217(3):219-21.

- (120) Bartal AH, Cohen Y, Robinson E. Malignant melanoma arising at tattoo sites used for radiotherapy field marking. *Br J Radiol* 1980 Sep;53(633):913-4.
- (121) Khan IU, Moiemmen NS, Firth J, Frame JD. Malignant melanoma disguised by a tattoo. *Br J Plast Surg* 1999 Oct;52(7):598.
- (122) Reimer RR, Clark WH, Jr., Greene MH, Ainsworth AM, Fraumeni JF, Jr. Precursor lesions in familial melanoma. A new genetic preneoplastic syndrome. *JAMA* 1978 Feb 20;239(8):744-6.
- (123) Lynch HT, Fritchot BC, III, Lynch JF. Familial atypical multiple mole-melanoma syndrome. *J Med Genet* 1978 Oct;15(5):352-6.
- (124) Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry D, Epstein MN, Greene MH, Van HM. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol* 1984 Dec;15(12):1147-65.
- (125) Swerdlow AJ, English JS, Qiao Z. The risk of melanoma in patients with congenital nevi: a cohort study. *J Am Acad Dermatol* 1995 Apr;32(4):595-9.
- (126) Stefanaki C, Stefanaki K, Antoniou C, Argyrakos T, Stratigos A, Patereli A, et al. G1 cell cycle regulators in congenital melanocytic nevi. Comparison with acquired nevi and melanomas. *J Cutan Pathol* 2008 May 20.
- (127) Herron MD, Vanderhooft SL, Smock K, Zhou H, Leachman SA, Coffin C. Proliferative nodules in congenital melanocytic nevi: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis. *Am J Surg Pathol* 2004 Aug;28(8):1017-25.

- (128) Kruger S, Garbe C, Buttner P, Stadler R, Guggenmoos-Holzmann I, Orfanos CE. Epidemiologic evidence for the role of melanocytic nevi as risk markers and direct precursors of cutaneous malignant melanoma. Results of a case control study in melanoma patients and nonmelanoma control subjects. *J Am Acad Dermatol* 1992 Jun;26(6):920-6.
- (129) Garbe C, Buttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Kruger S, et al. Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 1994 May;102(5):695-9.
- (130) Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer* 2005 Jan;41(1):28-44.
- (131) Weatherhead SC, Haniffa M, Lawrence CM. Melanomas arising from naevi and de novo melanomas--does origin matter? *Br J Dermatol* 2007 Jan;156(1):72-6.
- (132) Skender-Kalnenas TM, English DR, Heenan PJ. Benign melanocytic lesions: risk markers or precursors of cutaneous melanoma? *J Am Acad Dermatol* 1995 Dec;33(6):1000-7.
- (133) Carli P, Massi D, Santucci M, Biggeri A, Giannotti B. Cutaneous melanoma histologically associated with a nevus and melanoma de novo have a

- different profile of risk: results from a case-control study. *J Am Acad Dermatol* 1999 Apr;40(4):549-57.
- (134) Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol* 2003 Dec;139(12):1620-4.
- (135) Whiteman DC, Watt P, Purdie DM, Hughes MC, Hayward NK, Green AC. Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2003 Jun 4;95(11):806-12.
- (136) Purdue MP, From L, Armstrong BK, Krickler A, Gallagher RP, McLaughlin JR, et al. Etiologic and other factors predicting nevus-associated cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005 Aug;14(8):2015-22.
- (137) Winnepenninckx V, van den Oord JJ. p16INK4A expression in malignant melanomas with or without a contiguous naevus remnant: a clue to their divergent pathogenesis? *Melanoma Res* 2004 Aug;14(4):321-2.
- (138) Mariante JCS, Bakos L. Alterações clínicas, dermatoscópicas, histopatológicas e imuno-histoquímicas de nevos melanocíticos irradiados com raios ultravioleta B. Porto Alegre: UFRGS; 2003.
- (139) Bakos RM, Bakos L, Edelweiss MI, Cartell A, Mariante JC, Masiero NC. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in melanocytic nevi is altered by ultraviolet B. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2007 Dec;23(6):250-4.

- (140) Bataille V. Genetics of familial and sporadic melanoma. *Clin Exp Dermatol* 2000 Sep;25(6):464-70.
- (141) 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.
- (142) U.S.National Library of Medicine. Genetics Home Reference. U S National Institute of Health 2008 December 9 Available from: URL: <http://ghr.nlm.nih.gov/chromosome=9>
- (143) Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994 Apr 15;264(5157):436-40.
- (144) Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994 Apr 21;368(6473):753-6.
- (145) Rulyak SJ, Brentnall TA, Lynch HT, Austin MA. Characterization of the neoplastic phenotype in the familial atypical multiple-mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome. *Cancer* 2003 Aug 15;98(4):798-804.
- (146) Lynch HT, Fusaro RM, Lynch JF, Brand R. Pancreatic cancer and the FAMMM syndrome. *Fam Cancer* 2008;7(1):103-12.

- (147) Chin L. The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer* 2003 Aug;3(8):559-70.
- (148) Fecher LA, Cummings SD, Keefe MJ, Alani RM. Toward a molecular classification of melanoma. *J Clin Oncol* 2007 Apr 20;25(12):1606-20.
- (149) Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005 Nov 17;353(20):2135-47.
- (150) High WA, Robinson WA. Genetic mutations involved in melanoma: a summary of our current understanding. *Adv Dermatol* 2007;23:61-79.
- (151) Czajkowski R, Drewa T, Wozniak A, Krzyzyska-Malinowska E. Cell cycle in sporadic melanoma. *Int J Dermatol* 2002 Sep;41(9):550-6.
- (152) Bennett DC. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene* 2003 May 19;22(20):3063-9.
- (153) Bennett DC, Medrano EE. Molecular regulation of melanocyte senescence. *Pigment Cell Res* 2002 Aug;15(4):242-50.
- (154) Shay JW, Roninson IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* 2004 Apr 12;23(16):2919-33.
- (155) Pho L, Grossman D, Leachman SA. Melanoma genetics: a review of genetic factors and clinical phenotypes in familial melanoma. *Curr Opin Oncol* 2006 Mar;18(2):173-9.



- (156) Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961 Dec;25:585-621.
- (157) Serrano M, Blasco MA. Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol* 2001 Dec;13(6):748-53.
- (158) Minoo P, Jass JR. Senescence and serration: a new twist to an old tale. *J Pathol* 2006 Oct;210(2):137-40.
- (159) Ha L, Merlino G, Sviderskaya EV. Melanomagenesis: overcoming the barrier of melanocyte senescence. *Cell Cycle* 2008 Jul;7(13):1944-8.
- (160) Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. *N Engl J Med* 2006 Sep 7;355(10):1037-46.
- (161) Sviderskaya EV, Gray-Schopfer VC, Hill SP, Smit NP, Evans-Whipp TJ, Bond J, et al. p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2A deficiency in human melanocyte senescence, apoptosis, and immortalization: possible implications for melanoma progression. *J Natl Cancer Inst* 2003 May 21;95(10):723-32.
- (162) Sviderskaya EV, Hill SP, Evans-Whipp TJ, Chin L, Orlow SJ, Easty DJ, et al. p16(Ink4a) in melanocyte senescence and differentiation. *J Natl Cancer Inst* 2002 Mar 20;94(6):446-54.

- (163) Gray-Schopfer VC, Cheong SC, Chong H, Chow J, Moss T, bdel-Malek ZA, et al. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer* 2006 Aug 21;95(4):496-505.
- (164) Bennett DC. How to make a melanoma: what do we know of the primary clonal events? *Pigment Cell Melanoma Res* 2008 Feb;21(1):27-38.
- (165) Tuthill RJ, Reed RJ. Failure of senescence in the dysplasia-melanoma sequence: demonstration using a tissue microarray and a revised paradigm for melanoma. *Semin Oncol* 2007 Dec;34(6):467-75.
- (166) Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, et al. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005 Aug 4;436(7051):720-4.
- (167) Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003 Jan;33(1):19-20.
- (168) Williams M, Ouhtit A. Towards a Better Understanding of the Molecular Mechanisms Involved in Sunlight-Induced Melanoma. *J Biomed Biotechnol* 2005;2005(1):57-61.
- (169) 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.

- (170) Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* 2003 May 19;22(20):3042-52.
- (171) Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 1994 Sep;8(1):15-21.
- (172) Ashton-Prolla P, Bakos L, Junqueira G, Jr., Giugliani R, Azevedo SJ, Hogg D. Clinical and molecular characterization of patients at risk for hereditary melanoma in southern Brazil. *J Invest Dermatol* 2008 Feb;128(2):421-5.
- (173) Marini A, Mirmohammadsadegh A, Nambiar S, Gustrau A, Ruzicka T, Hengge UR. Epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in serum of patients with cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2006 Feb;126(2):422-31.
- (174) Talve L, Sauroja I, Collan Y, Punnonen K, Ekfors T. Loss of expression of the p16INK4/CDKN2 gene in cutaneous malignant melanoma correlates with tumor cell proliferation and invasive stage. *Int J Cancer* 1997 Jun 20;74(3):255-9.
- (175) Ghiorzo P, Villaggio B, Sementa AR, Hansson J, Platz A, Nicolo G, et al. Expression and localization of mutant p16 proteins in melanocytic lesions from familial melanoma patients. *Hum Pathol* 2004 Jan;35(1):25-33.
- (176) 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 (United States). *Cancer Causes Control* 2002 Sep;13(7):675-82.

- (177) Sini MC, Manca A, Cossu A, Budroni M, Botti G, Ascierto PA, et al. Molecular alterations at chromosome 9p21 in melanocytic naevi and melanoma. *Br J Dermatol* 2008 Feb;158(2):243-50.
- (178) Bogdan I, Smolle J, Kerl H, Burg G, Boni R. Melanoma ex naevo: a study of the associated naevus. *Melanoma Res* 2003 Apr;13(2):213-7.
- (179) Pavey S, Conroy S, Russell T, Gabrielli B. Ultraviolet radiation induces p16CDKN2A expression in human skin. *Cancer Res* 1999 Sep 1;59(17):4185-9.
- (180) Krahn G, Leiter U, Udart M, Kaskel P, Peter RU. UVB-induced decrease of p16/CDKN2A expression in skin cancer patients. *Pigment Cell Res* 2001 Jun;14(3):201-5.
- (181) Piepkorn M. The expression of p16(INK4a), the product of a tumor suppressor gene for melanoma, is upregulated in human melanocytes by UVB irradiation. *J Am Acad Dermatol* 2000 May;42(5 Pt 1):741-5.
- (182) Demirkan NC, Kesen Z, Akdag B, Larue L, Delmas V. The effect of the sun on expression of beta-catenin, p16 and cyclin d1 proteins in melanocytic lesions. *Clin Exp Dermatol* 2007 Nov;32(6):733-9.

## ARTIGO EM INGLÊS

Immunohistochemical expression of p16 in melanocytic nevi after ultraviolet B exposure or mechanical trauma

### Authors

Andre Avelino Costa Beber <sup>1</sup>, Andre Cartell <sup>2</sup>, Vinicius Duval da Silva <sup>3</sup>, Lucio Bakos <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Dermatology – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup> Department of Pathology – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup> Department of Pathology – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

### Correspondence

Andre Avelino Costa Beber – Rua Benjamin Constant, 402

CEP 98280-000 - Porto Alegre , RS – Brazil

Phone/fax: 55 55 3375 0710

e-mail: [andrecbeber@terra.com.br](mailto:andrecbeber@terra.com.br)

## ABSTRACT

**Background:** The total number of acquired melanocytic nevi on the body is the most important risk factor for development of cutaneous melanoma. Melanocytic nevi may be precursor lesions for a substantial proportion of the cases and may constitute an important step in the pathway leading to cutaneous melanoma. The p16 protein expression in sporadic melanocytic lesions correlates with melanoma progression.

**Objective:** To evaluate the effects of UVB exposure and mechanical trauma on the immunohistochemical expression of p16 in melanocytes of melanocytic nevi.

**Methods:** Thirty-seven and forty-four melanocytic nevi had one half experimentally treated *in vivo*, respectively, with 2 MEDs (minimal erythema dosis) of UVB and with dermabrasion. The lesions were excised after 7 days for the first group and 30 days for the second group and the immunohistochemical expression of p16 protein was compared by digital analysis.

**Results:** No significant difference was observed in the expression of p16 in melanocytes from melanocytic nevi after mechanical trauma. However, a small decrease in the number of positive cells was detected in UVB irradiated side.

**Conclusions:** One single UVB irradiation decreases the immunohistochemical expression of p16 in melanocytes from MN while one single mechanical trauma is not sufficient to modify it.

*Key words:* CDKN2A / p16, immunohistochemistry, melanoma, nevi, ultraviolet radiation, trauma.

## INTRODUCTION

Epidemiological studies have consistently shown that the total number of melanocytic nevi (MN) on the body is the strongest risk factor for the development of cutaneous melanoma (CM) (1;2). The incidence of CM has substantially increased among all Caucasian populations in the last few decades. The number of melanoma cases is increasing faster than any other cancer. The annual incidence rates has been 3 – 7% for fair-skinned Caucasian populations (3;4).

However, the patient's history of melanoma arising from a pre-existing mole (5) and the presence of histological remnants of benign nevi in approximately half of CM (6) mean that MN are not only markers, but also precursor lesions of a substantial proportion of this neoplasia and may constitute an important step in the pathway leading to CM (1). The incidence of melanocytic nevus-associated melanoma increases as the total number of melanocytic nevi on the body increases. This finding raises the hypothesis that persons with a large number of common nevi are at a higher risk to develop melanoma associated to a nevus rather than a melanoma *de novo* (7).

The CDKN2A locus on 9p21 chromosome codes two negative regulatory proteins: p16, for Retinoblastoma (Rb) pathway, and ARF, for the p53 pathway, both gatekeepers of G1-S checkpoint of cell cycle (8). Germline mutations in the CDKN2A gene are found in approximately 40% of the melanoma prone families and such alterations are also present in most melanoma cell lines (9;10)

As a tumor suppressor gene, p16 appears to play a fundamental role in melanoma progression whereas aberrations involving other products of CDKN2A

locus are extremely rare in melanoma cells lines and sporadic melanomas (11). Several studies have demonstrated that benign melanocytic nevi uniformly express the p16 protein whereas increasing loss of p16 expression is seen in melanoma progression (11). The role of p16 alterations in the initiation of sporadic melanoma is less clear.

Sun exposure is the only established exogenous causal factor for CM in white populations, mainly when associated with intermittent pattern of exposure and history of sunburn (12). MN can undergo transient morphological and biological alterations when irradiated with ultraviolet B (UVB) radiation, mimicking atypical nevi or even simulating melanomas *in situ* (13). Little is known about the role of mechanical trauma in the pathogenesis of CM (14).

The effects of UVB irradiation on p16 expression have been studied. In organ culture of neonatal foreskins, the levels of p16 dramatically increase after suberythemal doses of UV radiation, peaking at 24 h and declining by 72 h (15). The p16 protein level in cultured human melanocytes increases significantly after sublethal UVB irradiation. It was found that expression of p16 increases over time after irradiation and peaks maximum after 5 to 12 hours (16).

Little is known on the p16 expression in melanocytes of MN *in vivo* concerning the effect of UVB and there are no published data related to mechanical trauma. The objective of the present study is to evaluate the effects of a single UVB irradiation or a mechanical trauma (dermabrasion) on p16 expression in melanocytes from MN *in vivo*.



## **MATERIAL AND METHODS:**

The study was conducted at Departments of Dermatology and Pathology of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Porto Alegre, Brazil), after receiving approval from the Research and Ethics Committee of the hospital.

### *Patients*

Patients of both sexes, looking for excision of their MN at Dermatology Service were selected. Lesions with 4-16mm were included in the sample. The excluding criteria were: Atypical or bleeding lesions, signs of secondary infection, lesions on the face, genitals or extremities, pregnancy, patients with photosensitive diseases or taking potentially photosensitizing drugs and history of sun exposure or trauma in the last 30 days.

After giving written consent, the minor diameter of the MN were marked with a surgical pen. Procedures with irradiated nevi were done as described early (17). Mechanical trauma was made using a dermabrasion device (Dremel Minimite Model 750, Dremel, Racine, WI, U.S.A.), at 10.000 rpm, with 3mm diamond fraises, at the left or superior side of each lesion, maintaining intact the other side. After 4 weeks, the lesions were excised and the dermabrased side was identified for histological study.

### *Histology and Immunohistochemistry*

After fixation in 10% buffered formaldehyde, the specimens were processed for routine sections. Longitudinal sections were cut to observe both treated (TS) and non-treated sides (NTS) in the same slide.

Immunohistochemistry was carried out according to the following steps: (a) rehydration of the slides (xylene – alcohol – distilled water); (b) antigen recovery with citrate buffer and endogen peroxidase blocking; (c) application of the primary antibodies for p16 (mouse monoclonal antibody, clone 6H12, Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK), and secondary antibody associated with biotin-streptavidin amplification system (Novocastra Laboratories Ltd., Newcastle, UK), followed by diaminobenzidine (DAB) chromogen solution (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA). The immunohistochemical technique was counterstained with Giemsa as described by Sálvio et al (18). Cervical cancer was used as positive controls.

### *Image analysis*

The histological slides from melanocytic nevi were evaluated by computerized image analysis using a Media Cybernetics Image Capture Kit (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA) and RGB (red, green and blue) color system, which was connected to the microscope and computer. The digital images were analyzed using the Image-ProPlus software (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, U.S.A.). The slides were then assessed as summarized below.

### Acquiring the images

Histological slides were scanned at low magnification (x25) to locate the MN (Figure 1) and to identify both TS and the NTS. Since UVB penetration is superficial, only melanocytic cells from papillary and superficial dermis were evaluated. A cell was considered to be immunolabeled and positive for p16 expression if there was a visibly detectable brown substance within the nucleus, cytoplasm, or both. After that, at x100 magnification, areas of higher concentration of p16 - labeled cells (“hot spots”) were determined. Finally, at x400 magnification, the images of those “hot spots” were digitalized and saved in tagged image file format (TIFF), 1392x1040 pixels (Figure 2). Images from 4 to 8 microscopic fields (accordingly with the nevus size) were acquired, in both sides of the MN, totalizing 8 to 16 images of each nevus.

#### Computerized Image Analysis

All images were analyzed through Image-ProPlus using two tools: 1) all positive cells were counted using “Manual Tag” tool, in each image (Figure 3), of both treated and non treated side of the MN. The mean number of positive cells, from each side, was considered for statistical analysis; 2) the RGB threshold band corresponding to the positive immunostaining reaction (brown DAB) in nucleus and cytoplasm was selected by the researcher, in each image. The software considered only the melanocytic cells within this band, marking them in red for best visual assessment (Figure 4), to estimate the area (number of pixels) of highlighted cells in each image. The measurements were automatically transferred to a spreadsheet in which the area of all positive cells in a given image corresponded to its “sum” value. Therefore, the p16 labeling area of each side of the nevus was the mean value of all the images.

### *Statistical analysis*

Data were described using mean  $\pm$  standard deviation and analyzed using Student's *t* test for paired samples. To estimate the magnitude of the association Cohen's *d* statistic was computed.

Significance level was set to  $P < 0.05$ . Analyses were conducted using SPSS / version 15.0.

## **RESULTS**

Thirty seven MN had been submitted to UVR and forty four to mechanical trauma.

In the 44 MN submitted to mechanical trauma, the dermabraded side showed a mean number of 18207 pixels (2494 to 54213) *versus* 16952 pixels (513 to 43339) in non dermabraded side (NDS) ( $p=0.386$ ); the number of cells in dermabraded side (DS) was 58.5 (4 to 131,5) while in NDS was 60.7 (4,25 to 138) ( $p = 0.486$ ). Therefore, the differences found using two methodologies were not statistically significant.

In the 37 MN irradiated with UVB, the total extent of the brown areas, which represented p16 immunohistochemical marker was 12013 pixels (1285 to 30291) in the irradiated side (IS) and 13555 pixels (3364 to 37592) in the non irradiated side (NIS) ( $p=0.129$ ). However, considering the number of cells, there was a decrease in IS. While in NIS there were 33.6 labeled cells (10.25 to 70), in the IS this number was 30.3 (6.25 to 67.5) (Figure 5). This difference, despite the small magnitude ( $d=0.34$ ),

was statistically significant ( $p=0.049$ ). The descriptive statistics is presented in Table 1.

## DISCUSSION

Epidemiological evidences have established that a history of sunburn and intermittent exposure to UV light, particularly early in life, promote melanoma development. However, the specific molecular targets, if any, of this environmental carcinogen are not known (19). In this study, we have demonstrated that exposition of MN to a single UVB dose *in vivo* expresses reduced amounts of protein p16 in melanocytes.

The reduced expression of p16 along with CM progression is well demonstrated in their extremes, i.e. MN, even the atypical, consistently express p16 protein, while advanced melanomas has reduced expression of this protein. However, there is no consensus in the literature whether this reduction is an initial event in tumorigenesis, since some studies have shown that *in situ* melanomas uniformly express such protein (20;21) while others showed a decreased expression (22).

Tronnier *et al.* have demonstrated that a single erythemalogenic exposure to UVB induces morphological changes in MN that simulates melanoma *in situ*. These changes were transient and disappear in a few weeks (23). Corroborating these findings, Bakos *et al* (17) found an increased immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase (MMP) – 2 and – 9, that appears to be involved in tumor invasion, development of metastatic melanoma and neoangiogenesis, in UVB

exposed MN. Metalloproteinases appear to be involved in tumor invasion, development of metastatic CM and neoangiogenesis.

There are few experimental studies analyzing p16 expression in melanocytes after UV irradiation. Pavey *et al.* (15), evaluating the expression of p16 after one MED in cultured foreskin of newborns, have found an increased number of cells expressing such protein, in about 15 to 20%, mainly in basal and suprabasal layers, peaking around 24h after exposure. Piepkorn (16), using culture of melanocytes found an increase of 30% in the number of cells that expressing p16 after doses sub-lethal UVB radiation doses. However, these studies were performed *in vitro*, with cells without any genetic defects and did not describe additional expression beyond 72h.

Krahn *et al.* (24) have studied cutaneous p16 expression in patients with previous diagnosis of sporadic melanoma. They found a significant decrease comparing to volunteers without personal or familial skin neoplasia. Patients have been submitted to biopsy of non exposed skin before the experimental treatment, with two MED of UVB radiation, biopsies were repeated 24 h and 8 days after the experiment and the fragments were evaluated by RT-PCR. The controls presented lower initial levels of p16, with small elevation in the first day and return to the initial levels on the eighth day. Cases showed a greater initial expression, but half of them (3/6) presented an important decrease in p16 expression (26 – 39%), which was maintained until the eighth day after the exposure to UVB (24). This study shows the possible existence of genetic modifications in skin of patients with previous history of

melanoma, which changed the p16 response to UVB irradiation, similar to we have found in melanocytes of MN exposed to UVB.

Several possible targets for UV radiation have been recognized, including the genes p16, p53 and RAS, which may present changes in melanomas; however, BRAF, which is often mutated in nevi and melanomas, may also deserve serious consideration as a UV target (25).

The MN and primary CM present BRAF mutations in around 80% of cases (26-28). This mutations were also found in 33% of patients with PUVA lentigines, suggesting that this change could be related to molecular and cellular effects of PUVA (29). The low frequency of BRAF mutations in melanomas not related to sun exposure, around 10% in the lesions of the mucosa, absent in soft tissues melanomas (clear cell sarcoma of tendons and aponeuroses) and absent in uveal malignant melanoma patients suggest that environmental influences, including exposure to sunlight, may play a role in BRAF mutations (27).

Michaloglou *et al.* (30) have sustained that BRAF expression in human melanocytes, induces cell cycle arrest, which is accompanied by the induction of both p16 and senescence-associated acidic b-galactosidase activity, a commonly used senescence marker. Melanocytes that express BRAF have high levels of p16, while normal melanocytes do not exhibit this expression (15). Associated with this, mice lacking p16 are phenotypically normal except prone to tumors and sensitive to carcinogens. These data suggest that p16 plays little or no role in normal development, but instead serves to limit inappropriate or aberrant cellular proliferation (31)

MN are benign, focal proliferations of melanocytes, which can remain non-growing for many years, and yet can act as precursors of melanoma. They appear to represent melanocyte clones that have undergone expansion followed by growth-arrest, possibly cell senescence. It is clear that p16 has a function in suppressing or limiting the growth of moles, as germline mutations in p16 are often associated with multiple large or dysplastic nevi as well as melanomas (32).

Little is known about the role of mechanical trauma in the pathogenesis of malignant melanoma. Kaskel *et al.* (14), reviewing 369 patients with CM, found only 2 patients that reported an irritation of pre-existing MN. Mohrle and Hafner (33) have hypothesized that acute or chronic trauma may play a role in the pathogenesis of subungual melanoma, as thumb and hallux are the digits mostly affected by subungual melanoma and the most frequently exposed to trauma. In spite of the influence of trauma on the primary pathogenesis of melanoma of nail apparatus could not be confirmed, Bormann *et al.* (34) found that trauma to the clinically apparent melanoma of the nail apparatus is the most decisive negative prognostic factor. Phan *et al.* (35) have stated that cases in which trauma immediately preceded the discovery of melanoma should be considered as coincidental or as acting to draw the patient's attention to the lesion.

Dermabrasion has been suggested as an effective way to treat large CMN, recommended to be performed up to the twelfth month of age (36). The aim of this treatment is to achieve a very early removal of the pigment cells in the upper layers (dermal-epidermal junction and upper dermis) before deeper penetration and, therefore, a reduction of the risk of malignant transformation. This phenomenon has



been explained by the migration of nevus cells to deeper skin layers during the first weeks and months of life. As most of the MM arising within congenital nevi develops from the dermal-epidermal junction, it has been hypothesized that removal of the junctional parts may reduce the risk of malignant transformation (36). However, dermal or subcutaneous nevus cells may remain in the skin. Reports on melanomas arising on large congenital melanocytic nevus after dermabrasion are rare (36;37) and it is currently accepted that this procedure does not increase the risk of melanoma development (38).

There are no studies regarding p16 expression in melanocytes from MN after experimental mechanical trauma. In the present study the finding of similar p16 expression in both dermabraded and control sides might mean that there could be no alteration on p16 expression after one single mechanical trauma. The similarities in the p 16 expression on both sides may be due to the long period (30 days) of time elapsed between dermabrasion and excision or due to the difficulty in measuring subtle differences in the p16 expression, as nevus cells normally express large quantities of the antigen. Further studies on MN and mechanical trauma are warranted to clarify questions about this issue.

## **CONCLUSIONS**

It is generally accepted that UV radiation has a role in MC development. There is a large body of evidences that intermittent sun exposure and sunburn increase the risk to CM development. Little is known about the role of mechanical trauma in the

pathogenesis of CM. Traumatic events on a pre-existing MN have been hypothesized as a causal factor for MC induction in individual cases.

In this study we have demonstrated that p16, a tumor suppressive protein, presents a decreased immunohistochemical expression in the melanocytes from MN after a single exposure to UVB radiation. After controlled mechanical trauma this modification was not found.

Numerous molecular steps of malignant transformation of melanocytes and melanoma development have been identified. However, the exact molecular events in the development of MN as benign proliferation of melanocytes and further progression to CM remain unclear. New studies on the biological responses of MN to UV radiation are needed to better clarify the relationship between MN and CM.

#### *Acknowledgements*

We are grateful to Neiva Copetti for her assistance with the immunohistochemical techniques, Mário Wagner, M.D., PhD. for his assistance with the statistical analysis.

#### *Funding sources*

Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE), at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

#### *Conflict of interest*

None declared.

## REFERENCES

- (1) Bauer J, Garbe C. Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment Cell Res* 2003 Jun;16(3):297-306.
- (2) Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer* 2005 Jan;41(1):28-44.
- (3) Lens MB, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2004 Feb;150(2):179-85.
- (4) Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet* 2005 Feb 19;365(9460):687-701.
- (5) Weatherhead SC, Haniffa M, Lawrence CM. Melanomas arising from naevi and de novo melanomas--does origin matter? *Br J Dermatol* 2007 Jan;156(1):72-6.
- (6) Skender-Kalnenas TM, English DR, Heenan PJ. Benign melanocytic lesions: risk markers or precursors of cutaneous melanoma? *J Am Acad Dermatol* 1995 Dec;33(6):1000-7.

- (7) Carli P, Massi D, Santucci M, Biggeri A, Giannotti B. Cutaneous melanoma histologically associated with a nevus and melanoma de novo have a different profile of risk: results from a case-control study. *J Am Acad Dermatol* 1999 Apr;40(4):549-57.
- (8) Czajkowski R, Drewa T, Wozniak A, Krzyzyska-Malinowska E. Cell cycle in sporadic melanoma. *Int J Dermatol* 2002 Sep;41(9):550-6.
- (9) Ghiorzo P, Villaggio B, Sementa AR, Hansson J, Platz A, Nicolo G, et al. Expression and localization of mutant p16 proteins in melanocytic lesions from familial melanoma patients. *Hum Pathol* 2004 Jan;35(1):25-33.
- (10) 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.
- (11) 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.
- (12) Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* 2005 Jan;41(1):45-60.
- (13) Tronnier M, Wolff HH. UV-irradiated melanocytic nevi simulating melanoma in situ. *Am J Dermatopathol* 1995 Feb;17(1):1-6.

- (14) Kaskel P, Kind P, Sander S, Peter RU, Krahn G. Trauma and melanoma formation: a true association? *Br J Dermatol* 2000 Oct;143(4):749-53.
- (15) Pavey S, Conroy S, Russell T, Gabrielli B. Ultraviolet radiation induces p16CDKN2A expression in human skin. *Cancer Res* 1999 Sep 1;59(17):4185-9.
- (16) Piepkorn M. The expression of p16(INK4a), the product of a tumor suppressor gene for melanoma, is upregulated in human melanocytes by UVB irradiation. *J Am Acad Dermatol* 2000 May;42(5 Pt 1):741-5.
- (17) Bakos RM, Bakos L, Edelweiss MI, Cartell A, Mariante JC, Masiero NC. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in melanocytic nevi is altered by ultraviolet B. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2007 Dec;23(6):250-4.
- (18) Salvio AG, Ribeiro DA, Marques ME. Identification of neoplastic cells in the lymphocytic infiltrate associated with thin melanomas. *Histopathology* 2007 Jun;50(7):942-4.
- (19) Kannan K, Sharpless NE, Xu J, O'Hagan RC, Bosenberg M, Chin L. Components of the Rb pathway are critical targets of UV mutagenesis in a murine melanoma model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Feb 4;100(3):1221-5.
- (20) Reed JA, Loganzo F, Jr., Shea CR, Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, et al. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor

- suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res* 1995 Jul 1;55(13):2713-8.
- (21) Sanki A, Li W, Colman M, Karim RZ, Thompson JF, Scolyer RA. Reduced expression of p16 and p27 is correlated with tumour progression in cutaneous melanoma. *Pathology* 2007 Dec;39(6):551-7.
- (22) Keller-Melchior R, Schmidt R, Piepkorn M. Expression of the tumor suppressor gene product p16INK4 in benign and malignant melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 1998 Jun;110(6):932-8.
- (23) Tronnier M, Rudolph P, Koser T, Raasch B, Brinckmann J. One single erythemagenic UV irradiation is more effective in increasing the proliferative activity of melanocytes in melanocytic naevi compared with fractionally applied high doses. *Br J Dermatol* 1997 Oct;137(4):534-9.
- (24) Krahn G, Leiter U, Udart M, Kaskel P, Peter RU. UVB-induced decrease of p16/CDKN2A expression in skin cancer patients. *Pigment Cell Res* 2001 Jun;14(3):201-5.
- (25) Thomas NE, Berwick M, Cordeiro-Stone M. Could BRAF mutations in melanocytic lesions arise from DNA damage induced by ultraviolet radiation? *J Invest Dermatol* 2006 Aug;126(8):1693-6.
- (26) Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003 Jan;33(1):19-20.

- (27) Thomas NE. BRAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res* 2006 Apr;16(2):97-103.
- (28) Uribe P, Wistuba II, Gonzalez S. BRAF mutation: a frequent event in benign, atypical, and malignant melanocytic lesions of the skin. *Am J Dermatopathol* 2003 Oct;25(5):365-70.
- (29) Lassacher A, Worda M, Kaddu S, Heitzer E, Legat F, Massone C, et al. T1799A BRAF mutation is common in PUVA lentigines. *J Invest Dermatol* 2006 Aug;126(8):1915-7.
- (30) Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, et al. BRAF<sup>V600E</sup>-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 2005 Aug 4;436(7051):720-4.
- (31) Sharpless NE, Chin L. The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene* 2003 May 19;22(20):3092-8.
- (32) Bennett DC, Medrano EE. Molecular regulation of melanocyte senescence. *Pigment Cell Res* 2002 Aug;15(4):242-50.
- (33) Mohrle M, Hafner HM. Is subungual melanoma related to trauma? *Dermatology* 2002;204(4):259-61.
- (34) Bormann G, Marsch WC, Haerting J, Helmbold P. Concomitant traumas influence prognosis in melanomas of the nail apparatus. *Br J Dermatol* 2006 Jul;155(1):76-80.

- (35) Phan A, Touzet S, Dalle S, Ronger-Savle S, Balme B, Thomas L. Acral lentiginous melanoma: a clinicoprognostic study of 126 cases. *Br J Dermatol* 2006 Sep;155(3):561-9.
- (36) Dragieva G, Hafner J, Kunzi W, Dummer R, Meuli M, Stiefel D, et al. Malignant melanoma in a large congenital melanocytic nevus 9 years after dermabrasion in childhood. *Dermatology* 2006;212(2):208-9.
- (37) Zutt M, Kretschmer L, Emmert S, Haenssle H, Neumann C, Bertsch HP. Multicentric malignant melanoma in a giant melanocytic congenital nevus 20 years after dermabrasion in adulthood. *Dermatol Surg* 2003 Jan;29(1):99-101.
- (38) Rompel R, Moser M, Petres J. Dermabrasion of congenital nevocellular nevi: experience in 215 patients. *Dermatology* 1997;194(3):261-7.



Table 1: Comparison of p16 expression on the treated and the non treated sides of nevi, according to irradiation or dermabrasion

<b>Characteristics</b>	<b>Treated</b>	<b>Control</b>	<b>95%CI</b>	<b>P</b>
<b>N = 37</b>	<b>Irradiated</b>	<b>Non-Irradiated</b>		
Mean area (pixels)	12013±7731	13555±8826	-3554 to 469	0.129
Mean number of positive cells	30.3±13.6	33.6±13.3	-6.6 to -0.1	0.049
<b>N = 44</b>	<b>Dermabraded</b>	<b>Non-Dermabraded</b>		
Mean area (pixels)	18207±11896	16952±8768	-1635 to 4143	0.386
Mean number of positive cells	58.5±26.0	60.7±24.6	-8.5 to 4.1	0.486

Data are presented as mean±SD; CI: confidence interval; P: statistical significance;

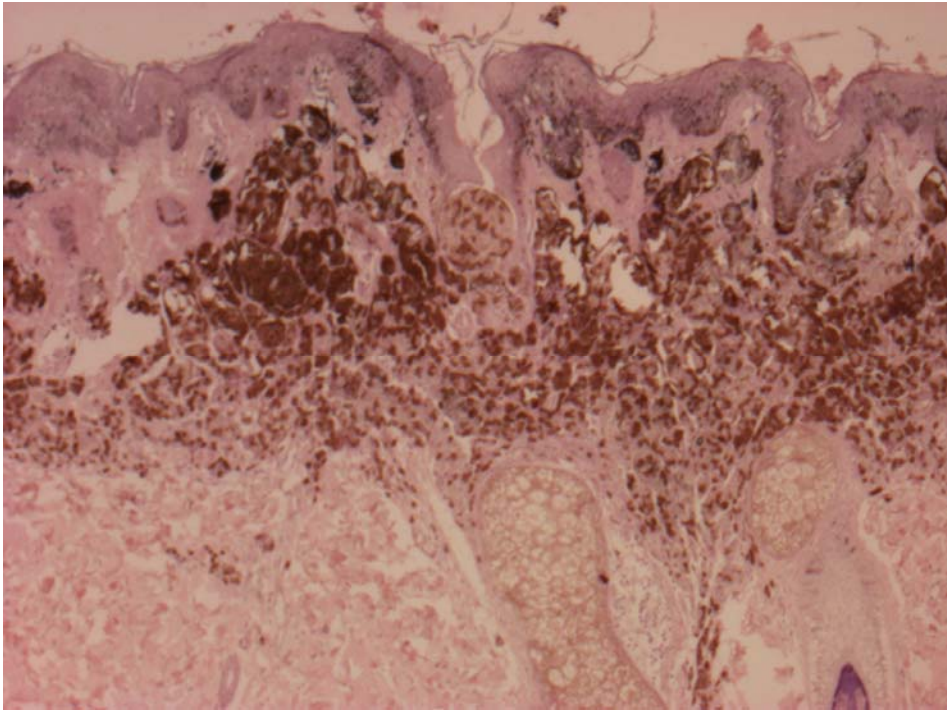


Figure 1 - Panoramic view of immunohistochemical expression p16 in a compound nevus (x25).

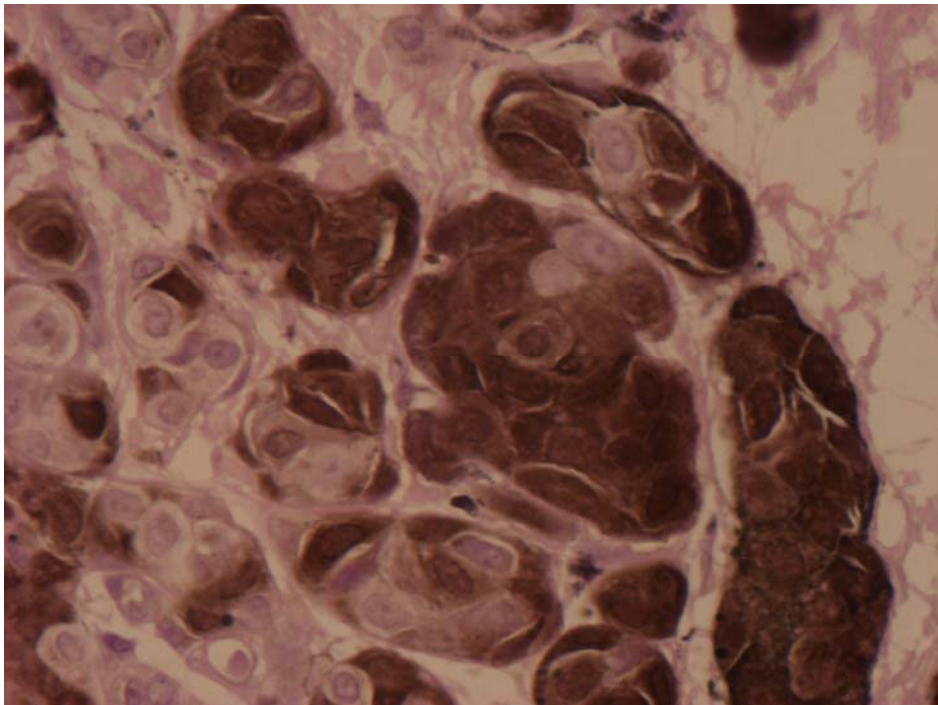


Figure 2 - High magnification of immunohistochemical expression of protein p16 in melanocytes (x400)

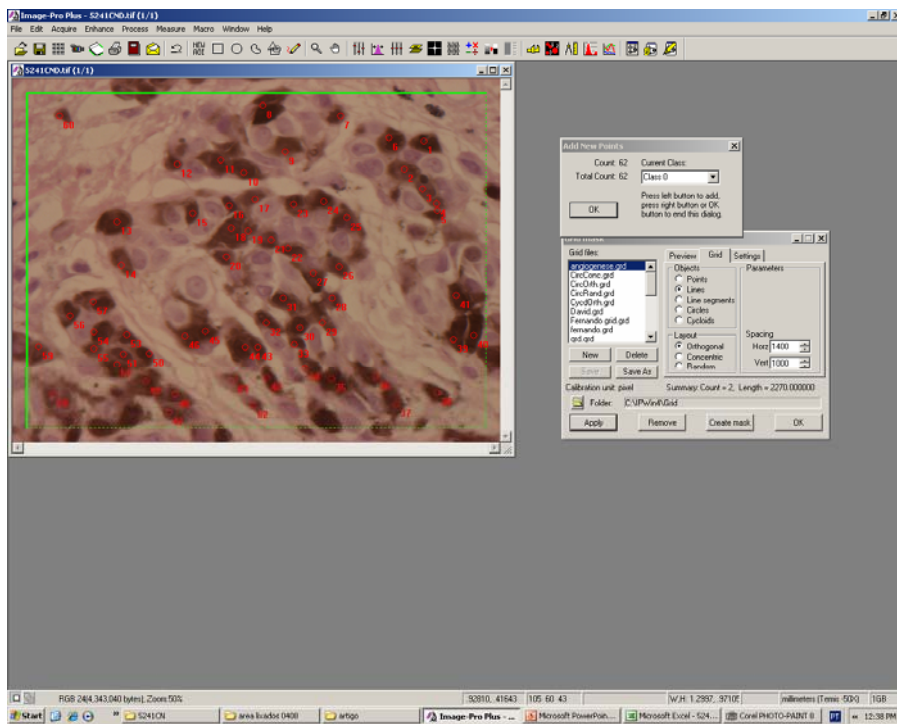


Figure 3 – Manual counting of positive melanocytes

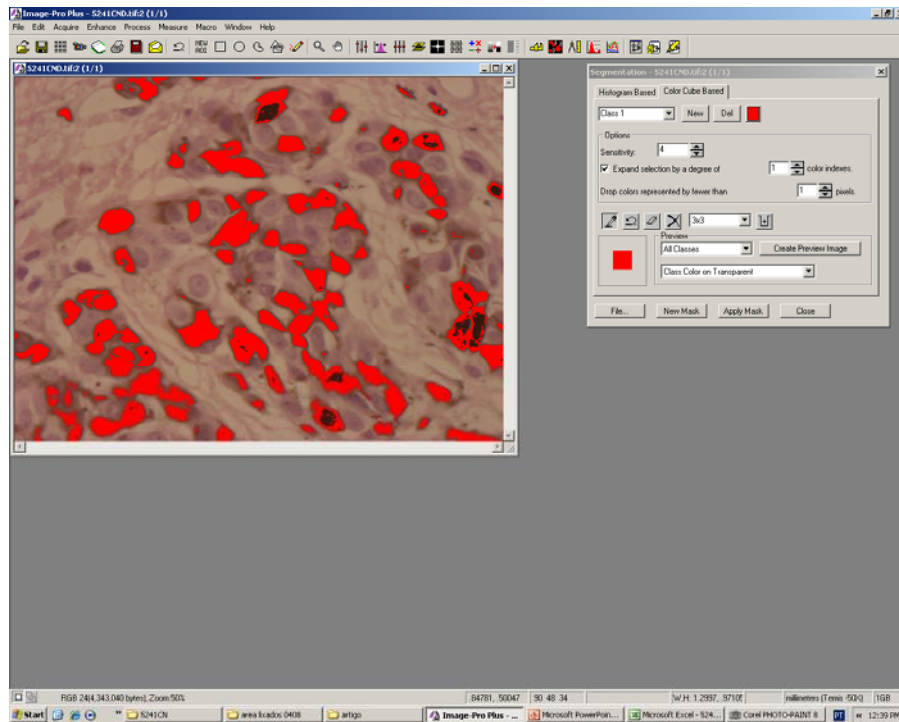


Figure 4 – Automatically measurement of brown areas

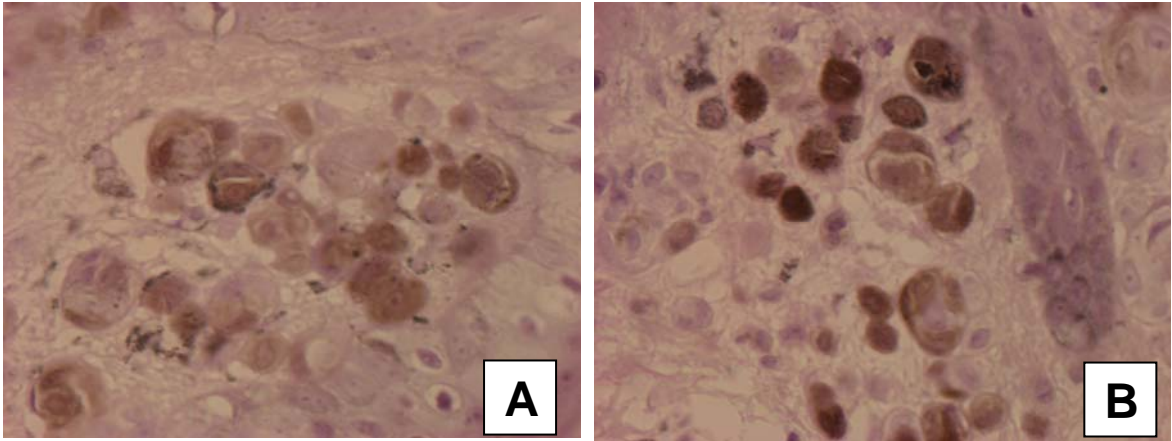


Figure 5 – Different immunohistochemical expression of p16 protein in an irradiated nevus. A – irradiated side; B – non irradiated side (x400)

## 11. CONSIDERAÇÕES GERAIS

É consensualmente aceito que a RUV tem um papel de destaque no desenvolvimento do MC. Há fortes evidências de que a exposição intermitente ao sol e as queimaduras solares aumentam o risco para o desenvolvimento do MC.

Pouco se sabe sobre o papel do trauma mecânico na patogênese do MC. Em casos individuais, eventos traumáticos sobre NM pré-existentes têm sido aventados como fatores causais para a indução do MC.

Nesse estudo, identificamos que a RUVB, mesmo em uma única exposição, diminui a expressão IHC da proteína p16, que tem função supressora tumoral, em melanócitos de NM, enquanto um único trauma mecânico por dermoabrasão não produz essa alteração.

Numerosos passos moleculares da transformação maligna dos melanócitos e do desenvolvimento do MC já foram identificados. Entretanto, os exatos eventos moleculares no desenvolvimento dos NM como proliferações benignas de melanócitos e a posterior progressão para o MC ainda não estão claros. Novos estudos sobre as respostas biológicas dos NM à RUV são necessários para melhor esclarecer a relação destes com o MC.

## ANEXO 1

### Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa



#### HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

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:** 06-494

**Pesquisadores:**

LUCIO BAKOS

ANDRE AVELINO COSTA BEBER

ANDRE DA SILVA CARTELL

**Título:** ESTUDO DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA P16 EM NEVOS MELANOCÍTICOS SUBMETIDOS A TRAUMA MECÂNICO OU À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada ao CEP/HCPA. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

Porto Alegre, 25 de maio de 2007.



Prof. Nadine Clausell

Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

## ANEXO 2

### RESULTADOS GERAIS

#### NEVOS IRRADIADOS: dados finais

IRRADIADOS	NAO IRRADIADOS	IRRADIADOS	NAO IRRADIADOS
SOMA	SOMA	MEDIA	MEDIA
5962,19	8670,16	23,75	25,25
10124,73	14564,49	41,25	52,75
10599,83	13251,70	43,00	52,00
4682,00	6704,33	12,75	21,50
5122,50	8009,72	24,00	40,50
7859,98	12336,52	33,00	43,50
6778,34	6276,88	13,50	10,25
15983,86	37592,36	26,25	47,13
14946,80	15823,86	30,13	35,00
26678,78	28922,02	31,75	31,63
12748,81	8848,70	39,38	27,00
18598,64	21523,72	36,75	30,00
5399,31	6017,81	8,75	20,75
30291,55	28619,77	67,50	70,00
5020,14	6639,53	28,25	26,25
1285,64	5575,02	6,25	19,25
24526,56	28048,48	37,00	41,25
10638,28	9460,33	33,00	26,50
14111,58	9408,57	32,25	21,00
9287,02	7478,52	28,75	32,00
18136,16	29454,67	22,50	31,13
23817,47	10593,52	49,50	34,00
23551,39	13791,30	54,00	45,50
10006,17	26789,61	20,50	27,75
8569,25	13566,48	24,25	41,00
9738,44	10153,27	25,25	26,50
8650,63	8270,02	34,25	37,25
4260,67	6706,25	21,00	30,75
2749,34	4548,39	9,25	14,50
12063,92	10353,61	36,25	35,00
14040,88	8135,03	49,25	26,75
8286,89	11334,52	31,75	46,75
29915,20	28982,95	41,38	49,38
13054,81	15937,20	39,25	57,25
3203,98	3664,06	17,00	16,25
9189,61	9825,52	40,50	38,25
4604,45	5673,08	8,75	11,75

**NEVOS DERMABRADIDOS: dados finais**

DERMABRADIDOS	NÃO DERMABRADIDOS	DERMABRADIDOS	NÃO DERMABRADIDOS
SOMA	SOMA	MEDIA	MEDIA
9286,64	23020,00	31,75	51,75
11895,45	18385,73	62,50	73,00
54213,87	37412,53	72,75	64,13
19258,25	20845,06	61,00	63,25
15213,13	15360,11	58,00	55,25
13598,53	7455,56	53,50	35,75
13148,05	13154,75	57,25	56,75
12917,78	19256,58	45,75	69,50
17613,19	16620,64	73,00	81,00
17144,86	19815,53	64,25	99,25
16067,44	20542,97	65,25	74,25
12989,89	13193,52	58,00	69,00
32671,02	18020,34	92,75	82,50
30550,03	28362,81	131,50	138,00
3784,05	513,55	18,50	4,25
11742,73	17037,89	61,25	60,75
2494,44	8920,72	4,00	8,00
14377,92	23280,20	29,75	50,00
41877,17	43339,59	83,25	79,88
5923,64	5400,30	34,25	23,50
3736,91	2573,61	10,25	9,00
20638,42	7682,98	59,00	25,00
10227,41	11375,83	39,75	46,75
10888,05	12278,97	48,00	52,25
29596,61	11763,61	87,75	54,50
7547,73	17101,89	33,25	66,25
26344,81	22432,70	42,88	48,00
14448,61	12771,44	49,25	51,25
22695,88	16854,86	49,75	57,13
23380,55	25565,88	70,50	88,50
42634,92	39939,19	76,75	88,13
25083,80	18802,17	79,50	73,38
17324,45	6648,13	28,50	43,50
17324,45	18840,30	58,50	87,50
52109,39	7219,59	128,25	50,25
12618,39	13756,92	49,25	61,75
20859,97	16966,80	78,25	68,50
21709,13	15446,64	105,00	61,00
12072,63	15799,69	66,00	86,75
12946,77	14073,50	61,75	61,75
11186,58	15703,77	48,00	60,75
20413,48	21805,30	60,00	77,75
8979,30	21059,75	42,00	61,50
11948,47	9526,65	44,00	49,75