

LUCIA MIIKO YOJO DE CARVALHO

**ATIVIDADE DA TELOMERASE NAS LESÕES  
MELANOCÍTICAS E NA PELE. CORRELAÇÃO COM  
ASPECTOS HISTOPATOLÓGICA NO MELANOMA**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola  
Paulista de Medicina, para obtenção  
do título de Doutor em Medicina.

São Paulo  
2000

**LUCIA MIIKO YOJO DE CARVALHO**

**ATIVIDADE DA TELOMERASE NAS LESÕES  
MELANOCÍTICAS E NA PELE. CORRELAÇÃO COM  
ASPECTOS HISTOPATOLÓGICA NO MELANOMA**

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola  
Paulista de Medicina, para obtenção  
do título de Doutor em Medicina.

**COORDENADORA: Prof<sup>ª</sup>. Dra. LYDIA MASAHO FERREIRA**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. IVAN DUNSHEE DE A. OLIVEIRA SANTOS**

**CO-ORIENTADORAS: Prof<sup>ª</sup>. Dra. MÔNICA VANNUCCI NUNES LIPAY**

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. LYDIA MASAHO FERREIRA**

São Paulo  
2000

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIRURGIA PLÁSTICA REPARADORA**

**COORDENADORA**

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA**

**ORIENTADOR**

**Prof. Dr. IVAN DUNSHEE DE ABRANCHES OLIVEIRA SANTOS**

**CO-ORIENTADORAS**

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. MÔNICA VANNUCCI NUNES LIPAY**

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA**

Ao meu marido,  
Luiz Adolfo Matsuoka de Carvalho,  
pelo incentivo e grande companheirismo.

Aos meus pais,  
Mikio e Kikue Yamanaka Yojo,  
pelo que sou.

## RESUMO

A telomerase é uma enzima ribonucleoproteica complexa com atividade tipo transcriptase reversa e DNA polimerase, capaz de sintetizar a partir de uma matriz RNA, o DNA telomérico ao nível das extremidades cromossômicas. Ela seria um marcador biológico da proliferação celular e não da transformação maligna, estando ela associada à senescência e morte celular. Acredita-se, entretanto, que o fato das células malignas reativarem essas enzimas e com níveis significativos, elas possam estar relacionadas com alguma etapa da transformação maligna. Utilizando-se o kit Telomerase PCR ELISA, realizou-se o estudo para determinar a atividade da telomerase no melanoma cutâneo primário, no nevo e na pele, comparando esse parâmetro entre os grupos; além de correlacionar a atividade com os dados histopatológico desses melanomas primários. Foram incluídos no presente trabalho, 110 amostras, sendo 30 de melanoma primário, 24 de pele adjacente, 30 de nevos e 26 de pele controle. O estudo estatístico da atividade da telomerase entre os grupos de melanoma e pele adjacente ( $p < 0,001$ ), melanoma e nevo ( $p < 0,001$ ), melanoma e pele controle ( $p < 0,001$ ), nevo e pele controle ( $p = 0,002$ ), nevo e pele adjacente ( $p = 0,004$ ) foram todos estatisticamente significantes. Comparou-se, também, grupos de 20 amostras de cada, pareadas conforme o sexo, faixa etária, e tipo de pele cujo resultado mostrou significância estatística apenas nos três primeiros grupos acima citados. Observou aumento crescente da positividade da atividade da enzima da pele para pele adjacente ao tumor, depois para o nevo e melanoma. A correlação foi satisfatória entre o índice mitótico e a atividade da telomerase ( $\rho = 40,1\%$ ). Demonstrou a tendência do aumento dos valores com o aumento da espessura do Breslow, o infiltrado linfocitário é intenso, na presença de ulceração que são indicativos histopatológicos de pior prognóstico.

## INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo ocupa o terceiro lugar em sua incidência dentre as neoplasias de pele, com acentuado índice de aumento, superando o de qualquer outro câncer humano (LANG, 1998; GLOSTER & BRODLAND, 1996; MARKS, 1995; Guidelines for the management of Cutaneous Melanoma of Australian Cancer Network, 1997; RIGEL, 1996; JONES et al., 1999; JOHNSON et al., 1995). Nos Estados Unidos da América, em menos de meio século sua a incidência cresceu 600% (GRIN-JORGENSEN, RIGEL, FRIEDMAN, 1992). Na Austrália o risco estimado para o desenvolvimento de melanoma antes dos 75 anos de idade na Austrália é de 1 em 27 para homens e 1 em 36 para mulheres (Guidelines for the Management of Cutaneous Melanoma, 1997). Esses índices alarmantes fazem com que as autoridades públicas se preocupem efetivamente com inúmeros aspectos além da prevenção, detecção de fatores de risco e a necessidade de se desenvolver um método terapêutico mais específico para o melanoma. Vale lembrar que embora altas porcentagens de cura sejam observadas no melanoma na fase inicial da doença, ainda não há tratamento adjuvante efetivo nas fases mais avançadas da doença (RIGEL, 1996).

Na busca de um melhor entendimento do processo molecular na progressão da doença, a última década testemunhou um avanço nas pesquisas de identificação gênica e estudo das aberrações citogenéticas evidenciadas em um grande número de melanomas (NELSON et al., 1996 GRUIS et al., 1995; ENGLAND et al., 1996). Discussões a respeito das alterações moleculares que levam a proliferações das células do melanoma, ou que aumentam a capacidade de invasão ou de metástase das mesmas, além de estudos de respostas imunológicas ligadas aos pacientes com melanoma vêm se desenvolvendo a cada dia (RODECK, & BECKER, 1998).

Marcadores de tumor são muito úteis na identificação de pacientes de alto risco, no diagnóstico e na avaliação de progressão da doença ou ainda da eficácia do tratamento indicando a recidiva precocemente. Exemplos de marcadores com alta especificidade e sensibilidade utilizados em muitos carcinomas são PSA (antígeno prostático específico) em câncer de próstata (DORR, WILLIAMSON, STEPHANS, 1993), CEA (antígeno carcinoembrionário) em câncer de colon (WOOLFSON, 1991; MARTIN et al., 1980). Infelizmente ainda não se encontrou um marcador de tumor tão específico e sensível assim para a avaliação do melanoma (MILIOTES et al., 1996). A dosagem da proteína S-100 (MILIOTES et al., 1996; HENZE et al., 1997) no soro, o mais estudado no caso do melanoma, parece ser indicador prognóstico em alguns estágios da doença, porém ainda não totalmente estabelecido, necessitando ainda de mais estudos. Outros marcadores para melanoma que estão sendo estudados são a tirosinase (VOIT et al., 1999) e MART-1 (CURRY & HERSEY, 1999). Marcadores já usados rotineiramente no diagnóstico de melanoma em exame imunohistoquímico, na patologia, como a proteína S-100, HMB-45, NKI/C3, NKI/betb, enolase neuro-específico e vimentina, apesar da alta sensibilidade nem sempre tem alta especificidade requerendo o uso de um painel com anticorpos contra outros marcadores (BARNHILL & MIHM, 1998).

A telomerase é uma enzima que poderia ser utilizada como marcador no próprio tecido tumoral e que está sendo muito estudada nas últimas duas décadas em diversos tipos de tumores. Essa enzima é uma ribonucleoproteína complexa com uma atividade enzimática do tipo transcriptase reversa e DNA polimerase, capaz de sintetizar a partir de uma matriz de RNA, DNA telomérico ao nível das extremidades cromossômicas (MORIN, 1989; ALBERTS et al., 1997). A telomerase não deixa que o telômero se encurte a cada divisão celular como ocorreria normalmente (ALBERTS, 1997). O telômero constitui-se de muitas

repetições em tandem de uma seqüência de DNA curta, que no humano essa seqüência é GGGTTA, e se localizam nas extremidades dos cromossomos permitindo a estabilidade dos mesmos (BLACKBURN & SZOSTAK, 1984). Ele protege o final da molécula de DNA contra a degradação por enzimas, evita fusões das extremidades (STEENSEL, SMOGORZEWSKA, LANGE, 1998) e garantem a duplicação correta nas regiões terminais do cromossomo. MORIN (1989), descobriu essa enzima pela primeira vez numa linhagem de célula cancerígena humana (GREIDER & BLACKBURN, 1996; SORIA & RIXE, 1997).

A atividade da telomerase foi encontrada na maioria dos tecidos de tumor e linhagens de células de tumor e não nas células somáticas (KIM et al., 1994; SHAY & BACCHETTI, 1997) , esses dados começaram a incentivar muitos autores na pesquisa dessa enzima nos diversos tecidos como carcinoma de ovário (COUNTER, HIRTE, BACCHETTI, HARLEY, 1994); tumor de colon, mama, Wilms, de próstata, de cérebro, pulmão, carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, leucemias e também tecidos normais (KIM et al., 1994; ); tumor de colon e várias linhagens celulares (AVILION et al., 1996); tumor de testículo, mama e ovário (BURGER, BIBBY, DOUBLE, 1997); variados tipos de tecido normal e de tumores (SHAY & BACCHETTI, 1997; câncer de mama (MOKBEL, 1999); linfócitos dos pacientes com linfoma cutâneo de células T (WU, K. et al., 1999). Esses achados sugeriam que a progressão da doença maligna era dependente da ativação da telomerase e que um agente inibidor da mesma poderia ser uma droga antitumor efetiva (KIM et al., 1994; RHYU, 1995; CHENG, 1997; BURGER et al., 1997; FARAONI, et al., 1999). Contudo, outros trabalhos mostraram que o uso da telomerase como um marcador de tumor ou alvo de medicamentos para quimioterapia poderia apresentar limitações. Hoje, sabe-se que essa enzima não é exclusiva das células malignas, mas que ela é, na realidade, marcador biológico da proliferação celular e não da

transformação maligna (BELAIR, 1997). Observou-se que na célula normal, ao longo de sua vida, essa enzima perde progressivamente a sua atividade, dado esse que levou à hipótese de que o comprimento do telômero poderia funcionar como um “relógio mitótico”, promovendo envelhecimento celular ou eventualmente fornecendo sinal replicador da senescência ou morte celular programada, através da limitação do número de divisões celulares em função da perda progressiva das terminações cromossômicas, que ocorrem à medida que a célula sofre divisões celulares ao longo de sua vida. A reativação da capacidade proliferativa observada nas células de tumor ou nas de linhagens celulares reflete, entre outras alterações, o retorno anormal da atividade da telomerase, reconstituindo a terminações cromossômicas.

Dentre as investigações na pele, estudos mostraram que a pele actínica apresenta atividade da telomerase maior do que a pele sem alteração dos raios solares (TAYLOR et al., 1996; UEDA et al., 1997), indicando uma associação da ativação da telomerase na pele por exposição aos raios ultravioleta.

Investigações da atividade da enzima telomerase no melanoma iniciaram em 1996 com TAYLOR e a cada ano vem crescendo o número de estudos tanto em linhagens celulares quanto em tecidos de melanoma primário ou metastático, tentando determinar a variabilidade da atividade dessas enzimas, se pode ser um agente iniciador e de progressão do tumor maligno (BOSSERHOFF et al., 1997; PARRIS et al., 1999; RAMIREZ et al., 1999; GLAESSL et al. 1999); possível indicador prognóstico (KLEINSCHMIDT-DeMASTERS et al., 1998); utilidade como marcador de diagnóstico (RUDOLPH et al., 2000) ou de tratamento (CHENG et al. 1997; GLUKHOV et al., 1998; FRANZESE et al., 1998; VILLA et al., 2000a; VILLA et al., 2000b).

Pensando-se em contribuir com a presente casuística para a literatura na elucidação da utilidade dessa enzima, sempre com intuito de auxiliar o paciente com melanoma cutâneo, o presente trabalho pretende investigar a atividade da

telomerase de forma quantitativa relativa, utilizando o kit telomerase PCR Elisa, na pele humana normal, na pele adjacente ao tumor, nas lesões melanocíticas benignas e no melanoma cutâneo primário.

## OBJETIVOS

- a) avaliar a atividade da telomerase, de forma quantitativa relativa, nos melanomas cutâneos primários, lesões melanocíticas benignas, pele adjacente ao tumor e pele de pacientes não portadores de melanoma cutâneo;
- b) correlacionar o grau de atividade da telomerase, de forma quantitativa relativa, com dados histopatológicos do melanoma cutâneo primário.

## LITERATURA

Os resumos dos trabalhos, dos autores que estudaram a atividade da telomerase em melanoma, apresentam-se a seguir, dispostos em ordem cronológica.

TAYLOR et al. (1996) demonstraram a presença da atividade da telomerase, utilizando o ensaio TRAP (telomerase repeat amplification protocol) por método radioativo, em 6 de 7 melanomas cutâneos (86%) com média da atividade da telomerase relativa de 30,12, as lesões avançadas e metastáticas apresentaram valores de 10 a 100 vezes maiores da atividade quando comparadas às lesões iniciais de espessura fina, contrastando com níveis extremamente baixos encontrados em pele protegida do sol. Das 7 amostras de melanomas, 5 tinham espessura menor que 0,78 mm tendo uma delas o menor nível de atividade da telomerase relativa encontrada pelo autor de 0,29; uma era de um nódulo metastático e outra de melanoma primário com 6 mm de espessura. Estudaram também o carcinoma basocelular e espinocelular obtendo valores da média da atividade da telomerase relativa de 143,8 e 48,16 respectivamente e com taxa de positividade de 94% e 84%. A pele adjacente ao tumor apresentou atividade da telomerase bem menor quando comparadas à atividade medida no tumor. Esse grupo apresentou atividade da telomerase positiva em 38 das 57 amostras testadas (67%) sendo a média do valor relativo da atividade da telomerase de 9,22. Pele com alteração solar como da região da cabeça (média de 11,16), lesões de psoríase (média de 6,73), dermatite de contato (média de 5,8), contudo, tiveram níveis aumentados de atividade da telomerase comparado à pele protegida do sol (média de 0,29), embora menores que os níveis detectados em tumores. Achados de níveis altos da atividade da telomerase em pele exposta ao sol comparada à pele não exposta ao sol sugerem

que fatores ambientais podem modular a atividade da telomerase. Os resultados revelaram que a atividade da telomerase pôde ser encontrada na pele tanto na condição maligna como na não maligna, estando a diferença apenas na quantidade delas. Determinaram também a atividade da telomerase na pele do ombro e região supra púbica de 3 pacientes negros que revelaram baixos níveis de atividade da telomerase nas duas regiões com média de 0,09 e 0,59 respectivamente, sugeriram que a pigmentação pudesse prevenir aumento da atividade induzida pelos raios ultravioleta na atividade da telomerase. Os autores acreditam que a presença maior de atividade da telomerase na pele exposta e nas lesões benignas é devido à quantidade de infiltrado inflamatório presente no local, e que esse aumento na atividade enzimática pode ser um reflexo da atividade auto-reguladora dos leucócitos ou da atividade aumentada das células residentes da pele em resposta às citocinas liberadas na epiderme por infiltrado leucocitário ativado.

BOSSERHOFF et al. (1997) mediram a atividade da telomerase em 10 amostras de pele, 17 nevos melanocíticos, 11 melanomas primários e 10 melanomas metastáticos utilizando o kit telomerase PCR Elisa (Böehringer Mannheim). Compararam ao protocolo TRAP convencional que requer amplificação PCR radioativo para detectar pequenas quantidades da atividade da telomerase, a alta sensibilidade do kit telomerase PCR Elisa amplia a tecnologia permitindo a detecção da telomerase de forma não radioativa e fornece medidas semiquantitativas. Demonstraram que o método detectou atividade em 100 células de melanoma que não foi detectado no gel de ethidium bromide-stained PAA, mas foi detectado através do Southern blots utilizando o método radioativo. Foram utilizadas linhagens celulares de melanoma Mel Im e HTZ-19, Mel Ei, Mel Wei, Mel Juso, Mel Ju, Mel Ho e SK Mel 28. Fibroblastos foram obtidos da pele de biópsias de doadores sãos e utilizando-se 6 a 7

passagens. Os tecidos utilizados foram 10 amostras de pele normal, 17 nevos melanocíticos, 11 melanomas primários e 10 melanomas metastáticos. Os resultados foram positivos para a atividade da telomerase em 10% (1/10) de pele normal, 29,4% (5/17) dos nevos melanocíticos, 64% (7/11) dos melanomas primários e 80% (8/10) nos melanomas metastáticos. Todas as linhagens celulares de melanoma apresentaram atividade da telomerase altamente positivos enquanto que os fibroblastos apresentaram atividade bem baixa. Os autores concluíram que seus resultados indicam que o aumento nos valores da atividade da telomerase correspondeu à progressão dos valores da atividade das células melanocíticas benignas para as células melanocíticas metastáticas. Ainda há necessidade de se investigar se algumas células da lesão metastática apresentam valores altos de atividade da telomerase ou se são todas elas apresentam. Os autores encontraram melanomas tanto primários quanto metastáticos com valores da atividade negativos.

UEDA et al. (1997) encontram a atividade da telomerase não só em tumores malignos (91%) mas também em muitos tumores de pele benignos (60%) e pré-malignos (89%) e sugeriram o envolvimento da ativação da telomerase como etapa biológica crucial para a carcinogênese humana. Dentre os tumores malignos foram testados 5 melanomas encontrando 4 com atividade dessa enzima positiva (80%). A atividade da telomerase foi positiva em 54% (21 de 39) das amostras de pele exposta ao sol enquanto que somente 12% (3 de 26) amostras de pele de área coberta apresentavam positividade para essa enzima. Os autores avaliaram as mutações no codons 247/8 do gene p53 (que é considerado específico do ultra-violeta) e encontraram em apenas 43% (7 de 16) das peles expostas com atividade da telomerase positiva com mutação no p53. Com esses dados os autores sugeriram que a ativação da telomerase estaria envolvida num estágio da carcinogênese humana e que a ativação pode preceder

a aquisição da mutação do p53 associada ao UV na pele. Os autores utilizaram o ensaio TRAP descrito por KIM et al. (1994), amplificação por PCR, analisado por um PhosphorImager (Molecular Dynamics).

GLAESSL et al. (1999) tiveram como objetivo investigar a atividade da telomerase em lesões melanocíticas e seu possível papel no modelo de progressão do melanoma maligno em seu múltiplos passos. Utilizaram o kit PCR Elisa (Boehringer Mannheim) para a quantificação da atividade da telomerase em 8 linhagens de células de melanoma (Mel Im, HTZ-19, Mel Ei, Mel Wei, Mel Juso, Mel Ju, Mel Ho, SK Mel 28), 3 culturas primárias de fibroblastos, 36 nevos melanocíticos, 5 nevos melanocíticos atípicos, 3 nevos de Spitz, 31 melanomas primários (nível de Clark I-IV, espessura de 0,2 mm a 10 mm, média de 1,4 mm), e 13 metástases de melanomas (5 cutâneas, 8 de linfonodos). Incluíram também amostras de 34 peles (22 de pele perilesional e 12 de pele normal). Todas as linhagens de células de melanoma tiveram a atividade da telomerase altamente positivos, considerando que a atividade da telomerase do fibroblasto não pôde ser detectada. Nos melanomas primários e metastáticos, 90,3% e 92,3%, respectivamente foram altamente positivas, e no nevo melanocítico atípico, 80% foram positivos. Somente 10 de 36 nevos melanocíticos comuns (27,7%) expressaram atividade da telomerase fracamente e, dentre 34 amostras da pele humana, 4 (11,7%) expressaram baixíssima atividade da telomerase. Nenhuma das 6 amostras de pele perilesional de melanoma demonstrou atividade detectável e entre o nevo atípico e o comum, o segundo apresentou níveis baixos de maneira significativa em relação ao primeiro. Somente 3 entre 10 amostras de nevos melanocíticos cuja telomerase apresentava valores positivos puderam encontrar infiltrado linfocitário. Por outro lado, em algumas amostras com grande infiltrado linfocitário, a atividade da telomerase não pôde ser mensurada. Os resultados indicaram que a atividade

da telomerase aumentou do nevo melanocítico benigno para nevo atípico e depois para melanoma e células do melanoma metastático, podendo desempenhar papel na iniciação e progressão do tumor. Na comparação dos níveis de Clark I/II com III e I/II com IV, mostraram diferenças significantes entre esses grupos com  $P < 0,05$ . Porém ressalta a importância de estudos prospectivos para elucidar se altos níveis de atividade dessa enzima estariam associados a uma evolução desfavorável da doença.

PARRIS et al. (1999) demonstraram a ativação da telomerase nas lesões pré-malignas da pele e também em todas as formas de câncer de pele. Na pele normal esse evento é raro e apenas dois, sendo um deles com história de exposição solar crônica, em 16 amostras apresentou telomerase ativa (12,5%). Um em 16 lesões proliferativas benignas (6,25%), 11 em 26 lesões pré-neoplásicas (42%), 10 em 13 carcinomas basocelulares (77%) e 22 de 31 melanomas metastáticos e 1 melanoma primário (69%) apresentaram telomerase positiva. Contudo somente 4 em 12 carcinomas espinocelulares (27%) apresentaram atividade da telomerase positiva. Realizaram análise do TRF (telomere hybridizing restriction fragment) nas amostras que apresentaram telomerase tanto positiva quanto negativa, apesar do limite amplo do tamanho do TRF observado de 3,6 a 17 kb, não foi encontrada uma relação entre o estado da telomerase e o tamanho da TRF. Esse dado adiciona a um número cada vez maior de relatos em que a ausência da atividade da telomerase tem sido associada com biópsia de tumores. Sugerindo que células de tumor telomerase negativa possa utilizar um caminho independente da telomerase para manter o tamanho do telômero, mas que o significado preciso pelo qual se manteria o comprimento do telômero ainda estaria para ser elucidado.

RAMIREZ et al. (1999) avaliaram a expressão da atividade da telomerase no nevo melanocítico, melanoma primário, melanoma metastático utilizando o ensaio TRAP com ITAS (internal telomerase assay standard) e analisado no Phosphorimager com Image Quant Software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). As amostras haviam sido congeladas rapidamente e estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o seu processamento. Vinte e seis lesões melanocíticas foram submetidas a análise do RNA da telomerase através do ensaio da hibridação in situ, com probe com molde para o componente RNA da telomerase para confirmar que a expressão foi quase que exclusivamente confinada às células do tumor e não ao infiltrado linfocitário. Os 18 melanomas primários apresentaram como média da atividade da telomerase relativa o valor de 1,6 (com erro padrão de 0,57); cinco amostras de metástase linfonodal 56,5 (erro padrão de 14,2); 8 amostras de metástase subcutânea 54,5 (erro padrão de 12,3). Quanto ao nível de Clark obtiveram valores crescentes na média da atividade da telomerase de 0,02 para nível II com 1 amostra; 1,1 (erro padrão de 1) para nível III com 4 amostras; 1,9 (erro padrão de 0,7) para nível IV com 13 amostras. Quanto à espessura de Breslow, seis amostras com espessura menores que 0,76 mm apresentaram média de atividade da telomerase de 1,2; espessura entre 0,76 e 1,69 mm o valor foi de 2,4. entre 1,7 e 3,6 mm o valor foi de 1,7 e maior que 3,6 mm (1 amostra) o valor foi de 2,5. O resultado da atividade da telomerase no índice mitótico foi estatisticamente significativo com valor do  $P = 0,03$  e valores das médias com índice mitótico alto ( $> 6$  mitoses/ $\text{mm}^2$ ) foi de 3,6 e baixo foi de 0,9. Quando os níveis da atividade da atividade da telomerase foi comparada com o crescimento radial e vertical não encontraram diferença estatisticamente significativa. Nos nevos melanocíticos benignos, em 35 amostras testadas, obtiveram o valor da média da atividade da telomerase relativa de 0,7 (erro padrão de 0,30). Obtiveram resultados indicativos de que níveis da atividade da telomerase e RNA da telomerase nas lesões melanocíticas correlacionam bem com o

estadiamento clínico e poderia potencialmente ajudar no diagnóstico das lesões borderlines.

WU, ICHIHASHI, UEDA (1999) examinaram as 3 sub unidades da telomerase humana identificadas: hTR = human telomerase RNA, TP1 = telomerase-associated protein, hTERT = human telomerase catalytic subunit. A representação dessas três sub unidades da enzima telomerase foi analisada em várias amostras de tumores de pele e em pele humana normal. Quarenta e cinco tumores de pele entre benignos, pré-malignos e malignos e 19 amostras de pele normal foram avaliadas pelo ensaio TRAP. A expressão de TP1 foi encontrada em 43 das 45 amostras de tumor (95,6%) e em todas as amostras de pele normal analisadas. A expressão de hTR foi encontrada em 42 das 45 amostras de tumor (93,3%) e em 18 das 19 amostras de pele normal (94,7%). Contrastando com a expressão de hTERT que foi detectada em 33 das 45 amostras de tumor (73,3%) e em somente 3 das 19 amostras de pele normal (15,8%). A atividade da telomerase foi positiva em 33 das 45 amostras de tumor (73,3%) e em 3 das 19 amostras de pele (15,8%). Concluíram que a atividade da telomerase nos tumores de pele está altamente relacionada à expressão do hTERT. Nesse estudo foram utilizadas 6 amostras de melanoma (5 com atividade da telomerase positivas) incluindo um sarcoma de células claras primário e 2 melanomas metastáticos (as duas amostras positivas para atividade da telomerase). Das 19 amostras de pele, 9 foram de local exposto ao sol (3 amostras apresentaram atividade da telomerase positivas) e 10 de local coberto 9 (todas com atividade da telomerase negativa).

TOSI et al. (2000) utilizando o método baseado no PCR não isotópico associado ao protocolo TRAP com pequena modificação do protocolo convencional observaram que a média relativa da atividade da telomerase

mostrou diferença significativa entre o melanoma ( $49,8 \pm 29,6$ ) e nevo de Spitz ( $2,4 \pm 2,5$ ). Avaliaram 8 nevos de Spitz clássico (dois do tipo juncional e 6 do tipo composto) e 38 melanomas divididos segundo nível de Clark onde observou média da atividade menor quanto menor o nível, aumentando conforme aumentava o nível de Clark. Os autores acreditam que seus resultados foram encorajadores e sugerindo uma possível aplicação da avaliação da atividade da telomerase no diagnóstico diferencial entre o nevo de Spitz e melanoma e que talvez a análise de grande número de casos provavelmente permitiria o estabelecimento de valor de corte da atividade da telomerase capaz de distinguir as duas lesões.

RUDOLPH et al. (2000) estudaram a atividade da telomerase em 72 lesões melanocíticas benignas, sendo 35 delas nevo displásico, e 16 melanomas. Cinco amostras de pele normal que foram colhidas de áreas protegidas do sol serviram de controle no ensaio da telomerase. Após a excisão, a peça foi dividida em duas partes, sendo uma congelada no nitrogênio líquido e armazenada a  $-80^{\circ}\text{C}$  e a outra parte fixada em formol 10% para posterior preparo do exame de hematoxilina-eosina e imunohistoquímica. Utilizaram o ensaio TRAP modificado, amplificação por PCR e análise por eletroforese de capilaridade (ABIprism310; Perkin-Elmer, Foster City, CA) e expressaram os valores da telomerase pela equivalência celular (CE) correspondente a múltiplos da atividade de uma célula L428 utilizado para controle. A atividade da telomerase da pele normal variou de 5 a 50 CE, com média de 20 CE; do nevo composto variou de 10 a 350 CE com média de 57,5 CE; do nevo displásico variou de 15 a 750 CE com média de 70 CE; do melanoma variou de 300 a mais de 5000 CE com média de 885 CE. Os índices de proliferação foram diferentes de forma significativa entre as lesões benignas e malignas mas não entre o nevo comum e nevo displásico. Demonstraram também uma correlação clinico-patológica onde

houve associação entre altos níveis de atividade da telomerase e disseminação de metástases do melanoma, ligando a telomerase com a biologia do tumor. Os resultados trouxeram argumentos a favor de uma progressão ocasional de nevo para melanoma implicando que a medida da proliferação associada ao ensaio da telomerase pudesse ajudar identificar a transformação maligna na fase precoce onde não fosse detectável através da morfologia convencional.

# MÉTODO

## 1. Amostra

### 1.1. Pacientes e controles

A triagem dos pacientes foi realizada junto à Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da UNIFESP – EPM e ao Instituto Brasileiro de Combate ao Câncer – IBCC.

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Paulo / Universidade Federal de São Paulo.

Todos os pacientes foram informados sobre a pesquisa previamente à biópsia, tanto verbalmente quanto por escrito (apêndice 1), autorizando em documento próprio a realização do procedimento (apêndice 2).

As amostras de tecido neoplásico foram obtidas por ocasião da biópsia excisional ou da ressecção ampla do tumor primário, segundo a conduta mais indicada ao paciente, sendo que o fragmento do tumor foi retirado somente após a remoção da peça cirúrgica. As amostras de pele adjacente ao melanoma foram retiradas da região contida nos limites da margem de segurança estabelecida para cada caso. Os indivíduos selecionados apresentaram diagnóstico de melanoma cutâneo primário e/ou lesão melanocítica benigna maiores de 0,6 cm e com indicação de excisão. As amostras de pele para controle foram obtidas de região pouco exposta ao sol de pacientes que não tinham diagnóstico de melanoma. Utilizou-se fragmento de pele retirada na excisão elíptica de angioliipoma e de cisto folicular; sobra do enxerto de pele da reparação de tumor cutâneo como carcinomas basocelular e espinocelular; fragmento a ser desprezado no segundo tempo da reconstrução mamária com retalho de músculo reto abdominal, ou ainda, pele retirada para acomodar melhor a área a ser

suturada chamada de “orelha de cachorro” que normalmente se despreza na retirada de lesões como nevos e queratose seborreica.

Os procedimentos de coleta da amostra foram realizados no período de junho de 1998 a julho de 2000. As amostras foram obtidas após a ressecção cirúrgica das lesões para fins terapêuticos. O material colhido foi identificado e congelado em nitrogênio líquido imediatamente após a retirada. A seguir, os frascos foram armazenados em tanques com nitrogênio líquido (-196°C) até o processamento.

Os pacientes operados com diagnóstico de melanoma, lesão melanocítica benigna, e também os que doaram pele controle, foram equiparados quanto ao sexo, idade e fototipo (PARRISH, WHITE, PATHAK, 1979) exposto na tabela I.

Todos os diagnósticos de melanoma e lesões melanocíticas benignas foram confirmados através do exame anátomo patológico conforme tabelas II e III respectivamente. Todas as lâminas do exame histopatológico foram analisadas no exame de rotina e revistas por uma única patologista. Fez-se o exame imuno-histoquímico apenas nas lâminas que apresentaram algum grau de dificuldade no diagnóstico com as coradas em hematoxilina-eosina (HE).

#### 1.1.4. Caracterização da amostra

Setenta e oito pacientes participaram do trabalho, sendo colhidos 110 amostras de lesões ou de pele. Desses, 58 (74,36 %) foram do sexo feminino e 20 (25,64 %) do masculino (figura 1). Quanto ao tipo de pele, 33 (42,31 %) pacientes eram do tipo II, 35 (44,87 %) do tipo III, 4 (5,13 %) do IV, 5 (6,41 %) do V e 1 (1,28 %) do tipo VI (tabela IV). A idade variou de 21 a 86 anos com a mediana de 58 anos e a distribuição por faixa etária está exposta na tabela V.

Do total de 110 amostras utilizadas no presente estudo 30 foram de melanoma, 24 de pele adjacente, 29 de nevo, 1 de lentigo simples e 26 de pele

normal de área pouco exposta ao sol de pacientes não portadores de melanoma. Quanto a localização, doze (40%) melanomas localizaram no tronco, 4 (13,33%) em cabeça e pescoço, 3 (10%) em membro superior, 11 (36,67%) em membro inferior; das 24 amostras de pele adjacente 3 (12,5%) foram da cabeça e pescoço, 9 (37,5%) do tronco, 3 (12,5%) dos membros superiores, 9 (37,5%) dos membros inferiores; das 30 amostras de lesões melanocíticas benignas 13 (43,33%) foram da cabeça e pescoço, 12 (40%) do tronco, 3 (10%) dos membros superiores e 2 (6,67%) dos membros inferiores; das 26 amostras de pele controle 5 (19,23%) foram da cabeça e pescoço, 17 (65,34%) do tronco, 4 (15,38%) dos membros inferiores (figura 2). Desse total de amostras, apenas 20 de melanoma, 20 de pele adjacente, 20 de nevo e 20 de pele controle foram possíveis de parear quanto à faixa etária, sexo e tipo de pele (tabela VI). Em 23 amostras de melanoma e sua respectiva pele adjacente foram conseguidas do mesmo paciente (tabela VI e VII). As características das amostras estão resumidas e expostas no apêndice 4.

Das 30 amostras de nevos onze eram congênitos e 19 adquirido. Vinte e três (76,7%) foram do sexo feminino e 7 (23,3%) do masculino e a idade variou de 22 a 83 anos.

Foram utilizadas 24 amostras de pele adjacente, sendo apenas 20 pareadas entre os quatro grupos e 23 estiveram pareadas com a respectiva amostra de melanoma. Dezesete (70,8%) amostras foram retiradas de pacientes do sexo feminino e 7 (29,2%) do masculino. A idade variou de 27 a 85 anos

Foram colhidas 26 amostras de pele controle. Vinte e uma (80,77%) amostras foram colhidas de pacientes do sexo feminino e 5 (19,23%) do masculino. A idade variou de 28 a 83 anos.

As amostras de melanoma, pele adjacente, nevo e pele controle pareadas conforme faixa etária, sexo e tipo de pele encontra-se na tabela VI.

## **2.0. Procedimento**

As metodologias descritas a seguir, para a análise da atividade da enzima telomerase em extratos celulares foram realizadas segundo o protocolo do fabricante do kit para detecção de atividade da telomerase (Telomerase PCR-ELISA Böehringer Mannheim)

### **A) Obtenção dos extratos protéicos**

As amostras de tecido foram maceradas em nitrogênio líquido com o auxílio de um pistilo, até a pulverização completa. Em seguida, foram adicionados 200 µl de tampão de lise ao macerado (0,5% CHAPS – 3-[(3-cholamidopropil)dimethylammonio]-1-propano-sulfonato], Tris-HCl 10mM, pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 1mM, EGTA). Os extratos foram, então, incubados por 30 minutos em gelo e centrifugados a 16000g a 4°C durante 20 minutos. O sobrenadante, cerca de 175 µl, foi removido e transferido para um tubo tipo eppendorf estéril identificado e imediatamente colocado em gelo seco, sendo estocado em seguida, à temperatura de – 82°C, até a sua utilização.

### **Determinação da quantidade de proteína na amostra**

A quantificação da proteína presente nos extratos provenientes das biópsias foi realizada por meio de comparação da leitura obtida com uma curva de concentração padrão de albumina bovina sérica (BSA), determinada sob leitura da absorbância a 595 nm, utilizando-se como corante o azul de coomassie (Bio Rad®), cujo padrão pode ser observado na Fig. 1.

### **Extensão e amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR)**

Três µl do extrato protéico, equivalente a 5 µg de proteína de cada amostra, foram adicionados a 25 µl da mistura de reação (oligonucleotídeos substrato para telomerase, nucleotídeos e Taq polimerase em tampão Tris ) completando-se o volume para 50 µl com água autoclavada livre de nucleases. Os tubos tipo eppendorf contendo esses componentes foram levados a termociclador (9700 PerkinElmer®) e submetidos ao programa de ciclagem de temperatura constituído de um ciclo de 30 minutos a 25°C; um de 5 minutos a 94°C; 32 ciclos de amplificação (30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C, 90 segundos a 72°C); um ciclo de 10 minutos a 72°C. Ao término da reação, as amostras foram mantidas a 4° C e posteriormente armazenadas a -22 ° C até sua utilização nos procedimentos de detecção.

Juntamente com as amostras testadas, foram submetidos à reação de extensão um grupo de controles-positivos obtidos por diluição de um extrato de células liofilizadas fornecido pelo kit, de rim humano imortalizado, com expressão da telomerase positiva, sob as diluições de 1, 10, 100, 1000, 2000 e 5000 células por reação. Além desses controles positivos, foram utilizadas também diluições dessas células e extratos de amostras positiva previamente testadas como controles negativos e inativadas por calor (10 minutos a 75 ° C) para desnaturar a enzima telomerase ativa nesses extratos.

## **Deteção da atividade da telomerase por método imunoenzimático (ELISA)**

### **Hibridação e ELISA – Método**

Em um tubo de *eppendorf* foram adicionados 20 µl de reagente desnaturação (hidróxido de sódio <0,5%) a 5 µl do produto de amplificação e

deixou-se incubando durante 10 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 225 µl de tampão de hibridação (solução contendo um probe de detecção marcado com DIG complementar à seqüência de repetição telomérica) a cada tubo e misturou-se brevemente por agitação. Foram transferidos 100 µl da mistura em cada poço da placa de ELISA, sendo os poços cobertos a seguir com o adesivo, para evitar evaporação e a placa foi incubada a 37°C em um agitador a 300 rpm durante 2 horas. Posteriormente, a solução de hibridação foi removida cuidadosamente com um aspirador e depois lavada 3 vezes com 250 µl cada vez com tampão de lavagem por poço deixando agir durante 30 segundos antes de ser removidos cuidadosamente. Foram adicionadas 100 µl de solução anti Digoxigenina-Peroxidase por poço, a placa foi coberta com o adesivo e foi incubado à temperatura ambiente durante 30 minutos num agitador a 300 rpm. A solução foi removida completamente e foi lavada 5 vezes com 250 µl de tampão de lavagem por poço deixando o tampão agir no mínimo 30 segundos. O tampão foi retirado completamente e foi adicionado a cada poço 100 µl de substrato de tetrametil-benzina à temperatura ambiente entre 18 e 22°C. A placa foi coberta novamente com o adesivo e ficou incubado à temperatura ambiente durante 20 minutos no agitador a 300 rpm. Cem µl de reagente finalizador (ácido sulfúrico a 5%) foram adicionados sem que fosse removido o substrato para interromper o processo de revelação. Dentro de um prazo de 30 minutos após o último procedimento, foi medida a absorvância das amostras num leitor de placa Elisa a 450 nm com comprimento de onda referencial de 690 nm.

Considerou-se a amostra telomerase positiva quando apresentou medidas de absorvância maior que 0,2  $A_{450\text{ nm}} - A_{690\text{ nm}}$  unidades, isto é, medida a 450 nm com comprimento de onda referencial de 690 nm, conforme a orientação do kit.

## **2.2. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA**

### **2.3.1. PREPARO DO GEL**

O gel foi preparado com 49,5 ml de poliacrilamida a 12,5% em 0,5xTBE, 0,5 ml de persulfato de amônio a 10% e 0,05 ml de TEMED. Montou-se com 2 vidros limpos, com álcool, e pentes o local para moldar o gel que foi despejado cuidadosamente entre os vidros até completar todo o espaço. Logo a seguir colocou-se o pente e deixou-se cerca de 1 hora para solidificação.

### **2.3.2. ELETROFORESE E COLORAÇÃO DO GEL**

Posicionou-se a placa na cuba vertical e preencheu-se com tampão de corrida (0,5xTBE), após retirar os pentes superior e inferior.

Num parafilme, colocou-se 5 µl de loading dye e misturou-se 20 µl do produto amplificado e colocou-se no poço do gel.

Correu durante 2 horas e 30 minutos a 160 volts.

Utilizou-se o método de coloração por prata descrito por PINHEIRO e colaboradores (1999). Retirado o gel da cuba, mergulhou-se o mesmo num recipiente com solução fixador durante 15 minutos, movimentando continuamente o recipiente, acrescentou-se à solução o nitrato de prata e deixou-se mais 10 minutos mantendo a movimentação do recipiente, escoou-se a solução, lavou-se duas vezes com água milli-Q. Adicionou-se a solução reveladora, ainda movimentando continuamente o recipiente, durante mais 10 minutos.

Lavou-se novamente com solução fixadora inicial.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores da atividade da telomerase obtidos foram submetidos à análise descritiva utilizando-se a mediana, postos percentis e distribuição da atividade da telomerase em Boxplots. Foram utilizados os testes estatísticos de Kruskal-Wallis para comparar os quatro grupos (melanoma, pele adjacente ao tumor, lesão melanocítica benigna e pele controle); de Mann Whitney para comparação entre cada dois desses grupos. O teste de Wilcoxon foi utilizado nas amostras de melanoma correlacionada à pele adjacente ao tumor do mesmo paciente. Utilizou-se também o teste do Qui-quadrado e sua extensão, o teste exato de Fisher. Avaliou-se o Coeficiente de correlação de Spearman ( $\rho$ ).

Para variável dependente contínua utilizou-se a regressão linear múltipla. Para variável dependente dicotômica, telomerase positiva ou negativa, utilizou-se o método da regressão logística.

## RESULTADOS

### Análise descritiva

No total de 110 amostras estudadas, 30 foram de melanoma, 24 de pele adjacente, 30 de lesão melanocítica benigna, e 26 de pele controle. Desses, houve pareamento, quanto à faixa etária, tipo de pele e sexo, entre melanoma e respectiva pele adjacente em 23 vezes e entre os 4 grupos em 20 vezes.

Em relação aos 30 melanomas, 20 (66,6%) amostras foram colhidas de paciente do sexo feminino e 10 (33,3 %) do sexo masculino. Quanto ao fototipo, 12 (40%) foram colhidas de paciente do tipo II, 14 (46,7%) do tipo III, 1 (3,3%) do tipo IV, 2 (6,7%) do tipo V e 1 (3,3%) do tipo VI. Quanto à localização, 4 (13,3%) eram da cabeça e pescoço, 12 (40%) do tronco, 3 (10%) dos membros superiores e 11 (36,7%) dos membros inferiores (Fig. 2). Quanto ao tipo histológico, 10 (38,4%) eram disseminativo superficial, 9 (34,6%) nodular, 6 (23%) acral lentiginoso, 1 (3,8%). Quatro (15,2%) melanomas eram “in situ” (Fig...). O nível de Clark foi I em 4 (13,3%) dos melanomas, II em 2 (6,6%), III em 11 (36,6%), IV em 4 (13,3%), V em 9 (30%). Onze melanomas (40,7%) apresentavam ulceração, 5 (18,5%) satelitose, 9 (33,3%) regressão, o infiltrado linfocitário foi escasso em 17 melanomas (65,38%) e intenso em 9 (34,62%); 13 (50%) apresentaram índice mitótico menor de 5 mitoses por 10 campos de maior aumento e 13 (50%) acima de 5 mitoses em 10 campos. Quanto à espessura de Breslow, 10 (33,3%) foram menores de 0,76 mm, 4 (13,3%) entre 0,76 e 1,5 mm, 4 (13,3%) de 1,5 a 4,0 mm e 12 (40%) maiores de 4,0 mm. Quatorze melanomas (46,7%) originaram de um nevo sendo 11 desses, congênito. O tamanho da lesão variou de 1 cm de diâmetro até 10 cm x 9 cm. Quanto ao estadiamento, 4 (13,3%) pacientes apresentaram melanoma “in situ” , 10

(33,3%) eram do estágio I, 5 (16,7%) do estágio II, 9 (30%) do estágio III, 2 (6,7%) do estágio IV.

A atividade da telomerase foi positiva em 20 amostras (66,6%) e negativa em 10 (33,3%). Quanto às amostras de pele adjacente, vinte e quatro tiveram a atividade da telomerase medida, sendo positiva em 2 delas (8,3%) e negativa em 22 (91,7%). Das 30 lesões melanocíticas estudadas

Nevo intradérmico foi o diagnóstico de 21 pacientes, composto de 5 pacientes, juncional atípico em um paciente, nevo displásico também em um paciente e lentigo simples novamente em um paciente. A atividade da telomerase foi positiva em 7 amostras (23,3%).

Foram colhidas 26 amostras de pele controle sendo de 21 pacientes do sexo feminino e 5 pacientes do sexo masculino. A maioria dessas amostras foi colhida da região do tronco (17 amostras, 65,4%), 5 (19,2%) amostras foram colhidas da região da cabeça e pescoço e 4 (15,4%) da região dos membros inferiores. A atividade da telomerase foi positiva em 2 amostras (7,7%).

A mediana da idade foi 58 anos, variando de 21 a 86 anos. A atividade da telomerase nas 110 amostras variou de  $-0,002$  a  $2,426$  com mediana de  $0,058$ .

A mediana da espessura de Breslow foi de  $1,8$  mm com variação de  $0$  a  $22$  mm; do nível de Clark foi III, do índice mitótico foi 4 mitoses em 10 campos, variando de  $0$  a  $50$ . O tempo de existência do tumor variou de  $2$  a  $72$  meses com mediana de  $12$  meses. A área do melanoma variou de  $1\text{cm}^2$  a  $90\text{cm}^2$  com mediana de  $6,28$ .

A atividade da telomerase no melanoma variou de  $0,019$  a  $2,426$  com mediana de  $0,291$ ; na pele adjacente ao tumor houve variação de  $0,003$  a  $0,402$  com mediana de  $0,025$ ; no grupo das lesões melanocíticas benignas variou de  $0,004$  a  $0,686$  com mediana de  $0,074$  e na pele controle variou de  $0$  a  $0,470$  com mediana de  $0,027$ .

## Análise estatística

A- Testes não paramétricos – atividade da telomerase maior ou igual a 0,2 = positiva

### 1. Teste de Mann-Whitney

Aplicou-se o teste de Mann-Whitney comparando a atividade da telomerase entre melanoma e pele adjacente, melanoma e nevo, melanoma e pele controle os resultados nos três casos foi estatisticamente significativa com o  $P < 0,001$ . Entre o nevo e pele adjacente, o resultado da diferença da atividade da telomerase também foi estatisticamente significativa com o  $P = 0,004$ , assim como entre o nevo e pele controle a diferença foi estatisticamente significativa com  $P = 0,002$ . Não foi estatisticamente significativa a comparação entre as atividades da telomerase da pele adjacente com a pele controle  $P = 0,869$ .

Foi comparada a atividade da telomerase com presença ou ausência de regressão no melanoma, obtendo um resultado estatisticamente não significativo. Também não foi estatisticamente significativa a associação entre atividade da telomerase com a origem a partir de nevo ( $P = 0,205$ ) e com infiltrado linfocitário ( $P = 0,248$ ). Entretanto a correlação entre a atividade da telomerase e índice mitótico foi estatisticamente significativa ( $P = 0,029$ ).

### 2. Teste de Kruskal-Wallis

A atividade da telomerase também mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos com o teste de Kruskal-Wallis ( fig. .... – Box-plot da pag. 20).

Quando se comparou a atividade da telomerase com os tipos histológicos não foi estatisticamente significativa. Assim como não foram estatisticamente significantes os resultados obtidos na correlação entre a atividade da telomerase

com o nível de Clark ( $P = 0,617$ ), com o estadiamento ( $P = 0,383$ ), com a espessura de Breslow ( $P = 0,177$ ), com o fototipo ( $P = 0,310$ ).

### 3. Teste de Wilcoxon

Foi realizado esse teste porque amostras de melanoma e pele adjacente foram retiradas da mesma pessoa em 23 pacientes. O resultado foi o mesmo encontrado no teste de Mann-Whitney aplicado para amostras independentes. Sendo estatisticamente significativa com  $P < 0,001$ .

### 4. Teste do Qui-quadrado

A correlação entre os grupos também mostrou-se estatisticamente significativa com  $P, 0,001$ .

A comparação da atividade da telomerase do nível de Clark ( $P=0,583$ ), ulceração ( $P=0,692$ ), satelitose ( $P=0,295$ ), regressão ( $P=1,0$ ), infiltrado linfocitário ( $0,406$ ), espessura de Breslow ( $P=0,490$ ), índice mitótico ( $P=0,420$ ) e fototipo, ( $0,321$ ) com a do melanoma, o resultado não foi estatisticamente significativa. A comparação entre atividade da telomerase e origem no nevo não foi estatisticamente significativa com  $P = 0,122$ , porém, houve um resultado até significativo de atividade da telomerase positiva em 81,3% do grupo que não se originou de um nevo para 50% de positividade no grupo que originou do nevo.

### 5. Coeficiente de correlação de Spearman ( $\rho$ )

Não há correlação estatisticamente significativa entre a idade e atividade da telomerase na amostra total ( $P=0,522$ ), nem no grupo do melanoma ( $P=0,481$ ), nem no grupo da pele adjacente ( $P=0,759$ ), nem no grupo do nevo ( $P=0,577$ ), nem no grupo da pele controle ( $P=0,748$ ).

A correlação foi satisfatória entre índice mitótico e a atividade da telomerase com rho de 40,1% e  $P = 0,038$ ; entre índice mitótico e espessura de Breslow apresentou ótima correlação com rho = 81,4% e  $P < 0,001$ . A correlação entre o índice mitótico e nível de Clark foi estatisticamente significativa com  $P = 0,001$  e rho de 59,9%. A correlação entre nível de Clark e espessura de Breslow foi de rho = 90,5% com  $P < 0,001$ . A correlação entre a espessura de Breslow e o estadiamento foi bastante alta com rho = 89,3% e com  $P < 0,001$ ; entre estadiamento e nível de Clark, o rho foi de 84,7% com  $P < 0,001$ ; entre estadiamento e índice mitótico o rho foi de 71,9% e  $P < 0,001$ . A correlação entre a espessura de Breslow e a área do tumor foi satisfatória com rho = 50,3% e  $P = 0,005$ . A correlação entre o estadiamento e tempo de existência foi estatisticamente significativa com  $P = 0,021$  e rho = 42% mostrando que quanto maior o estadiamento, menor o tempo de existência do tumor. A correlação entre a área do tumor e o nível de Clark apresentou rho de 46,1% e  $P = 0,01$ ; entre a área do tumor e a espessura de Breslow apresentou rho de 50,3% e  $P = 0,005$ ; entre a área do tumor e o estadiamento o P foi de 0,042 e rho foi 37,4%.

Não houve correlação estatisticamente significativa entre a idade e atividade da telomerase no grupo do sexo feminino ( $P=0,291$ ) nem no grupo do sexo masculino ( $P=0,470$ ).

- nas páginas 50, 51 e 52 – Box-plot da ulceração, Breslow, índice mitótico.

#### REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA

Demonstrou que o valor da atividade da telomerase aumenta conforme aumenta a espessura de Breslow e o infiltrado linfocitário, na presença de ulceração, e diminui com a presença da satelitose, com o aumento da área do tumor, e quanto menor o fototipo na classificação.

Poderia aplicar uma fórmula:  $0,0809 \times \text{Breslow} + 0,699 \times \text{ulceração} - 1,285 \times \text{satelitose} + 0,565 \times \text{infiltrado} - 0,0113 \times \text{área} - 0,588 \text{ fototipo} + 0,728$ .

## DISCUSSÃO

### A- Amostras e sua coleta

Para que não trouxesse prejuízo no diagnóstico do paciente, foram colhidas amostras apenas de lesões maiores em extensão ou que fossem nodulares, motivo pelo qual a presente casuística apresenta número maior de lesões nodulares e com melanoma mais avançado onde se encontrava material abundante. As lesões de espessura fina que foram colhidas, foram aquelas que já havia diagnóstico prévio de melanoma através de uma biópsia incisional ou a lesão, apesar de fina, tinha uma extensão que poderíamos retirar um fragmento de cerca de 2 a 3 mm o que corresponderia a menos de 10% da lesão, nunca utilizando a metade da lesão como fez RUDOLPH et al. (2000), tentando não prejudicar o exame anátomo patológico, preservando o máximo de lesão. As amostras compreendiam de tecido da lesão, procurando não incluir pele normal, fazendo-se uma excisão superficial tipo “*shaving*” nas lesões finas. Esse cuidado na coleta da amostra deveu-se ao pensamento de que se fosse retirada com aparelho tipo “*punch*” poderia obter amostra mais homogênea no que se refere ao tamanho, mas a amostra conteria quantidades diferentes de tecido do tumor misturadas com a derme subjacente, sendo que as lesões mais superficiais estariam acompanhadas de maior quantidade de tecido da derme normal, obtendo material não comparável. Mesmo nas lesões melanocíticas benignas, nunca foi retirada, para o trabalho, quantidades que chegasse a metade da lesão, foram retiradas lesões melanocíticas com características clínicas benignas, na grande maioria nevos intradérmico ou composto que tivessem dimensões maiores que 6 mm, retirando em torno de 20 % da lesão para a amostra. Todas as amostras foram imediatamente congeladas e armazenadas no nitrogênio líquido para que não houvesse degradação da enzima a ser estudada pelas

RNAses. Todas as amostras foram colhidas pelo pesquisador, não havendo variação no método.

O diagnóstico e indicação de excisão de nevo em pacientes idosos, maiores que 70 anos foi extremamente difícil, pois nessa idade é menos freqüente que se encontre nevos com indicação cirúrgica, e quando isso acontecia, o paciente idoso recusava-se, muitas vezes, a retirar, já que não era câncer e que estava com a lesão durante tantos anos. Paciente idoso do sexo masculino apresentou maior resistência à cirurgia. Apenas consentia se fosse neoplasia maligna e mesmo assim, após muita explicação. Paciente do sexo feminino mostrou maior colaboração e demonstrou, muitas vezes, satisfação de se estar retirando alguma lesão pelo benefício estético que era proporcionado. Infelizmente, na casuística do presente trabalho tivemos muitos pacientes com idade avançada e com melanoma cutâneo em fase avançada. Talvez o medo e/ou transtorno para procurar um médico ou serviço médico, a dificuldade financeira e o desconhecimento tanto a respeito da doença quanto das possibilidades terapêuticas fizeram com que escondesse a lesão de seus familiares retardando mais ainda o diagnóstico. Inicialmente, o trabalho seria apenas com 20 amostras de melanoma pareadas conforme idade sexo e tipo de pele, mas com essa dificuldade de parear pela idade, continuou-se a colher mais amostras, até que conseguisse parear 20 delas. Apesar de ter colhido a pele adjacente de todos os melanomas, foram encontradas dificuldades iniciais no processamento da amostra congelada quando se foi realizar o extrato celular. A pele, diferente do tumor, talvez por ser elástica, não se desfaz com facilidade quando esmagada e alguns extratos ficaram com muita pouca proteína, impossibilitando o uso para o experimento. As amostras posteriores foram processadas no tampão de lise cortando-as o máximo que desse com tesoura esterilizada ou lâmina de bisturi para se conseguir extrair a proteína. Esses fatos fizeram que o pareamento

inicialmente feito fosse desfeito, explicando a irregularidade no tamanho de cada grupo.

## B- Escolha do kit

A maioria dos autores mediu o valor relativo da atividade da telomerase através do ensaio TRAP descrito por KIM et al. (1994) modificado, ITAS, amplificação por PCR radioativo, analisado através da leitura do gel com um PhosphorImager. Apenas dois autores, BOSSERHOFF et al. (1997) e GLAESSL et al. (1999), utilizaram o kit telomerase PCR Elisa da Böehringer-Mannheim escolhido para o presente trabalho, pela maior sensibilidade sem a necessidade de utilizar radioisótopos além da facilidade, por estar todos os componentes necessários contidos no kit, diminuindo possíveis erros durante a preparação dos reagentes. Comparando-se ao protocolo TRAP (telomerase repeat amplification protocol) convencional que necessita amplificação PCR radioativo para detectar pequenas quantidades da atividade, esse kit possibilita medidas semiquantitativas da atividade da enzima através da leitura pelo ELISA após amplificação PCR tão sensível quanto os métodos radioativos, como demonstrou BOSSERHOFF et al. (1997) e GLAESSL et al. (1999) que compararam os métodos utilizando produtos de PCR de suas amostras para a quantificação pelo método radioativo. Outros autores como Hoos et al. (1998) e Müller et al. (1996) já haviam testado o sistema TRAP- ELISA de forma comparativa com resultados de sensibilidade similares em outros tipos de tumores.

## C- Atividade da enzima telomerase

Cada vez mais, encontram-se trabalhos demonstrando que a enzima telomerase possa desempenhar um papel importante no processo de proliferação, senescência e morte celular (HAYFLICK, 1976; GREIDER & BLACKBURN, 1996; BELAIR et al, 1997; LEVY et al, 1992; HOLT, WRIGHT, SHAY, 1997). A atividade da mesma foi determinada em linhagens celulares imortalizadas e em muitos cânceres humanos. Porém, a biologia e o processo de diferenciação do melanócito para o tumor ainda não foi completamente elucidado. Um passo importante para a transformação maligna é a imortalidade, sendo que um dos passos desse processo pode ser a reativação da atividade da telomerase (MORIN, 1989; COUNTER et al., 1994; RHYU, 1995; WEITZMAN & YANIV, 1999). No presente trabalho investigou e comparou os níveis da atividade dessa ribonucleoproteína, a telomerase, em 30 amostras de melanoma cutâneo primário, 24 de pele adjacente ao melanoma, 30 lesões melanocíticas benignas e 26 de pele controle de área pouco exposta ao sol de paciente não portador de melanoma. Devido a presença da atividade proliferativa na pele normal, achou-se necessário fazer um controle dos valores nas amostras de pele normal para que pudesse comparar a atividade do tumor, tanto benigno quanto maligno. Demonstrou que a mediana dos níveis da atividade da telomerase medida cresceu da pele para a lesão melanocítica benigna e em direção ao melanoma. Nesse último grupo, demonstrou a tendência do aumento da telomerase conforme aumentava sinais histopatológicos de pior prognóstico como a ulceração, regressão por exemplo.

Quando foram utilizadas todas as amostras a atividade da telomerase foi estatisticamente significativa entre o grupo de melanoma e pele adjacente, melanoma e lesão melanocítica benigna, melanoma e pele controle ( $p < 0,001$ ); entre lesão melanocítica benigna e pele adjacente e também com pele controle foram igualmente significantes ( $p = 0,004$  e  $p = 0,002$  respectivamente); somente não houve diferença entre o grupo de pele adjacente com o da pele controle ( $p = 0,869$ ). Porém, quando se aplicou o teste estatístico nos grupos pareados segundo faixa etária, tipo de pele e sexo, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de lesão melanocítica benigna e os grupos de peles, isto provavelmente se deveu ao fato de ter incluído no pareamento somente nevo

comum, não computando nevos com atipia ou nevo displásico que se encontravam no grupo não pareado. Esse resultado corrobora com a hipótese de que haveria um aumento progressivo nos valores da telomerase com a presença de atipia como já demonstrara GLAESSL et al. (1999) 80% de positividade da enzima em 5 nevos melanocíticos atípicos testados.

Os valores da atividade medida na pele adjacente sempre foram menores comparadas com os obtidos dos melanomas correspondentes, mesmo que esse último apresentasse valores baixos; demonstrando a maior atividade da enzima no tumor em relação ao tecido vizinho.

A média dos valores obtidos da atividade da telomerase segundo o tipo histológico foram maiores nas lesões de piores prognóstico como a do nodular (0,714) e a do acral lentiginoso (0,881) e menores nas de melhor prognóstico como a do melanoma “in situ” (0,404) e lentigo maligno melanoma (0,206) embora esse último valor seja questionável por ser uma única amostra. Observou-se também a mesma tendência quando se comparou a média dos valores relativos da atividade da telomerase nas diferentes espessuras de Breslow, onde a espessura era menor que 0,76 mm a média foi de 0,213 e para maiores de 4 mm o valor aumentou quase cinco vezes (1,060), a diferença e a tendência decrescente nos valores da média, embora bastante próximos, no grupo de 0,76 a 1,5 mm e 1,51 a 4,0 mm pode, talvez, ser justificada pelo reduzido número de amostras nos mesmos. Quando se comparou a média dos valores da atividade nos diferentes níveis de Clark observou-se aumento progressivo dos valores do nível III a V, apresentando valores mais altos de média nos níveis I e II em relação ao nível III.

A positividade de 66,6% na atividade da telomerase nas amostras de melanoma obtida no presente estudo foi menor em relação à obtida por TAYLOR et al. (1996) que demonstraram 86%, UEDA et al. (1997) com resultado de 80%, GLAESSL et al. (1999) que obtiveram 90,3% de positividade,

WU et al. (1999) que encontraram 83,3%. O presente resultado foi equivalente aos trabalhos de BOSSERHOFF et al. (1997) de 64% para melanoma primário; PARRIS et al. (1999) que encontrou 69% de positividade entre melanomas metastáticos e primário, não discriminando os grupos. No presente estudo, encontramos também atividade da telomerase em leitura da medida da absorbância em todas as amostras e obedecendo aos critérios estabelecidos pelo kit considerou-se atividade positiva para valores da absorbância maiores que 0,2 que correspondeu no controle a mais de 100 células positivas para atividade dessa enzima; como TOSI et al. (2000) não classificaram os resultados em atividade da enzima positiva e negativa e sim fizeram a média dos valores referindo que encontraram atividade presente em todas as amostras, ficou-se a dúvida se os autores consideraram todos os valores obtidos mesmo extremamente baixos.

TAYLOR et al. (1996) estudaram os valores da atividade da telomerase na pele adjacente ao tumor de pele não discriminando o tipo, utilizando pele adjacente tanto de carcinomas basocelular e espinocelular quanto de melanoma encontrando atividade positiva em 38 amostras em 57 (67%) com média do valor relativo da atividade da telomerase de 9,22. Na pele com alteração solar o valor da média foi de 11,16 enquanto que na pele protegida do sol foi de 0,29. Na casuística presente a média da atividade da telomerase relativa na pele adjacente ao melanoma primário foi de 0,067; na pele protegida foi de 0,061, valores esses não comparáveis por serem quantitativos relativos. A positividade da atividade da telomerase obtidos por BOSSERHOFF et al. para pele normal de 10% (1/10); nevos melanocíticos de 29,4%(5/17), comparados a porcentagem demonstrada nesse trabalho de 7,7% (2/26) e 23,3% (7/30) respectivamente foram equiparáveis assim como os resultados da positividade nas amostras de melanoma primário.

RAMIREZ et al. (1999) não descreveram a porcentagem de positividade mas sim a média dos valores da atividade da telomerase medida com seu desvio padrão. Os autores conseguiram valores relativos da média a atividade da telomerase nos melanomas de nível de Clark II de 0,02; Clark III de 1,1 com desvio padrão de 1; Clark IV de 1,9; comparados com a média dos valores relativos da atividade da enzima telomerase verificados no presente trabalho de 0,405 para nível de Clark I; 0,414 para o nível II; 0,364 para o nível III; 0,446 para IV e 1,173 para nível V; demonstrando também uma progressão nos valores obtidos do nível de Clark III em direção ao V. Quanto à espessura de Breslow a média da atividade da telomerase dos melanomas com espessura menores que 0,76 mm foi de 1,2; espessura entre 0,76 e 1,69 mm o valor foi de 2,4; entre 1,7 e 3,6 mm foi de 1,7 e maior que 3,6 mm 2,5 medido em apenas um caso. Comparados aos resultados aqui obtidos de valores da atividade relativa da telomerase de 0,213 para melanomas com espessura menores que 0,76 mm; 0,548 para espessura entre 0,76 e 1,69; 0,182 em apenas 3 amostras de melanoma com espessura entre 0,7 e 3,6 mm; 1,051 para melanomas mais espessos que 3,6 mm. Nos dois casos houve progressão nos valores relativos da enzima telomerase com o aumento da espessura de Breslow, tendo ocorrido nos dois casos uma diminuição do valor no grupo entre 1,7 e 3,6 mm, mesmo tendo números pequenos nos grupos estudados, esses dados coincidiram. Tanto os resultados de RAMIREZ et al (1999) quanto os desse estudo coincidiram no resultado da significância entre os níveis da atividade da telomerase com o índice mitótico alto e baixo com valor do  $P = 0,3$  dos autores e valor de  $P = 0,38$  obtido nesse estudo onde também demonstrou uma correlação satisfatória com  $\rho = 40,1\%$ . Quanto aos nevos melanocíticos benignos, os autores apresentam como média da atividade da telomerase relativa o valor de 0,7 que é um valor que estaria um pouco abaixo do obtido no grupo com melanoma Clark III. No valor aqui demonstrado de 0,141, como média da atividade da telomerase

relativa no grupo dos nevos melanocíticos benignos, também foi um valor abaixo da obtida no grupo de melanoma com nível III de Clark, tendo sido também nos dois casos valores menores do que aqueles obtidos no grupo de melanoma com espessura menor que 0,76 mm. Porém ficou muito difícil comparar valores relativos pois cada experimento dará um padrão.

RUDOLPH et al. transformaram os valores obtidos na leitura obtida por ITAS em equivalente de células com atividade positiva conforme o controle positivo realizado com células com telomerase positiva da linhagem L428. Dessa forma obtiveram no melanoma atividade da telomerase positiva que variou de 10 até mais de 5000 CE (equivalente celular), com a média de 885 CE; no nevo displásico a média foi de 70 CE (15 - 750 CE); no nevo comum, a média foi de 57,5 CE (10 - 350 CE) e na pele a média foi de 20 CE (5 - 50 CE). Comparando esses resultados com os obtidos no presente estudo que mostrou a média de equivalente em células positivas nas amostras de melanoma foi de 640 CE (de 11 até mais de 5000 CE); nas de nevo comum, a média foi de 60 CE (3 - 720 CE); e nas de pele controle a média foi de 40 CE (3 - 400 CE), demonstrando valores aproximados e também a progressão da média dos valores caminhando da pele normal até o melanoma. Não foram computados os resultados de nevos displásicos nesse estudo por apresentar apenas duas amostras delas, não sendo amostras significativas.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam a associação do crescente aumento do valor da atividade da pele normal para a pele adjacente, para os nevos e os maiores valores para o melanoma, podendo sugerir uma possível correlação com a progressão do tumor maligno, tendo ainda poucos trabalhos demonstrando análise comparativa (GLASSL, et al. 1999, RAMIREZ, et. al. 1999, RUDOLPH et al, 2000), sendo que BOSSERHOFF et al, 1997, apesar de ter demonstrado resultados semelhantes, apenas descreveu sobre a validade do método Telomerase PCR ELISA. Todos eles ainda contendo pouca

amostra quando se subdivide em grupos dos níveis de Clark ou nas diferentes espessuras de Breslow. Os valores obtidos no grupo do melanoma mostra uma tendência ao aumento nos valores da atividade da enzima conforme aumenta a espessura de Breslow, a ulceração está presente e o infiltrado linfocitário está intenso; diminuindo os valores com o aumento da satelitose, quanto mais sensível à queimadura é a pele do paciente, e quanto mais extenso a superfície da lesão. Poderia se esperar aumento da atividade da telomerase nas amostras de pele adjacente ao melanoma que apresentasse satelitose, pela presença de células de melanoma contida na pele ao redor da lesão primária, mas não se constatou esse aumento nessa casuística.

Talvez com estudos correlacionando com mais aspectos anátomo-patológicos de prognóstico e melhor compreensão da carcinogênese, associados a novos e mais eficientes ensaios, consiga no futuro demonstrar valor da enzima como marcador importante para o prognóstico e/ou o tratamento dos melanomas. Seria muito útil visto que esse ensaio exige pouco material para avaliação, podendo até detectar níveis da atividade enzimática nas amostras colhidas nas biópsias com agulha (POREMBA et al., 1999) que é menos invasiva, é relativamente de rápida execução e alta sensibilidade, podendo detectar a ativação nas lesões mais precoces, embora ainda seja de alto custo, conforme aumente a demanda do ensaio, tenderá a diminuir com o tempo.

## CONCLUSÕES

- a) A correlação entre as atividades da telomerase entre melanoma e pele adjacente, melanoma e nevo, melanoma e pele controle, nevo e pele adjacente e nevo e pele controle mostrou diferença estatisticamente significativa, não sendo apenas entre os grupos das peles adjacentes e controle quando todas as amostras foram incluídas.
- b) Quando se comparou amostra pareada conforme sexo, faixa etária e tipo de pele, a diferença foi estatisticamente significativa apenas entre grupos de melanoma e nevo, melanoma e pele adjacente, melanoma e pele controle.
- c) Houve aumento na positividade da atividade enzimática de forma crescente da pele controle, pele adjacente, nevo até o melanoma primário.
- d) Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tipos de melanomas, nem entre os diferentes níveis de Clark ou entre as diferentes espessuras de Breslow.
- e) A correlação foi satisfatória entre o índice mitótico e a atividade da telomerase com o coeficiente de correlação de Spearman ( $\rho$ ) de 40,1%.
- f) O valor da atividade da telomerase aumenta conforme aumenta a espessura de Breslow e o infiltrado linfocitário, com a presença de ulceração; diminui com a presença da satelitose, aumento da área da superfície do tumor e menor o tipo da pele na classificação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; DENNIS, B.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. O núcleo da célula. In: \_\_\_\_\_ - **Biologia molecular da célula**. 3.ed. Porto Alegre, Artes Médicas, 1997. p.335-99.
- AUSTRALIAN CANCER NETWORK – **Guidelines for the management of cutaneous melanoma**. Australia, ACN publication nº 3, 1997. 83p. (according to the standardas set in the National Health and Medical Research document)
- AVILION, A. A.; PIATYSZEK, M. A.; GUPTA, J.; SHAY, J. W.; BACCHETTI, S.; GREIDER, C. W. - Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. **Cancer Res.**, **56**:645-50, 1996.
- BARNHILL, R. L. & MIHM, Jr., M. C. – Histopathology and precursor lesions. In: BALCH, C. M.; HOUGHTON, A. N.; SOBER, A. J.; SOONG, S. –**Cutaneous Melanoma**. 3.ed.USA, Quality Medical Publishing, Inc., 1998. p.103-33.
- BEDNAREK, A.; BUDUNOVA, I.; SLAGA, T. J.; ALDAZ, C. M. - Increased telomerase activity in mouse skin premalignant progression. **Cancer Res.**, **55**:4566-9, 1995.
- BELAIR, C. D.; YEAGER, T. R.; LOPEZ, P. M.; REZNIKOFF, C. A. - Telomerase activity: a biomarker of cell proliferation, not malignant transformation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **94**:13677-82, 1997.
- BLACKBURN, E. H. & SZOSTAK, J. W. - The molecular structure of centromeres and telomeres. **Am. Rev. Biochem.**, **53**:163-94, 1984.
- BOSSERHOFF, A. K.; GLÄBL, A.; STOLZ, W.; BUETTNER, R. - Detection of telomerase activity in skin, melanocytic nevi, and melanoma by telomerase PCR Elisa. **Biochemica**, **3**:16-8, 1997.
- BURGER, A. M.; BIBBY, M. C.; DOUBLE, J. A. - Telomerase activity in normal and malignant mammalian tissues: feasibility of telomerase as a target for cancer chemotherapy. **Br. J. Cancer**, **75**(4):516-22, 1997.

- CHENG, A. J.; LIAO, S. K.; CHOW, S. E.; CHEN, J. K.; WANG, T. C. V. - Differential Inhibition of telomerase activity during induction of differentiation in hematopoietic, melanoma, and glioma cells in culture. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **237**:438-44, 1997.
- COUNTER, C. M.; HIERTE, H. W.; BACCHETTI, S.; HARLEY, C. B. - Telomerase activity in human ovarian carcinoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **91**:2900-4, 1994.
- DORR, V. J.; WILLIAMSON, S. K.; STEPHENS, R. L. - An evaluation of prostate-specific antigen as a screening test for prostate cancer. **Arch. Intern. Med.**, **153**:2529-37, 1993.
- ENGLAND, N. L.; CUTHBERT, A. P.; TROTT, D. A.; JEZZARD, S.; NOBORI, T.; CARSON, D. A.; NEWBOLD, R. F. - Identification of human suppressor genes by monochromosome transfer: rapid growth-arrest response mapped to 9q21 is mediated solely by the cyclin-D-dependent kinase inhibitor gene, CDKN2A (P16<sup>INK4A</sup>). **Carcinogenesis**, **17**(8):1567-75, 1996.
- FARAONI, I.; GRAZIANI, G.; TURRIZIANI, M.; MASCI, G.; MEZZETTI, M.; TESTORI, A.; VERONESI, U.; BONMASSAR, E. - Suppression of telomerase activity as an indicator of drug-induced cytotoxicity against cancer cells: In vitro studies with fresh human tumor samples. **Lab. Invest.**, **79**(8):993-1005, 1999.
- FRANZESE, O.; COMANDINI, A.; CANNAVO, E.; PEPPONI, R.; FALCINELLI, S.; GRAZIANI, G.; BONMASSAR, E. - Effect of prostaglandin A1 on proliferation and telomerase activity of human melanoma cells *in vitro*. **Melanoma Res.**, **8**(4):323-8, 1998.
- GLAESSL, A.; BOSSERHOFF, A. K.; BUETTNER, R.; HOHENLEUTNER, U.; LANDTHALER, M.; STOLZ, W. - Increase in telomerase activity during progression of melanocytic cells from melanocytic naevi to malignant melanomas". **Arch. Dermatol. Res.**, **291**:81-7, 1999.
- GLUKHOV, A. I.; ZIMNIK, O. V.; GORDEEV, S. A.; SEVERIN, S. E. - Inhibition of telomerase activity of melanoma cells *in vitro* by antisense oligonucleotides". **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **248**:368-71, 1998.

- GLOSTER, Jr, H. M. & BRODLAND, D.G. - The epidemiology of skin cancer. **Dermatol. Surg.**, **22**:217-26, 1996.
- GREIDER, C. W. & BLACKBURN, E. H. - Telomeres, telomerase and cancer. **Sci. Am.**, **274**(2):80-5, 1996.
- GRIN-JORGENSEN, C. M.; RIGEL, D. S.; FRIEDMAN, R. J. – The worldwide Incidence of Malignant Melanoma. In: BALCH, C. M.; HOUGHTON, A. N.; MILTON, G. W.; SOBER, A. J.; SOONG, S., 2<sup>a</sup> ed. **Cutaneous Melanoma**, J. B. Lippincott company, 1992, p.28.
- GRUIS, N. A.; WEAVER-FELDHAUS, J.; LIU, Q.; FRYE, C.; EELES, R.; ORLOW, I.; LACOMBE, L.; PONCE-CASTANEDA, V.; LIANES, P.; LATRES, E.; SKOLNICK, M.; CORDON-CARDO, C.; KAMB, A. – Genetic evidence in melanoma and bladder cancers that p16 and p53 function in separate pathways of tumor suppression. **Am. J. Pathol.**, **146**(5):1199-1206, 1995.
- HÄRLE-BACHOR, C. & BOUKAMP, P. - Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **93**:6476-81, 1996.
- HENZE, G.; DRUMMER, R.; JOLLER-JEMELKA, H. I.; BURG, G. – Serum S100 – A marker for disease monitoring in metastatic melanoma. **Dermatology**, **194**:208-12, 1997.
- HOLT, S. E.; WRIGHT, W. E.; SHAY, J. W. – Multiple pathways for the regulation of telomerase activity. **Eur. J. Cancer**, **33**(5):761-6, 1997.
- HOOS, A.; HEPP, H. H.; KAUL, S.; AHLERT, T.; BASTERT, G.; WALLWIENER, D. – Telomerase activity correlates with tumor aggressiveness and reflects therapy effect in breast cancer. **Int. J. Cancer**, **79**:8-12, 1998.
- JOHNSON, T.M.; SMITH, II, J. W.; NELSON, B. R.; CHANG, A. - Current therapy for cutaneous melanoma. **J. Am. Acad. Dermatol.**, **32**(5 pt 1):689-707, 1995.
- JONES, W. O.; HARMAN, C.R.; NG, A. K. T.; SHAW, J. H. F. –

Incidence of Malignant Melanoma in Auckland, New Zealand: highest rates in the world. **World. J. Surg.**, **23**:732-5, 1999.

KIM, N. W.; PIATYSZEK, M. A.; PROWSE, K. R.; HARLEY, C. B.; WEST, M. D.; HO, P. L. C.; COVIELLO, G. M.; WRIGHT, W. E.; WEINRICH, S. L.; SHAY, H. W. - Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science**, **266**:2011-5, 1994.

KLEINSCHMIDT-DeMASTERS, B. K.; SHROYER, A. L.; HASHIZUMI, T.L.; EVANS, L. C.; MARKHAM, N.; KINDT, G.; SHROYER, K. R. - Part I. Telomerase levels in human metastatic brain tumors show four-fold logarithmic variability but no correlation with tumor type or interval to patient demise". **J. Neurol. Sci.**, **161**:116-23, 1998.

LANG, Jr, P. G. - Malignant Melanoma. **Med. Clin. North America**, **82**(6):1325-58, 1998.

LEVY, M. Z.; ALLSOPP, R. C.; FUTCHER, A. B.; GREIDER, C. W.; HARLEY, C. B. – Telomere end-replication problem and cell aging. **J. Mol. Biol.**, **225**:951-60, 1992.

MARKS, R. An overview of skin cancers. - Incidence and causation. **Cancer**, **75**:607-12, 1995.

MARTIN, E. W.; COOPERMAN, M.; CAREY, L. C.; MINTON, J. P. - Sixty second-look procedures indicated primarily by rise in serial carcinoembryonic antigen. **J. Surg. Res.**, **28**:389-94, 1980.

MILIOTES, G.; LYMAN, G.H.; CRUSE, C. W.; PULEO, C.; ALBERTINI, J.; RAPAPORT, D.; GLASS, F.; FENSCKE, N.; SORIANO, T.; CUNY, C.; VOORHIS, N. V.; REINTGEN, D. – Evaluation of new putative tumor markers for melanoma. **Ann. Surg. Oncol.**, **3**(6):558-63, 1996.

MOKBEL, K.; PARRIS, C. N.; RADBOURNE, R.; GHILCHIK, M.; NEWBOLD, R. F. – Telomerase activity and prognosis in breast cancer. **Eur. J. Surg. Oncol.**, **25**:269-72, 1999.

MORIN, G. B. - The human telomere terminal transferase enzyme is a

ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. **Cell**, **59**:521-9, 1989.

NELSON, M. A.; THOMPSON, F. H.; EMERSON, J.; AICKIN, M.; ADAIR, L.; TRENT, J. M.; LEONG, S. P. L.; TAETLE, T. – Clinical implications of cytogenetic abnormalities in melanoma. **Surg. Clin. North America**, **76**(6):1257-71, 1996.

PARRIS, C. N.; JEZZARD, S.; SILVER, A.; MacKIE, R.; McGREGOR, J. M.; NEWBOLD, R. F. - Telomerase activity in melanoma and non-melanoma skin cancer. **Br. J. Cancer**, **79**(1):47-53, 1999.

PARRISH, J. A.; WHITE, M. B.; PATHAK, M.A. - Photomedicine. In: FITZPATRICK, T. B.; EISEN, A. Z.; WOLF, K.; FREEDBERG, I. M.; AUSTEN, K. F **Dermatology in general Medicine**, 2<sup>a</sup> ed., USA, McGraw-Hill Inc., 1979, p. 984.

POREMBA, C.; SHROYER, K. R.; FROST, M.; DIALLO, R.; FOGT, F.; SCHÄFER, K.; BÜRGER, H.; SHROYER, A.L.; DOCKHORN-DWORNICHAK, B.; BOECKER, W. – Telomerase is a highly sensitive and specific molecular marker in fine-needle aspirates of breast lesions. **J. Clin. Oncol.**, **17**:2020-6, 1999.

RAMIREZ, R. D.; D'ATRI, S.; PAGANI, E.; FARAGGIANA, T.; LACAL, P. M.; TAYLOR, R. S.; SHAY, J. W. – Progressive increase in telomerase activity from benign melanocytic conditions to malignant melanoma. **Neoplasia**,**1**(1):42-9, 1999.

RHYU, M. S. - Telomeres, telomerase, and immortality. **J. Natl. Cancer Inst.**, **87**(12):884-94,1995.

RIGEL, D. S. - Malignant Melanoma. Perspectives on incidence and its effects on awareness, diagnosis, and treatment. **CA Cancer J. Clin.**, **46**(4):195-8, 1996.

RODECK , U. & BECKER, D. - Molecular features of melanoma progression. In: KIRKWOOD, J. M., **Molecular diagnosis and treatment of melanoma**, 1st ed. Marcel Dekker, Inc., 1998, p.4-23.

RUDOLPH, P.; SCHUBERT, C.; TAMM, S.; HEIDORN, K.; HAUSCHILD, A.; MICHALSKA, I.; MAJEWSKI, S.; KRUPP, G.;

JABLONSKA, S.; PARWARESCH, R. – Telomerase activity in melanocytic lesions. A potential marker of tumor biology. **Am. J. Pathol.**,**156**:1425-32, 2000.

SHAY, J. W. & BACCHETTI, S. - A survey of telomerase activity in human cancer. **Eur. J. Cancer**, **33**(5):787-91, 1997.

SHAY, J. W. - Telomerase and Melanoma. **In: Books of Abstracts**, 1<sup>st</sup> International Symposium on Melanoma, 1998, pg.71-2.

SORIA, J. C. & RIXE, O. - Télomères, télomérase et cancer. **Bull Cancer**, **84**(10):963-70, 1997.

TAYLOR, R. S.; RAMIREZ, R. D.; OGOSHI, M.; CHAFFINS, M.; PIATYSZEK, M. A.; SHAY, J.W. - Detection of telomerase activity in malignant and nonmalignant skin conditions. **J. Invest. Dermatol.** **106**(4):759-65,1996.

TOSI, P.; MIRACCO, C.; SANTOPIETRO, R.; PACENTI, L.; PEROTTI, R.; MATERNO, M.; LUZI, P. – Possible diagnostic role of telomerase activity evaluation in the differential diagnosis between Spitz naevi and cutaneous malignant melanoma. **Br. J. Dermatol.**,**142**:1060-1, 2000. [Letter]

UEDA, M.; OUHTIT, A.; BITO, T.; NAKAZAWA, K.; LÜBBE, J.; ICHIHASHI, M.; YAMASAKI, H.; NAKAZAWA, H. - Evidence for UV-associated activation of telomerase in human skin. **Cancer Res.**, **57**(3):370-4, 1997.

VILLA, R.; FOLINI, M.; LUALDI, S.; VERONESE, S.; DAIDONE, M.G.; ZAFFARONI, N. – Inhibition of telomerase activity by a cell-penetrating peptide nucleic acid construct in human melanoma cells. **FEBS Lett.**, **473**(2):241-8, 2000a.

VILLA, R.; FOLINI, M.; PEREGO, P.; SUPINO, R.; SEIT, E.; DAIDONE, M.G.; ZUNINO, F.; ZAFFARONI, N. – Telomerase activity and telomere length in human ovarian cancer and melanoma cell lines: Correlation with sensitivity to DNA damaging agents. **Int.J. Oncol.**,**16**:995-1002. 2000b.

VOIT, C.; SCHOENGEN, A.; SCHWÜRZER, M.; WEBER, L.; MAYER,

T.; PROEBSTLE, T. M. – Detection of regional melanoma metastases by ultrasound B-scan, cytology or tyrosinase RT-PCR of fine-needle aspirates. **Br. J. Cancer**, **80**(10):1672-7, 1999.

WEITZMAN, J. B. & YANIV, M. – Rebuilding the road to cancer. **Nature**, **400**:401-2, 1999.

WOOLFSON, K. - Tumor markers in cancer of the colon and rectum. **Dis. Colon Rectum**, **34**: 506-11, 1991.

WU, A.; ICHIHASHI, M.; UEDA, M. “Correlation of the expression of human telomerase subunits with telomerase activity in normal skin and skin tumors”. **Cancer**, **86**:2038-44, 1999.

WU, K.; LUND, M.; BANG, K.; THESTRUP-PETERSEN, K. Telomerase activity and telomere length in lymphocytes from patients with cutaneous T-cell lymphoma. **Cancer**, **86**(6):1056-63, 1999.

YASHIMA, K.; PIATYSZEK, M. A.; SABOORIAN, H. M.; VIRMANI, A. K.; BROWN, D.; SHAY, J. W.; GAZDAR, A. F. - Telomerase activity and in situ telomerase RNA expression in malignant and non-malignant lymph nodes. **J. Clin. Pathol.**, **50**:110-7, 1997.

## APÊNDICE

FICHA - BANCO DE LESÕES PIGMENTADAS:

MELANOMA MALIGNO CUTÂNEO E NEVUS

Número \_\_\_\_\_

Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Número de amostras coletadas \_\_\_\_\_

Nome \_\_\_\_\_

RG (hospital) \_\_\_\_\_ Sexo: F( ) M( ) Idade \_\_\_\_\_ anos

Endereço \_\_\_\_\_ nº \_\_\_\_\_ compl. \_\_\_\_\_

Bairro \_\_\_\_\_ CEP \_\_\_\_\_

Telefone \_\_\_\_\_ Natural \_\_\_\_\_ Procedente \_\_\_\_\_

Data de Nascimento \_\_\_\_\_ Profissão \_\_\_\_\_

Cor: Branco( ) Negro( ) Amarelo( ) Mulato( )

Tempo de aparecimento do tumor \_\_\_\_\_

Classificação clínica do Melanoma \_\_\_\_\_

Localização \_\_\_\_\_

Tamanho da lesão \_\_\_\_\_

Estadiamento \_\_\_\_\_

Tratamento realizado \_\_\_\_\_

Foto da lesão - Sim( ) Não( )

**NOME DA PESQUISA:** *ATIVIDADE DA TELOMERASE NO MELANOMA MALIGNO, NEVO E PELE*

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** LUCIA MIIKO YOJO DE CARVALHO

**ORIENTADORES:** Prof. Dr. IVAN D. A. O.SANTOS  
Profa. Dra. MÔNICA VANNUCCI NUNES LIPAY

### **INFORMAÇÕES AO PACIENTE SOBRE A PESQUISA:**

#### **1- RESUMO**

Estamos realizando um estudo sobre uma enzima que parece estar relacionada com câncer de pele. Para isso, utilizaremos parte do material retirado de sua pele para a biópsia e faremos o estudo da "telomerase" que é um tipo de proteína.

Isso não acarretará nenhum risco a você, não mudará seu tratamento nem o resultado de sua cirurgia e você estará contribuindo de maneira importante no estudo do câncer de pele.

Sinta-se à vontade para fazer qualquer pergunta a respeito, pois estaremos à sua disposição para isso. Você tem total liberdade para escolher se quer ou não colaborar com esse estudo. Essa pesquisa é confidencial e os seus resultados serão mantidos em sigilo.

#### **2-JUSTIFICATIVA**

A telomerase é uma proteína (enzima ribonucleoprotéica) encontrada na maioria dos tumores malignos e quase não se encontra na grande parte dos tecidos normais. Devido a esta característica, queremos estudá-la no sentido de avaliar a possibilidade da mesma servir como um "marcador tumoral" nos casos de melanoma maligno, isto é, algo que identifica a célula maligna e diferencia da célula normal, o que ajuda no descobrimento e desenvolvimento de novos tratamentos que atingiriam apenas as células tumorais, além disso poderia servir para controle do tratamento. Existem muitas investigações a respeito da telomerase para outros tipos de tumores,

mas para melanoma ainda são poucos e por isso gostaríamos de contribuir com esse trabalho.

### 3-OBJETIVO

Essa pesquisa pretende estudar a atividade da telomerase nos melanomas malignos cutâneos comparando-a com a encontrada na pele normal e nos nevos ("pintas"), no intuito de contribuir no auxílio diagnóstico, tratamento e prognóstico do melanoma maligno.

### 4-PROCEDIMENTO

Esse estudo não acarretará prejuízo algum ao paciente, desde que iremos utilizar fragmento da peça cirúrgica que foi removida no tratamento da doença e que irá para a análise no laboratório de anatomia patológica. Nos pacientes que não possuem diagnóstico de melanoma maligno ou nevo e que irão doar fragmento de pele normal de controle, este também será removido a partir de peça cirúrgica que seria normalmente desprezada após cirurgia.

### 5-RISCOS

Não há nenhum tipo de risco ao paciente.

### 6-BENEFÍCIOS

Essa contribuição é muito importante para a pesquisa, avanço científico e melhor conhecimento do tumor, podendo, futuramente, auxiliar na cura dos pacientes portadores de melanoma maligno.

---

LUCIA MIIKO YOJO DE CARVALHO

## AUTORIZAÇÃO

Eu, \_\_\_\_\_,

RG \_\_\_\_\_, abaixo assinado, tendo recebido as informações sobre a pesquisa que visa o estudo da "Atividade da telomerase dos tecidos de melanoma maligno, nevo e pele normal", concordo em participar, concedendo o uso do fragmento da peça cirúrgica para o estudo.

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 199 .

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL

## **ANEXO 1**

### **PREPARO DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS**

#### **Coomassie blue**

Homogeneizar 0,08 g coomassie brilliant blue (Bio Rad 161-0406) com 5 ml de etanol absoluto, 10 ml de ácido ortofosfórico ( $H_3PO_4$ ) Merck e água deionizada até completar o volume de 100 ml. Misturar no escuro e deixar a temperatura ambiente durante uma noite, filtrar e conservar em temperatura ambiente.

#### **Solução de leitura da absorbância**

Adicionar a 5  $\mu$ l de extrato celular de cada amostra 95  $\mu$ l de água destilada RNase free e coomassie blue até completar o volume de 2 ml.

#### **Preparo da água Milli-Q RNase free**

Colocar num frasco com agitador 1000 ml de água Milli-Q e 100  $\mu$ l de DEPC (Sigma) e agitar durante 20 minutos. Em seguida autoclavar.

#### **40% Poliacrilamida**

Diluir 47 g de acrilamida e 3 g de bisacrilamida para 150 ml de água deionizada.

### **12,5% Poliacrilamida stock em 0,5 X TBE**

Diluir 125 ml de 40% poliacrilamida e 40 ml de 5X TBE em 235 ml de água deionizada.

### **Persulfato de Amônio 10%**

Diluir 1 g de amônio persulfato em 10 ml de água estéril. Alicotar a cada 1 ml em eppendorf.

### **Preparo do gel**

O gel foi preparado com 49,5 ml de solução de poliacrilamida a 12,5% em 0,5xTBE, 0,5 ml de persulfato de amônio a 10% e 0,05 ml de TEMED (Bio-Rad).

### **Preparo do TEB 5 X (Solução de estoque)**

Misturar, no agitador magnético, 54 g de Tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 ml de EDTA 0,5, pH 8,0 e completar com água Milli-Q até o volume final completar 1 litro. Autoclavar. Aliquotar em amostras de 300 a 500 ml e estocar à temperatura ambiente.

### **Preparo do tampão de corrida 0,5 x TEB**

Diluir 100 ml de solução de estoque TEB 5x em 900 ml de água Milli-Q.

### **Preparo do fixador**

Adiciona-se numa bureta 30 ml de álcool absoluto, 1,5 ml de ácido acético glacial a 0,5% e água Milli-Q até completar 300 ml.

### **Preparo do fixador com prata**

Aos 300 ml de fixador acima descrito adiciona-se 0,6 g de nitrato de prata dissolvido em pequena quantidade de água milli-Q.

### **Preparo do Revelador**

Dissolver 9,0 g de hidróxido de sódio (NaOH) em água milli-Q na bureta, adicionar 2 ml de formaldeído e completar com a água milli-Q até alcançar 300 ml.

## **DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA**

Fotografados os géis colocando-se um vidro com o gel já posicionado sobre o negatoscópio, utilizando-se filme de asa 100, em ambiente bastante iluminado naturalmente, com lente macro, abertura 3,6 e velocidade 8.

**Tabela 1.** Caracteres das amostras pareadas segundo faixa etária, sexo e fototipo

Melanoma	pele adjacente	lesão melanocítica benigna	pele controle
No. / idade / sexo/ fototipo	No. / idade / sexo/ fototipo	No. / idade / sexo/ fototipo	No. / idade / sexo/ fototipo
009 - 27 anos/ fem./ II	010 - 27 anos/ fem./ II	050 - 22 anos/ fem./ II	221 - 28 anos/ fem./ II
188 - 34 anos/ fem./ II 201 - 31 anos/ fem./ III	186 - 34 anos/ fem./ II 202 - 31 anos/ fem./ III	203 - 34 anos/ fem./ II 131 - 34 anos/ fem./ III	132 - 33 anos/ fem./ II 130 - 34 anos/ fem./ III
017 - 42 anos/ fem./ III 019 - 49 anos/ fem./ III 034 - 43 anos/ fem./ II 85 - 43 anos/ fem./ III 155 - 50 anos/ fem./ III	018 - 42 anos/ fem./ III 020 - 49 anos/ fem./ III 035 - 43 anos/ fem./ II 087 - 43 anos/ fem./ III 158 - 50 anos/ fem./ III	033 - 45 anos/ fem./ III 079 - 49 anos/ fem./ III 128 - 47 anos/ fem./ II 197 - 42 anos/ fem./ III 199 - 42 anos/ fem./ III	028 - 45 anos/ fem./ III 080 - 49 anos/ fem./ III 127 - 47 anos/ fem./ II 198 - 42 anos/ fem./ III 200 - 42 anos/ fem./ III
021 - 58 anos/ masc./ II 81 - 56 anos/ fem./ III 112 - 58 anos/ fem./ II	22 - 58 anos/ masc./ II 84 - 56 anos/ fem./ III 111 - 58 anos/ fem./ II	125 - 56 anos/ masc./ II 140 - 51 anos/ fem./ III 167 - 56 anos/ fem./ II	164 - 55 anos/masc./II 064 - 54 anos/ fem./ III 057 - 52 anos/ fem./ II
004 - 69 anos/ masc./ III 45 - 62 anos/ masc./ II	014 - 69 anos/ masc./ III 048 - 62 anos/ masc./ II	208 - 68 anos/ masc./ III 180 - 67 anos/ masc./II	209 - 68 anos/ masc./ III 141 - 70 anos/ masc. II
058 - 74 anos/ fem./ V 67 - 80 anos/ fem./ II 116 - 72 anos/ fem./ III 194 - 77 anos/ fem./ II 003 - 71 anos/ fem./III 96 - 82 anos/ fem./ III 160 - 82 anos/ fem./ II	059 - 74 anos/ fem./ V 068 - 80 anos/ fem./ II 117 - 72 anos/fem./ III 192 - 77 anos/ fem./ II 070 - 86 anos/ fem./ III 095 - 82 anos/ fem./ III 162 - 82 anos/ fem./ II	185 - 74 anos/ fem./ V 214 - 76 anos/ fem./ II 212 - 72 anos/ fem./ III 175 - 72 anos/ fem./ II 217 - 72 anos/ fem./ III 177 - 74 anos/ fem./ III 213 - 83 anos/ fem./ II	184 - 74 anos/ fem./ V 049 - 74 anos/ fem./ II 055 - 73 anos/ fem./ III 189 - 80 anos/ fem./ II 178 - 74 anos/ fem./ III 172 - 74 anos/ fem./III 191 - 76 anos/fem./ II

TABELA II – Característica das amostras não pareadas

Melanoma	pele adjacente	lesão melanocítica benigna	pele controle
Nº/ idade/ sexo/ fototipo	Nº/ idade/ sexo/ fototipo	Nº/ idade/ sexo/ fototipo	Nº/ idade/ sexo/ fototipo
15 - 48 anos/fem./ III	12 - 71 anos/masc./ III	36 - 21 anos/ masc./ IV	135 - 50 anos/masc./IV
77- 49 anos/masc./IV	24 - 71 anos/masc./ VI	56 - 22 anos/ fem./ II	101 - 50 anos/fem./ III
121- 68 anos/ masc./ II	145 - 73 anos/ masc./ II	133 - 33 anos/ fem./ II	41 - 62 anos/ fem./ III
8 - 76 anos/ masc./ III	13 - 85 anos/ masc./ II	27 - 45 anos/ fem./ III	63 - 62 anos/ fem./ II
11 - 71 anos/ masc./ III		54 - 45 anos/ fem/ V	82 - 81 anos/fem./II
23 -71 anos/ masc./ VI		91 - 45 anos/ masc./ IV	92 - 83 anos/ masc./ II
146 - 73anos/ masc./II		119 - 46 anos/ fem./ V	
38 - 79 anos/ fem./ V		136- 50 anos/ masc./ IV	
2 - 80 anos/ fem./ III		108 - 55 anos/ masc./ III	
1 - 85 anos/ masc./ II		147 - 69 anos/ fem./ III	

TABELA IV – Distribuição dos pacientes segundo o sexo e tipo de pele

TIPO DE PELE	SEXO		TOTAL
	M	F	
I	0	0	0
II	10	23	33
III	5	30	35
IV	4	0	4
V	0	5	5
VI	1	0	1
TOTAL	20	58	78

TABELA V – Distribuição do paciente quanto à faixa etária

IDADE	SEXO		TOTAL	%
	M	F		
21 – 30	1	4	5	6,41
31 – 40	0	5	5	6,41
41 – 50	3	16	19	24,36
51 – 60	4	6	10	12,82
61 – 70	6	3	9	11,54
> 70	6	24	30	38,46
<b>TOTAL</b>	<b>20 (25,64%)</b>	<b>58 (74,36%)</b>	<b>78</b>	<b>100%</b>

TABELA I – Classificação do tipo de pele encontrado no livro de Fitzpatrick.

Tipo de Pele	Características
I	sempre se queima, nunca bronzeia
II	quase sempre se queima, queima menos que a média
III	algumas vezes tem uma suave queimadura, bronzeia-se na média
IV	raramente se queima, maioria das vezes fica bronzeado
V	raramente se queima, bronzeia profundamente
VI	nunca se queima, pele profundamente pigmentada

TABELA II – Diagnóstico histopatológico dos melanomas

nº da amostra	tipo histológico
9	melanoma nodular
188	melanoma disseminativo superficial
201	melanoma nodular
17	melanoma disseminativo superficial
19	melanoma disseminativo superficial
34	melanoma disseminativo superficial
85	melanoma disseminativo superficial
155	melanoma disseminativo superficial
77	melanoma acral lentiginoso
21	melanoma in situ
81	melanoma disseminativo superficial
112	melanoma in situ
4	melanoma disseminativo superficial
45	melanoma nodular
58	melanoma acral lentiginoso
67	melanoma nodular
116	melanoma acral lentiginoso
194	melanoma nodular
3	melanoma lentigo maligno melanoma
1	melanoma nodular
96	melanoma nodular
160	melanoma acral lentiginoso
2	melanoma in situ
15	melanoma disseminativo superficial
121	melanoma in situ
8	melanoma nodular
11	melanoma acral lentiginoso
23	melanoma acral lentiginoso
38	melanoma nodular
146	melanoma disseminativo superficial

TABELA III – Diagnóstico histopatológico das lesões melanocíticas benignas

nº da amostra	tipo histológico
50	nevo melânico composto
203	nevo melânico intradérmico
131	nevo melânico composto
33	nevo melânico intradérmico
79	nevo melânico composto
128	nevo melânico intradérmico
197	nevo melânico intradérmico
199	nevo melânico intradérmico
136	nevo melânico intradérmico
125	nevo melânico intradérmico
140	nevo melânico intradérmico
167	nevo melânico intradérmico
208	nevo melânico intradérmico
180	nevo azul
185	nevo melânico intradérmico
214	nevo melânico intradérmico
212	nevo melânico intradérmico
175	nevo melânico intradérmico
217	nevo melânico intradérmico
176	nevo melânico intradérmico
213	lentigo simples
36	nevo melânico intradérmico
56	nevo melânico composto
132	nevo displásico
27	nevo juncional atípico
54	nevo melânico intradérmico
91	nevo melânico composto
119	nevo melânico intradérmico
108	nevo melânico intradérmico
147	nevo melânico intradérmico

TABELA X – DISTRIBUIÇÃO DOS VALORES RELATIVOS DA TELOMERASE NO MELANOMA DIVIDIDOS PELA ESPESSURA DE BRESLOW

BRESLOW	< 0,76	0,76 – 1,5	1,6 – 4,0	> 4,0
	0,050	0,132	0,865	0,651
	0,270	0,144	0,187	2,284
	0,114	0,976	0,340	0,167
	0,415		0,019	0,215
	0,206			0,132
	0,224			0,371
				2,326
				1,237
				0,676
				2,426
				2,104
				0,025
				0,621

TABELA XI – VALORES RELATIVOS DA ATIVIDADE DA TELOMERASE NO MELANOMA SEGUNDO TIPO HISTOLÓGICO

DISS. SUPERF.	NODULAR	ACRAL LENTIGINOSO	LENTIGO MALIGNO MELANOMA
0,050	0,865	0,187	0,206
0,270	0,651	0,215	
0,114	0,167	0,340	
0,132	0,132	0,019	
0,415	0,371	2,426	
2,284	2,326	2,104	
0,144	1,237		
0,976	0,676		
0,224	0,025		
0,621			

MEL. “in situ”

0,140  
0,285  
0,297  
0,897

TABELA XII – Atividade da telomerase nas amostras pareadas

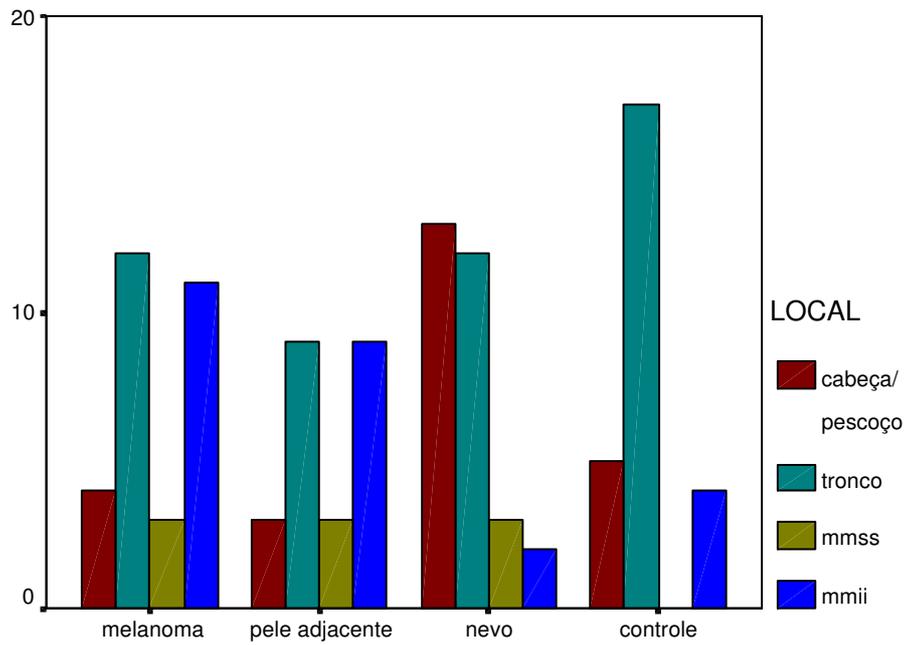
melanoma n° / AT	pele adjacente n° / AT	lesão melanocítica benigna n° / AT	pele controle n° / AT
9 / 0,865	10 / 0,019	50 / 0,041	221 / 0,005
188 / 0,050	186 / 0,004	203 / 0,048	132 / -0,002
201 / 0,651	202 / 0,032	131 / 0,036	130 / 0,043
17 / 0,270	18 / 0,003	33 / 0,120	28 / 0,003
19 / 0,114	20 / 0,152	79 / 0,121	80 / 0,040
34 / 0,132	35 / 0,085	128 / 0,660	127 / 0,019
85 / 0,415	87 / 0,263	197 / 0,021	198 / 0,039
155 / 2,284	158 / 0,402	199 / 0,027	200 / 0,056
21 / 0,140	22 / 0,046	125 / 0,106	164 / 0,470
81 / 0,144	84 / 0,034	140 / 0,085	64 / 0,029
112 / 0,285	111 / 0,032	167 / 0,476	57 / 0,012
4 / 0,976	14 / 0,182	208 / 0,027	209 / 0,098
45 / 0,167	48 / 0,004	180 / 0,163	141 / 0,040
58 / 0,215	59 / 0,016	185 / 0,004	184 / 0,026
66 / 0,132	68 / 0,017	214 / 0,053	49 / 0,043
116 / 0,340	117 / 0,009	212 / 0,027	55 / 0,004
194 / 0,371	192 / 0,037	175 / 0,052	189 / 0,012
3 / 0,206	70 / 0,011	217 / 0,067	178 / 0,186
96 / 1,237	95 / 0,049	177 / 0,428	172 / 0,014
160 / 0,019	162 / 0,014	213 / 0,022	191 / 0,018

TABELA IX – VALORES RELATIVOS DA ATIVIDADE DA TELOMERASE NO MELANOMA

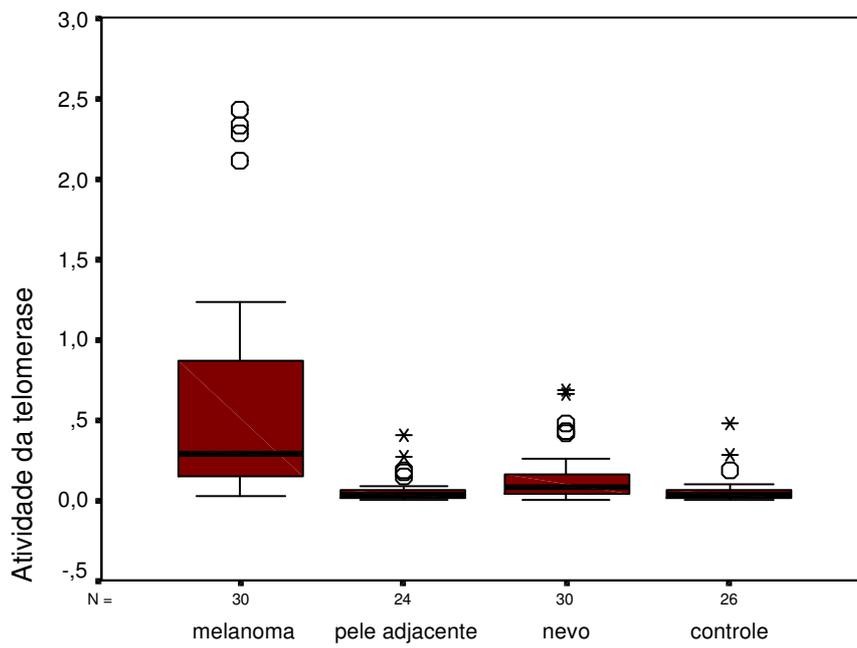
CLARK	I	II	III	IV	V
	0,140	0,206	0,865	0,187	2,284
	0,285	0,621	0,050	0,340	0,215
	0,297		0,651	1,237	0,132
	0,897		0,270	0,019	0,371
			0,114		2,326
			0,132		0,676
			0,415		2,426
			0,144		2,104
			0,976		0,025
			0,167		
			0,224		
MÉDIA	0,405	0,414	0,364	0,446	1,173

TABELA XIII – Valores relativos da atividade da telomerase nas amostras que não foram pareadas

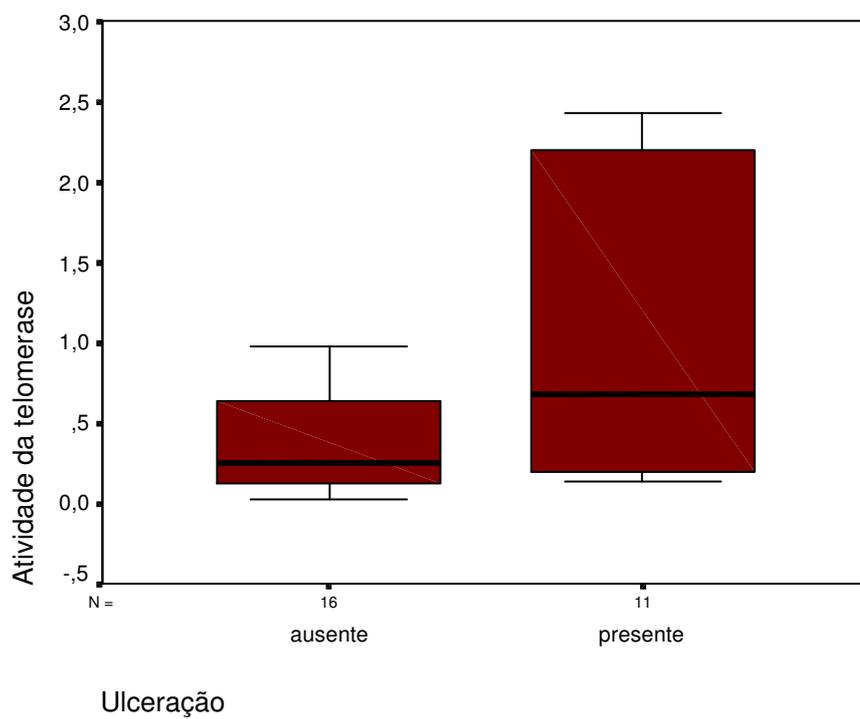
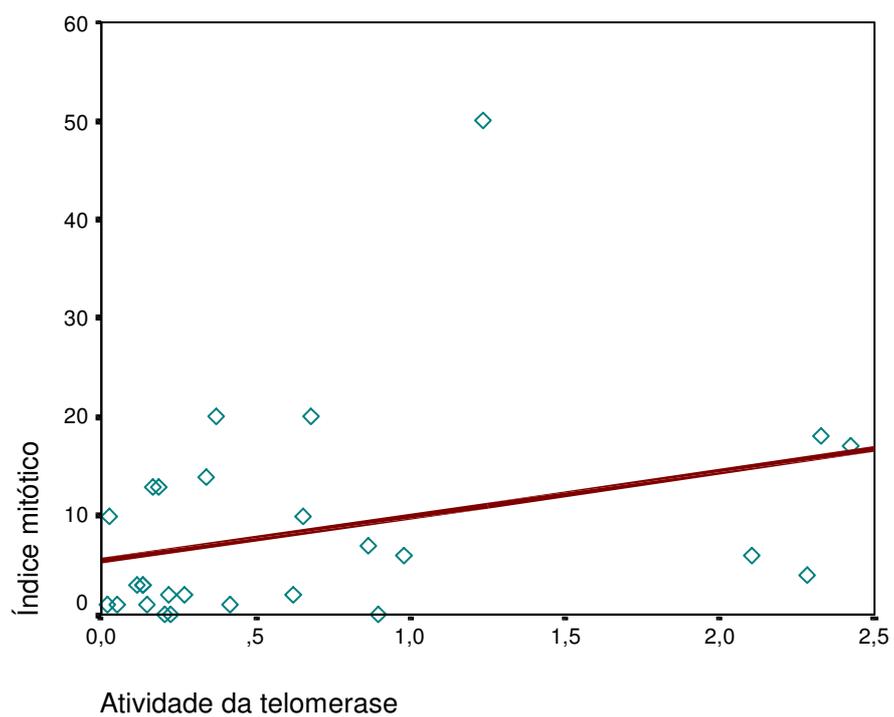
melanoma AT	pele adjacente n° / AT	lesão melanocítica benigna n° / AT	pele controle n° / n° / AT
77 / 0,187	13 / 0,176	136 / 0,043	135 / 0,275
1 / 2,326	12 / 0,012	36 / 0,137	82 / 0,009
2 / 0,297	24 / 0,005	56 / 0,214	101 / 0,006
15 / 0,22	145 / 0,014	133 / 0,081	41 / 0,004
121 / 0,897		27 / 0,686	63 / 0,090
8 / 0,676		54 / 0,253	92 / 0,003
11 / 2,426		91 / 0,024	
23 / 2,104		119 / 0,409	
38 / 0,025		108 / 0,055	
146 / 0,621		147 / 0,125	

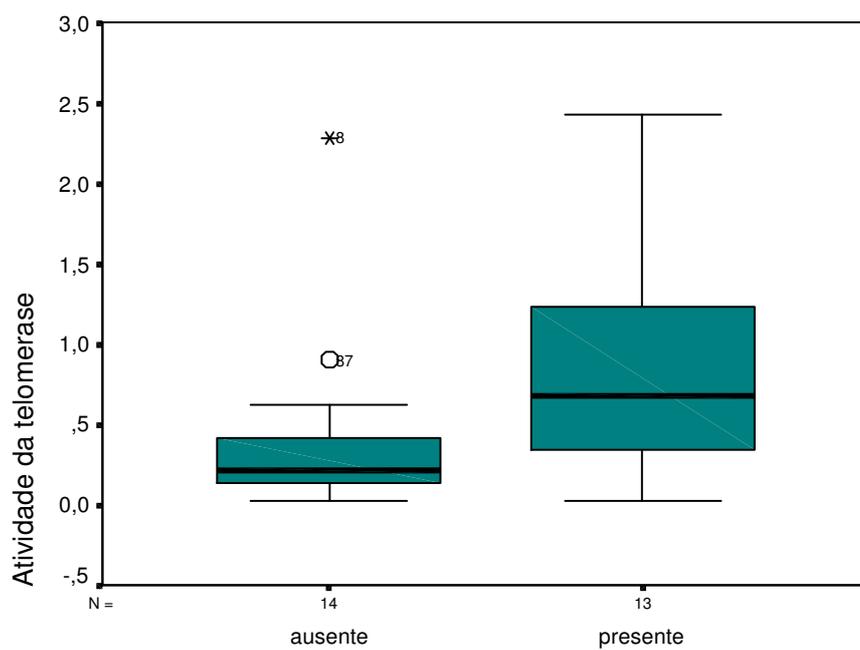


DIAGNÓSTICO

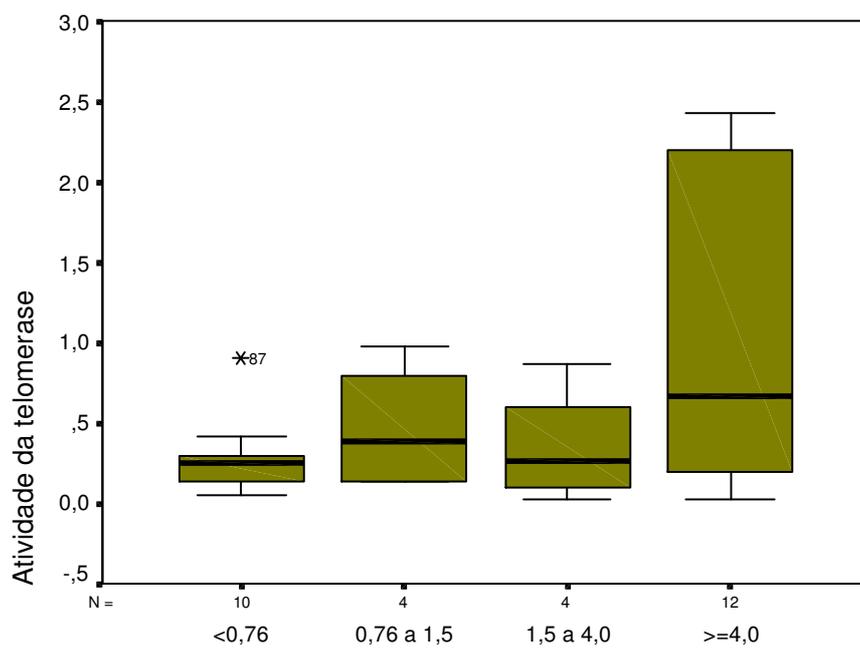


DIAGNÓSTICO





MITOSE



BRESLOW