

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANATOMIA PATOLÓGICA

TESE DE DOUTORADO

**Avaliação do *status* mutacional do éxon 15 do BRAF e sua
relação com fatores prognósticos histopatológicos no
melanoma acral de pacientes de instituição referência em
oncologia**

Aretha Brito Nobre

Orientadoras: Nathalie Henriques Silva Canedo

Cinthy Sternberg

2023

**Avaliação do *status* mutacional do éxon 15 do BRAF e sua
relação com fatores prognósticos histopatológicos no
melanoma acral de pacientes de instituição referência em
oncologia**

Aretha Brito Nobre

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Anatomia Patológica, Faculdade de
Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como requisito parcial à obtenção do título de Doutor
em Medicina (Anatomia Patológica).

Orientadoras: Nathalie Henriques Silva Canedo

Cinthy Sternberg

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro
☞ reprodução autorizada pela autora

CIP - Catalogação na Publicação

B862a Brito Nobre, Aretha
Avaliação do status mutacional do éxon 15 do BRAF
e sua relação com fatores prognósticos
histopatológicos no melanoma acral de instituição
referência em oncologia / Aretha Brito Nobre. --
Rio de Janeiro, 2023.
147 f.

Orientadora: Nathalie Henriques Silva Canedo.
Coorientadora: Cinthya Sternberg.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós
Graduação em Medicina (Anatomia Patológica), 2023.

1. Melanoma acral . 2. BRAF. 3. Histopatologia.
4. Fatores prognósticos . I. Henriques Silva Canedo,
Nathalie , orient. II. Sternberg, Cinthya ,
coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**Avaliação do *status* mutacional do éxon 15 do BRAF e sua
relação com fatores prognósticos histopatológicos no
melanoma acral de pacientes de instituição referência em
oncologia**

Aretha Brito Nobre

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina (Anatomia Patológica).

Aprovada por:

Presidente, Prof.^a Dra. Nathalie Henriques Silva Canedo
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dra. Andréia Cristina de Melo
Instituto Nacional de Câncer

Prof.^a Dra. Cristiane Bedran Militto
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Danielle Carvalho Quintella
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Vera Lúcia Nunes Pannain
Universidade Federal do Rio de Janeiro

A meus pais Alinda Brito Nobre e Delival da Fonseca Nobre;
A meus avós Delival de Souza Nobre (*in memoriam*), Joaquina
da Fonseca Nobre (*in memoriam*), Nely Dourado da Gama Brito
(*in memoriam*) e Ossian da Silveira Brito (*in memoriam*);
Ao professor José Carlos Morais (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A todos os pacientes estudados neste trabalho.

À orientadora Cinthya Sternberg, por ter abraçado a minha ideia e por não ter medido esforços para fazê-la acontecer; pela orientação, pelo carinho e pela paciência.

À professora e orientadora Nathalie Henriques Silva Canedo, por ter me aceitado como sua orientanda, pela orientação, pelo carinho e pela paciência.

À professora Vera Lúcia Nunes Pannain por todas as sugestões fornecidas durante as apresentações da disciplina Desenvolvimento de Projeto de Pesquisa, por ter aceitado fazer parte da banca de qualificação, pelo carinho e pela paciência.

Ao professor Juan Manuel Piñeiro Maceira, pelo incentivo, pelo carinho, por ter me ajudado com os casos de dúvida, por todos os ensinamentos prestados durante a minha formação em patologista, por ter semeado em mim a paixão por lesões melanocíticas.

Ao professor José Carlos Morais (*in memoriam*), pelo incentivo.

À Andréia Cristina de Melo, por ter disponibilizado o Laboratório de Pesquisa Clínica e Translacional do INCA para a realização do protocolo experimental e por toda a ajuda sempre que solicitada.

À Elizangela Marques Rodrigues, colaboradora do Laboratório de Pesquisa Clínica e Translacional do INCA, pessoa de fundamental importância para a realização do protocolo experimental; pela ajuda, pela paciência, pelo carinho e pela amizade.

Aos alunos e *staff* do Laboratório de Pesquisa Clínica e Translacional do INCA, em especial à Anna Beatriz Ribeiro Elias, à Débora Galvão Moreira, ao Júlio César Santoro

de Oliveira Assis, ao Leandro de Souza Thiago e ao Renan Amphilophio Fernandes, pela ajuda e pela paciência em todos os momentos difíceis.

Ao Luiz Fernando Nunes por ter disponibilizado os dados do seu trabalho de mestrado.

À Juliana Marques da Costa e à Andrea Juliana Zuluaga Parra por terem me ajudado com a consulta aos prontuários.

À Bruna Vieira Zandonadi por ter me ajudado com a consulta aos prontuários e com a avaliação histopatológica de parte dos casos.

À Marina Tacla Saad, por ter entrado em contato com os pacientes, para assinatura do TCLE.

À Vanessa dos Santos Mendonça Silva, aluna do Laboratório de Genética do Centro de Pesquisas do INCA, por ter me apresentado o protocolo de desparafinização “*one tube*” e por ter me ajudado a realizá-lo.

Aos bolsistas e *staff* da Área de Suporte à Pesquisa da Divisão de Patologia do INCA, por terem separado as lâminas para este trabalho e cortado os blocos de parafina escolhidos.

À Priscila Valverde Fernandes, *staff* da Área de Suporte à Pesquisa da Divisão de Patologia do INCA, por toda a ajuda e pelo carinho.

À Isabella dos Santos Guimarães, pelos ensinamentos, pelo carinho, pela paciência e pela ajuda nas análises dos eletroferogramas.

À Patricia Abrão Possik pela ajuda com a anotação das variantes, por todos os ensinamentos, pelo carinho, pela paciência e pela amizade.

Ao João Pedro Cavalcante Simões, pela ajuda na anotação das correspondências dos *primers*.

À Isabele Ávila Small, pela paciência, pelo carinho, pela análise estatística e pela amizade.

Ao Claudio Gustavo Stefanoff, por ter abraçado a minha ideia e por ter dado o impulso para fazê-la acontecer.

Ao Marcelo Martins Reis, pelos ensinamentos, pela paciência, pela generosidade e pelas análises dos eletroferogramas.

À Gilda Rose Silva do Amaral, por ter se disponibilizado a ajudar com a parte experimental.

À professora Danielle Carvalho Quintella, por ter aceitado fazer parte da banca de qualificação, pelo carinho e pela amizade.

Aos professores Katia Carneiro de Paula e Fernando Colonna Rosman por terem aceitado serem suplentes da banca de qualificação.

Ao meu marido, Diogo Gualberto Bispo, pelo amor, pela paciência, pelo incentivo e por toda a ajuda com as emoções que pairam sobre um trabalho de doutorado.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela inspiração e pelo incentivo.

Não fala com pobre, não dá mão a preto
Não carrega embrulho
Pra quê tanta pose, doutor?
Pra quê esse orgulho?

A bruxa que é cega esbarra na gente
E a vida estanca
O infarto te pega, doutor
E acaba essa banca

A vaidade é assim, põe o bobo no alto
E retira a escada
Mas fica por perto esperando sentada
Mais cedo ou mais tarde ele acaba no chão

Mais alto o coqueiro, maior é o tombo do coco
afinal
Todo mundo é igual quando o tombo termina
Com terra por cima e na horizontal

Billy Blanco (1924-2011)

RESUMO

Nobre, Aretha Brito. Avaliação do *status* mutacional do éxon 15 do BRAF e sua relação com fatores prognósticos histopatológicos no melanoma acral de pacientes de instituição referência em oncologia. Rio de Janeiro, 2023. Tese (Doutorado em Medicina – Anatomia Patológica) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

INTRODUÇÃO: Melanoma é a neoplasia cutânea mais letal. O melanoma acral é um subtipo de melanoma, definido como melanoma de palmas, de plantas e da região subungueal, sendo o tipo de melanoma cutâneo com pior prognóstico. Os melanomas devem ser testados para mutação no gene BRAF, devido à existência de medicamentos direcionados a estas proteínas, a denominada terapia alvo. Não há dados robustos acerca da frequência destas mutações neste tipo de neoplasia, no Brasil. **OBJETIVOS:** Caracterizar o perfil molecular do éxon 15 do BRAF de melanoma acral em pacientes matriculados no Instituto Nacional de Câncer entre janeiro de 2003 e dezembro de 2013; verificar se há associação entre a presença de mutações no éxon 15 do BRAF e fatores prognósticos histopatológicos, variáveis clínicas e demográficas do melanoma acral; verificar se há relação entre a espessura de Breslow e a presença ou não de TIL; relacionar a presença de mutações no éxon 15 do BRAF com o desfecho clínico dos pacientes. **MATERIAL E MÉTODOS:** Estudo retrospectivo. Foram revistas as lâminas de HE para avaliação dos fatores prognósticos histopatológicos segundo a AJCC oitava edição. Foi realizada desparafinização, extração de DNA, reação de PCR e sequenciamento Sanger do éxon 15 do BRAF. Os prontuários foram revistos para anotação de variáveis clínicas. **RESULTADOS:** Foram estudados 368 pacientes, 184 tumores sequenciados. Vinte e três neoplasias apresentaram mutação em BRAF, correspondente a 12,5 % da amostra; destas, 26% eram V600E. A mediana de idade dos pacientes com melanoma mutado foi maior do que a dos pacientes com melanoma selvagem, sendo 73,1 anos e 66 anos, respectivamente ($p=0,026$). Dentre os mutados, sete (30,4%) apresentavam invasão angiolinfática, enquanto que 14 (8,7%) selvagens exibiam esta característica ($p=0,006$). A mediana da espessura de Breslow das neoplasias com TIL foi de 5,4 mm, enquanto que a mediana desta espessura para neoplasias sem TIL foi de 4,3 mm ($p=0,009847$). A mediana de sobrevida para os pacientes portadores de melanoma com TIL (TIL presente) foi de 89,6 meses, enquanto que para os pacientes portadores de melanoma sem TIL foi de 46 meses ($p=0,038$). A mediana de sobrevida dos pacientes com melanoma selvagem foi de 62,8 meses e dos pacientes com melanoma mutado foi de 33,3 meses ($p=0,2$). A mediana de sobrevida dos pacientes com melanoma palmo-plantar foi de 61,3 meses e dos pacientes com melanoma subungueal foi de 130 meses ($p=0,037$). **CONCLUSÕES:** A frequência de mutações em BRAF foi de 12,5%. Os pacientes com melanoma BRAF mutado apresentaram a mediana de idade maior do que a mediana de idade dos pacientes com melanoma BRAF selvagem. Invasão angiolinfática esteve mais presente no grupo dos melanomas BRAF mutado. Pacientes com melanoma com TIL tiveram maior sobrevida do que aqueles com melanoma sem TIL. Pacientes com melanoma subungueal tiveram maior sobrevida do que aqueles com melanoma palmo-plantar.

Palavras-chave: melanoma acral; BRAF; histopatologia; fatores prognósticos.

ABSTRACT

Nobre, Aretha Brito. Evaluation of the mutational status of BRAF exon 15 and its relationship with histopathological prognostic factors in acral melanoma patients from a reference oncology institution. Rio de Janeiro, 2023. Thesis (Doctorate in Medicine - Pathological Anatomy) - School of Medicine, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

INTRODUCTION: Melanoma is the most lethal cutaneous neoplasm. Acral melanoma is a subtype of melanoma, defined as melanoma of the palms, soles and subungual region, and is the type of cutaneous melanoma with the worst prognosis. Melanomas should be tested for mutations in the BRAF gene, due to the existence of drugs directed at these proteins, known as target therapy. There is no robust data on the frequency of these mutations in this type of neoplasm in Brazil. **OBJECTIVES:** To characterize the molecular profile of BRAF exon 15 of acral melanoma in patients enrolled at the National Cancer Institute between January 2003 and December 2013; to verify whether there is an association between the presence of BRAF exon 15 mutations and histopathological prognostic factors, clinical and demographic variables of acral melanoma; to verify whether there is a relationship between Breslow thickness and the presence or absence of TIL; to relate the presence of BRAF exon 15 mutations to the clinical outcome of patients. **MATERIAL AND METHODS:** Retrospective study. HE slides were reviewed to assess histopathological prognostic factors according to the AJCC eighth edition. Deparaffinization, DNA extraction, PCR reaction and Sanger sequencing of BRAF exon 15 were performed. Medical records were reviewed to record clinical variables. **RESULTS:** Three hundred and sixty-eight patients were studied and 184 tumors were sequenced. Twenty-three neoplasms had a BRAF mutation, corresponding to 12.5% of the sample; of these, 26% were V600E. The median age of patients with mutated melanoma was higher than the median age of patients with wild-type melanoma, 73,1 years and 66 years, respectively ($p=0.026$). Among the mutated patients, seven (30.4%) had angiolymphatic invasion, while 14 (8.7%) out of wild-type had this characteristic ($p=0.006$). The median Breslow thickness of neoplasms with TIL was 5.4 mm, while the median Breslow thickness for neoplasms without TIL was 4.3 mm ($p=0.009847$). The median survival for melanoma patients with TIL (TIL present) was 89.6 months, while for melanoma patients without TIL was 46 months ($p=0.038$). The median survival for patients with wild-type melanoma was 62.8 months and for patients with mutated melanoma it was 33.3 months ($p=0.2$). The median survival of patients with palmoplantar melanoma was 61.3 months and that of patients with subungual melanoma was 130 months ($p=0.037$). **CONCLUSIONS:** The frequency of BRAF mutations was 12.5%. Patients with BRAF mutated melanoma had a higher median age than patients with BRAF wild-type melanoma. Angiolymphatic invasion was more present in the BRAF-mutated melanoma group. Patients with melanoma with TIL had longer survival than those with melanoma without TIL. Patients with subungual melanoma had longer survival than those with palmoplantar melanoma.

Keywords: acral melanoma; BRAF; histopathology; prognostic factors.

SUMÁRIO

1. Introdução	20
2. Fundamentação teórica	21
2.1 Epidemiologia	21
2.2 Principais tipos histopatológicos de melanoma cutâneo	22
2.2.1 Extensivo superficial (baixo grau de dano solar cumulativo)	22
2.2.2 Nodular	23
2.2.3 Lentigo maligno	24
2.2.4 Acral-lentiginoso	24
2.3 Fatores prognósticos histopatológicos	26
2.4 Perfil mutacional	28
2.4.1 A proteína B-Raf e a via de sinalização da MAPK/ ERK	31
2.5 BRAF e melanoma	33
2.5.1 Terapia alvo	35
3. Justificativa	37
4. Objetivos	38
4.1 Objetivo primário	38
4.2 Objetivos secundários	38
5. Material e métodos	39

5.1 Cálculo amostral, gerenciamento de dados e análises estatísticas	39
5.2 Critérios de inclusão	42
5.3 Critérios de exclusão	43
5.4 Métodos	43
5.5 Avaliação histopatológica	44
5.6 Protocolo experimental	46
5.6.1 Extração de DNA genômico, PCR e sequenciamento	46
6. Aspectos éticos	49
6.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	49
7. Financiamento	50
8. Resultados	51
8.1 Dados clínicos e demográficos	51
8.2. Dados histopatológicos	55
8.3 Variantes de BRAF	64
8.3.1 Descrição das variantes do éxon 15 do BRAF	68
8.4 Características demográficas e clínico-patológicas por <i>status</i> de BRAF	84
8.5. Associação entre espessura de Breslow e TIL	93
8.6. Associação entre espessura de Breslow e melanina	94

8.7 Análises de sobrevida global	95
8.7.1 Análise de sobrevida global por local da lesão	96
8.7.2 Análise de sobrevida global por sexo	97
8.7.3 Análise de sobrevida global por estágio clínico	98
8.7.4 Análise de sobrevida global por <i>status</i> de BRAF	99
8.7.5 Análise de sobrevida global por TIL	101
8.7.6 Análise de sobrevida global por necrose	102
8.7.7 Análise de sobrevida global por melanina	103
8.7.8 Análise de sobrevida global por mitose	104
8.8 Modelos de riscos proporcionais de Cox	105
9. Discussão	110
10. Conclusão	117
11. Considerações finais	118
11. Referências bibliográficas	119
APÊNDICE A – Protocolo de desparafinização <i>One Tube</i> para extração de DNA	135
APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	136
APÊNDICE C – Definição dos Estádios Clínicos	142

ANEXO A – Prêmio de primeiro lugar na Categoria Trabalhos de Investigação, apresentado durante a Décima Quarta Conferência Brasileira sobre Melanoma, Curitiba, 2021.	144
ANEXO B – Parecer consubstanciado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	145

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
BRAF	<i>B-raf proto-oncogen, serine/threonine kinase</i>
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2^a</i>
ClinVar	Base de dados do <i>National Institutes of Health</i>
COSMIC	<i>Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer</i>
CTLA4	<i>citotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
DbNSP	<i>Single Nucleotide Polymorphism database</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
ERK	cinase regulada por sinal extracelular
FFPE	tecido fixado em formol e embebido em parafina (<i>formalin-fixed paraffin-embedded tissue</i>)
HRAS	proto-oncogene da família RAS
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KIT	proto-oncogene, receptor de tirosina cinase
KRAS	proto-oncogene da família RAS
MAPK	proteína cinase mitógeno ativada
MITF	gene que codifica o fator de transcrição associado à microftalmia
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NF1	gene que codifica a neurofibromina 1
NFKB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NRAS	proto-oncogene da família RAS
PI3K-AKT	<i>phosphatidylinositol-3-kinase - serine-threonine protein kinase AKT</i>
RAS	família de proteínas <i>rat-sarcoma</i>

RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
RPM	rotações por minuto
RTK	receptor de tirosina cinase
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
WNT	via wntless/ Int1– família de proteínas <i>wntless/int-1</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características demográficas, clínico-patológicas e <i>status</i> de BRAF	52
Tabela 2	Variantes do éxon 15 do BRAF	66
Tabela 3	Características demográficas e clínico-patológicas por <i>status</i> de BRAF	84
Tabela 4	Comparação das medianas de idade (V600E x restante do grupo)	88
Tabela 5	Associação entre os fatores demográficos, clínico-patológicos e o <i>status</i> de BRAF	89
Tabela 6	Associação entre espessura de Breslow e melanina	95
Tabela 7	Modelos de riscos proporcionais de Cox	105
Tabela 8	Associação entre as variáveis e o estágio clínico	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via de sinalização ERK MAPK	32
Figura 2	Infiltrado linfocítico tumoral ativo	57
Figura 3	Infiltrado linfocítico tumoral inativo	58
Figura 4	Infiltrado linfocítico tumoral inativo	59
Figura 5	Infiltrado linfocítico tumoral ausente	60
Figura 6	Invasão perineural	61
Figura 7	Invasão angiolinfática	62
Figura 8	Regressão	63
Figura 9	Regressão	64
Figura 10	Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 17	68
Figura 11-	Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 23	69
Figura 12 –	Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 26	70
Figura 13 –	Eletroferograma ilustrando a variante encontrada nas amostras dos pacientes ID 42, ID 93, ID 96, ID 168, ID 265 e ID 371	71
Figura 14 –	Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 50	72
Figura 15 –	Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 79	73
Figura 16 –	Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 164	74
Figura 17 –	Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 202	75
Figura 18 –	Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 204	76
Figura 19 –	Eletroferograma ilustrando uma das variantes encontradas na amostra do paciente ID 223	77
Figura 20 –	Eletroferograma ilustrando uma das variantes encontradas na amostra do paciente ID 223	78

Figura 21 – Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 233	79
Figura 22 – Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 235	80
Figura 23 – Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 247	81
Figura 24 - Eletroferograma ilustrando a variante encontrada nas amostras dos pacientes ID 278 e ID 329	82
Figura 25 - Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 308	83
Figura 26 - Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 331	83
Figura 27 - Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 361	84

1. INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é uma neoplasia rara quando comparada a outros tipos de câncer de pele, mas que apresenta alta taxa de letalidade, sendo responsável pela maioria das mortes relacionadas a câncer de pele, no Brasil (MARTA et al., 2020) e no mundo. (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2020).

O melanoma acral é um subtipo de melanoma, definido como melanoma de palmas, de plantas e da região subungueal (ELDER et al., 2018a), sendo mais frequente em negros e asiáticos. (BRADFORD et al., 2009) (MARKOVIC et al., 2007). No estudo de De Melo *et al*, os melanomas acrais lentiginosos (tipo histopatológico mais frequente nestas topografias) correspondiam a apenas 2,8% da população com melanoma, no Brasil. (DE MELO et al., 2018). Além de ser pouco frequente, o melanoma acral é o tipo de melanoma cutâneo com pior prognóstico. (DAFTARY et al., 2023) (BIAN et al., 2021).

Nos últimos anos, tornou-se consenso que os melanomas sejam testados para mutações em BRAF, devido à existência de medicamentos direcionados para as proteínas provenientes de mutações neste gene, os inibidores de BRAF, constituindo a denominada terapia alvo. (SETH et al., 2020).

Devido à existência de diversos estudos mostrando associação entre fenótipo histopatológico e variantes genéticas, (ALOS et al., 2020)(KIM et al., 2020)(SAMARA et al., 2015) (MOON et al., 2018) e à ausência de informações sobre a frequência de mutações em BRAF, em melanoma acral, no Brasil, realizamos um estudo explorando a correlação entre histopatologia e esta alteração molecular nesta neoplasia pouco estudada no mundo todo.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Epidemiologia

O câncer de pele é o grupo de câncer mais comumente diagnosticado na população mundial. Mais de 1,5 milhões de novos casos de câncer de pele foram estimados em 2020, em todo o mundo. Aproximadamente um em cada cinco casos de câncer de pele, é melanoma, com cerca de 325 mil casos estimados globalmente em 2020. (ARNOLD et al., 2022).

Segundo os dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa de novos casos de melanoma cutâneo, no Brasil, para 2023, é de 4.640 casos em homens e de 4.340 casos em mulheres, o que corresponde a uma taxa bruta de 4,37 casos novos para cada 100 mil homens e 3,90 para cada 100 mil mulheres. A título de comparação, a estimativa, para 2023, de casos novos de câncer de pele não melanoma é de 101.920 em homens e de 118.570 em mulheres, correspondendo a uma taxa bruta de 96,44 casos novos para cada 100 mil homens e 107,21 casos novos para cada 100 mil mulheres. (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL), 2022).

Estudos mostram que, no Brasil, as taxas de incidência de melanoma cutâneo vêm aumentando. Entre 2000 e 2013, a taxa de incidência média entre homens, ajustada para a população mundial cresceu de 2,52 para 4,84 por 100.000 habitantes, enquanto que entre mulheres, no mesmo período, o aumento foi de 1,93 para 3,22 por 100.000 habitantes. (DE MELO et al., 2018). Esta não é apenas uma tendência local, sua incidência também vem aumentando nos Estados Unidos, na Europa e na Austrália, por exemplo. (GUY et al., 2015) (ERDMANN et al., 2013).

Entre os anos 2000 e 2016, foram registrados 22.963 óbitos por melanoma no Brasil. A análise seriada temporal nesta população mostrou tendência crescente na taxa bruta de mortalidade, passando de 0,61 para 0,87/100.000. A taxa ajustada pela população brasileira e a taxa ajustada pela população mundial apresentaram a mesma tendência crescente. (DE MÉLO et al., 2019).

Em 2020, houve 1.923 mortes por melanoma cutâneo, no Brasil, sendo 1120 entre homens e 803 entre mulheres, de acordo com o Sistema de Informação de Mortalidade (SIM). (Atlas On-line de Mortalidade (inca.gov.br), acesso em 12/09/2022).

Tem sido demonstrado um aumento significativo nas taxas de mortalidade por melanoma entre homens e na população com idade superior ou igual a 60 anos, enfatizando a necessidade de expandir o acesso da população a terapias eficazes. (MARTA et al., 2020).

Assim, apesar de pouco frequente, o melanoma é uma neoplasia com impacto importante devido a seu potencial de letalidade.

2.2 Principais tipos histopatológicos de melanoma cutâneo

Dentre os diversos tipos de melanoma, os principais são:

2.2.1 Extensivo superficial (baixo grau de dano solar cumulativo)

Corresponde a dois terços de todos os melanomas de pacientes com pele clara, e é, portanto, o subtipo de melanoma mais frequente. É significativamente menos comum em pacientes de pele escura. Pode aparecer em qualquer parte do corpo, particularmente em áreas com exposição solar intermitente. (ELDER et al., 2018b).

É definido pela presença de uma fase de crescimento radial microinvasiva ou *in situ* (intraepidérmica) que é composta por melanócitos grandes epitelioides com arranjo em padrão pagetoide na epiderme. Um componente de fase de crescimento vertical pode ou não estar presente. (ELDER; MURPHY, 2010). Esta forma de melanoma era chamada de melanoma pagetoide por McGovern, (MCGOVERN, 1970) devido a sua característica histopatológica mais exuberante.

Sua análise genômica revelou alta carga mutacional com assinatura de mutação por radiação ultravioleta. (HOCKER; TSAO, 2007).

2.2.2 Nodular

Por definição, é um subtipo de melanoma desprovido de fase de crescimento radial prévia. Já surge em fase de crescimento vertical. Na maioria das regiões do mundo, é o segundo subtipo mais comum de melanoma, correspondendo a 10 a 15% de todos os melanomas de caucasianos. (ELDER et al., 2018c).

Pode ocorrer em qualquer parte do corpo, mas, assim como o extensivo superficial, é mais comum no tronco, cabeça e pescoço e membros inferiores.

Histopatologicamente, os melanomas nodulares apresentam-se como agregados coesos de melanócitos neoplásicos na derme. Existe frequentemente um envolvimento epidérmico sobrejacente, adjacente ao componente dérmico, constituído por melanócitos dispostos como células individuais ou ninhos, ocasionalmente com dispersão pagetoide. Existe frequentemente um colarete epidérmico circunjacente a um nódulo exófitico. (BARNHILL et al., 2023).

2.2.3 Lentigo maligno

É frequentemente diagnosticado na fase de melanoma *in situ* em pele cronicamente exposta ao sol de pessoas idosas, principalmente na face, mas, também, menos frequentemente, no pescoço, dorso superior e antebraço. Caracteriza-se histopatologicamente por proliferação linear e em ninhos de melanócitos atípicos ao longo da junção dermo-epidérmica, do epitélio folicular e das glândulas sudoríparas. Está associado com acentuado dano solar, manifestado por epiderme delgada e elastose solar. Quando a invasão da derme por melanócitos atípicos (malignos) ocorre em associação com lentigo maligno, o termo lentigo maligno melanoma é usado. (ELDER et al., 2018d).

2.2.4 Acral-lentiginoso

É uma variante distinta de melanoma cutâneo, que ocorre em palma, planta e região subungueal. (ELDER et al., 2018a). Foi descrito pela primeira vez em 1977, por Arrington e colaboradores (ARRINGTON III et al., 1977) e representa cerca de 2 a 3% de todos os melanomas (BRADFORD et al., 2009), sendo uma neoplasia pouco estudada no mundo.

Há diferenças raciais na incidência e sítios de predileção dos melanomas em geral. Isto é particularmente importante para o melanoma acral. O melanoma acral lentiginoso (tipo histopatológico mais frequente de melanoma acral) corresponde a 4-6% dos melanomas em caucasianos (BRADFORD et al., 2009)(MARKOVIC et al., 2007), sendo o tipo mais comum em negros e asiáticos. (ZELL et al., 2008)(PILIANG, 2011)(CHANG; KARNELL; MENCK, 1998).

Em países onde não-caucasianos predominam, o melanoma acral pode ser a forma mais comum deste tipo de doença. Considerando a miscigenação do povo brasileiro, (PENA et al., 2011) (ALVES-SILVA et al., 2000) este tipo de neoplasia pode apresentar

frequência aumentada neste país, quando comparada a países onde predominam caucasianos.

No estudo de Chang e colaboradores (CHANG; KARNELL; MENCK, 1998), melanomas do tipo nodular e do tipo acral lentiginoso foram reportados como mais agressivos de acordo com o seu estágio de apresentação. Para os tipos nodular e acral lentiginoso, a apresentação mais comum foi o estágio II. Além disso, tanto as lesões nodulares como as lesões lentiginosas acrais apresentaram percentagens mais elevadas de doença nos estádios III e IV em comparação com os tipos extensivo superficial e lentigo maligno.

Bello *et al* e Bradford *et al* observaram que a sobrevida doença-específica de cinco anos e de dez anos, igualados os estádios, é significativamente pior no melanoma acral do que no melanoma cutâneo não acral. (BELLO *et al.*, 2013)(BRADFORD *et al.*, 2009).

Histopatologicamente, este subtipo é caracterizado por acantose, hiperqueratose, alongamento dos cones epidérmicos (características da pele glabra) e proliferação de melanócitos atípicos ao longo da camada basal da epiderme. Esses melanócitos frequentemente são dendríticos. Em suas fases mais iniciais, os melanócitos podem não estar proliferados lado a lado, de forma contígua. (BARNHILL; PIEPKORN; BUSAM, 2014). Além disso, não há tanta migração de melanócitos para as camadas superiores da epiderme, como ocorre no tipo extensivo superficial. Esta migração passa a ocorrer com mais frequência em lesões mais avançadas. Os melanócitos podem se estender profundamente na derme, ao longo dos ductos écrinos. A invasão da derme é caracterizada por melanócitos epitelioides e/ ou fusiformes isolados ou agrupados, podendo haver reação desmoplásica, neurotropismo e invasão angiolinfática.

2.3 Fatores prognósticos histopatológicos do melanoma cutâneo

Os fatores prognósticos histopatológicos mais importantes são: espessura de Breslow, nível de Clark, ulceração, índice mitótico, infiltrado linfocítico tumoral, regressão, microssatelitose, invasão angiolinfática e infiltração perineural.

A espessura de Breslow é medida em milímetros, da camada granulosa até a célula maligna localizada mais profundamente na derme ou na hipoderme. Pode ser aferida por régua milimetrada ou por ocular milimetrada é o mais forte preditor prognóstico do melanoma cutâneo. Para os melanomas *in situ*, em que as células malignas estão restritas à epiderme, esta medida não se aplica.

Os níveis de Clark são definidos como:

Nível I: melanoma confinado à epiderme; nível II: as células de melanoma estão presentes na derme papilar, que pode estar expandida mas não preenchida pelo tumor; nível III: o tumor preenche e expande a derme papilar; nível IV: as células tumorais infiltram a derme reticular; nível V: as células tumorais infiltram a hipoderme. (CROWSON; MAGRO; MIHM, 2006) (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2018).

Ulceração é definida como ausência de toda a espessura da epiderme acima do tumor primário, com depósito de exsudato fibrino-necro-leucocitário nesta região. (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2018).

O índice mitótico é definido pelo número de figuras de mitose vistas no componente intradérmico por milímetro quadrado (mm^2), contadas na área de maior quantidade de figuras de mitose observadas (*hotspot*). (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2018). Para que o número de mitoses seja relatado por milímetro quadrado, deve-se calcular a área do campo de grande aumento do microscópio utilizado, medindo o diâmetro do campo de maior aumento com régua milimetrada ou com ocular milimetrada,

para o cálculo da área do círculo (área do círculo = $\pi \times \text{raio}^2$), sabendo-se que o raio é a metade do diâmetro. Com esta equação, obtém-se a área do campo de maior aumento do microscópio utilizado, para que depois se possa calcular quantos campos de grande aumento são equivalentes a um milímetro quadrado.

O infiltrado linfocítico ativo é definido tanto como infiltrado difuso de linfócitos por toda a fase de crescimento vertical ou como presença de linfócitos ao longo de 90% da base lesional. O infiltrado linfocítico inativo corresponde a infiltração focal da neoplasia. Infiltrado linfocítico ausente é assim designado quando os linfócitos não estão misturados com as células neoplásicas ou quando estão de fato ausentes. (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2018).

Regressão ativa é reconhecida pela presença de um infiltrado linfocítico denso na derme, com perda ou degeneração das células tumorais. Este infiltrado pode ter características liquenoides (de interface), obscurecendo a maior parte da lesão. À medida que a regressão evolui, a derme papilar torna-se expandida, com fibroplasia dérmica proeminente, células inflamatórias dispersas, um aumento de melanófagos e ausência/perda de melanócitos, tanto na derme como na epiderme. A fase final da regressão é caracterizada por fibrose com ou sem melanófagos e um infiltrado linfocítico variável. (PATTERSON; HOSLER; PRENSHAW, 2021).

Microssatélite é uma metástase microscópica cutânea e/ou subcutânea adjacente ou profunda a um melanoma primário no exame histopatológico referente à exérese do tumor primário. As células tumorais metastáticas devem ser descontínuas em relação à neoplasia primária. Se o tecido entre o nódulo aparentemente separado e o tumor primário for apenas uma cicatriz fibrosa e/ou inflamação, isso não indica um microssatélite, porque as alterações podem representar regressão do tumor interveniente. Não existe um limite

mínimo de tamanho ou de distância do tumor primário para definir microssatélites. A presença de microssatélites indica um mau prognóstico; mesmo na ausência de metástase linfonodal, obriga a uma designação clínica de estágio III. (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2018).

Invasão angiolinfática deve ser reportada como presente ou ausente e refere-se à presença de células neoplásicas dentro de vasos sanguíneos ou linfáticos. (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2018).

Infiltração perineural deve ser reportada como presente ou ausente e é definida pela presença de células de melanoma adjacentes às bainhas nervosas, geralmente de forma circunferencial (invasão perineural) ou dentro dos nervos (invasão intraneural). (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2018).

Dessa forma, o estudo da peça cirúrgica referente à exérese completa de um melanoma cutâneo deve ser feito tendo em mente esses diversos fatores histopatológicos, que são a forma mais fácil e direta de determinar o prognóstico do paciente, no momento da retirada desse tipo de neoplasia.

2.4 Perfil mutacional

A partir do início do século 21, diferenças moleculares entre os subtipos histopatológicos começaram a ser registradas, corroborando as observações clínico-patológicas de que o melanoma não é uma doença homogênea.

Os genes BRAF e NRAS codificam constituintes da via da proteína cinase mitógeno-ativada (MAPK). Essa via é importante em vários processos celulares cruciais como proliferação e diferenciação. (DAVIES et al., 2002) Estudos subsequentes mostraram que

a frequência de mutação desses genes difere entre os subtipos de melanoma. (DAVIES et al., 2002) (MALDONADO et al., 2003)(CURTIN et al., 2005).

O estudo de Davies e colaboradores reportou mutações em BRAF em 66% dos melanomas, enquanto que mutações em NRAS ocorriam em vários dos casos restantes, ou seja, naqueles que não apresentavam mutação em BRAF. (DAVIES et al., 2002).

No artigo de Curtin e colaboradores, foram encontradas mutações em BRAF em 7 (23%) dos 36 melanomas de pele glabra avaliados. Os autores observaram diferenças significativas nas frequências de alterações regionais no número de cópias de DNA e nas frequências de mutação em BRAF entre os quatro grupos de melanomas estudados – melanoma de mucosa, melanoma acral, melanoma de pele cronicamente exposta ao sol e melanoma de pele sem sinais de exposição solar crônica. Concluíram que as alterações genéticas identificadas em melanomas de sítios com diferentes níveis de exposição solar indicam que há vias genéticas distintas para o desenvolvimento de melanoma. (CURTIN et al., 2005) Em outro trabalho, o mesmo autor encontrou mutações em BRAF em 10 de 28 melanomas de pele glabra, equivalente a 36%. (CURTIN et al., 2006).

Em uma meta-análise publicada em 2011, (LEE; CHOI; KIM, 2011) os autores citam que as mutações em BRAF e em NRAS são excludentes. A mutação em NRAS está relacionada a melanomas de pele com dano solar crônico e, em BRAF, a melanomas de pele sem dano solar crônico. É importante salientar que a Organização Mundial da Saúde classifica os melanomas de acordo com o grau de dano solar, sendo o extensivo superficial o principal tipo de melanoma sem dano solar crônico e os lentigo maligno e desmoplásico os principais tipos de melanoma com dano solar crônico. (ELDER et al., 2018b) (ELDER et al., 2018d) O melanoma acral não se enquadra em nenhuma das duas categorias, sendo tratado à parte, assim como os melanomas de mucosa.

Em uma revisão sistemática publicada em 2012, características genéticas de melanoma de mãos e de pés foram analisadas. Foram incluídos no estudo melanomas cutâneos localizados em pele desprovida de pêlos (palmas, plantas ou região subungueal) independente do subtipo histopatológico, ou apenas melanoma acral-lentiginoso. A frequência de mutações em BRAF variou de 9,5% a 23%. Quando comparado a melanoma de pele sem dano solar crônico ou a melanoma de outros subtipos histopatológicos, as mutações em BRAF estavam sub-representadas no grupo de melanoma de mãos e pés/ melanoma acral-lentiginoso. (DURBEC et al., 2012).

De acordo com Akbani e colaboradores, os melanomas cutâneos podem ser geneticamente classificados com base nos genes condutores (*driver genes*) mutados mais prevalentes e mutuamente exclusivos, em quatro subgrupos: mutações em BRAF, mutações em N/H/KRAS, mutações em NF1 e um grupo triplo selvagem, ou seja, sem mutações nos três genes citados. (AKBANI et al., 2015) Nesse trabalho, foram utilizados apenas melanomas de pele não glabra e metástases (sem especificar o tipo histopatológico do tumor primário) de uma população predominantemente branca.

Em uma revisão sistemática e meta-análise sobre alterações genômicas em melanoma acral, publicada em 2022, os autores relataram que os genes BRAF, NRAS e NF1 também estão alterados no melanoma acral, mas em frequências diferentes. As mutações em BRAF estariam presentes em 21% dos casos de melanoma acral, enquanto que nos melanomas cutâneos não acrais estariam presentes em 55% dos casos. (BROIT et al., 2022).

Borkowska e colaboradores encontraram mutação em BRAF em apenas um dos 31 casos de melanoma subungueal estudados, equivalente a 3%. (BORKOWSKA et al., 2020).

Zebary *et al*/encontraram mutações em BRAF em 15 (17%) dos 88 casos de melanoma acral lentiginoso estudados. (ZEBARY *et al.*, 2013) Neste mesmo artigo, os autores fizeram uma compilação de dados da literatura, registrando um valor de 14,8% de casos de melanoma acral com mutações em BRAF publicados até aquela data.

No estudo de Dika e colaboradores, foram estudados 31 casos de melanoma acral de pacientes brancos. A frequência de mutações em BRAF, KIT e NRAS foi de 12,9%, 17,2% e 30% dos casos, respectivamente. (DIKA *et al.*, 2020).

2.4.1. A proteína BRAF e a via de sinalização da MAPK/ ERK

As proteínas Raf fazem parte de um módulo de sinalização que transduz sinal da superfície celular para o núcleo, e estão sujeitas a uma regulação complexa, que é refletida pela presença de numerosos sítios de fosforilação distribuídos pelas proteínas. (WELLBROCK; KARASARIDES; MARAIS, 2004).

A via de transdução de sinal envolvendo a proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) constitui uma plataforma de sinalização através da qual os sinais extracelulares são encaminhados da membrana para alvos intracelulares a fim de engendrar diferentes resultados biológicos. A MAPK ativada tem muitos substratos de membrana, citosólicos e citosqueléticos cuja fosforilação provoca rápidas alterações de curta duração na forma celular ou no metabolismo. Além disso, a MAPK ativada pode translocar-se para o núcleo e estimular a transcrição, alterando assim o padrão de expressão gênica e causar alterações duradouras no comportamento da célula. (NIAULT; BACCARINI, 2010)(GUO *et al.*, 2020) Esta via de sinalização está esquematizada na figura 1. (GUO *et al.*, 2020).

Foram descritas quatro MAPK distintas, definidas com base nos componentes das camadas da via: cinase regulada por sinal extracelular (ERK); c-jun N-terminal cinase

(JNK); p38 e ERK5/Big MAPK (BMK). (GUO et al., 2020). A via ERK foi a primeira cascata de transdução de sinal a ser desvendada e delineada desde a membrana celular até ao núcleo, e a sua estrutura é o paradigma para a sinalização disparada por MAPKs em geral. A cascata ERK é iniciada pela proteína G Ras, que recruta o MAP3K Raf do citosol para a membrana celular, causando a sua ativação. Raf encaminha o sinal para a proteína cinase mitógeno ativada MAP2K/ cinase regulada por sinal extracelular (MEK) que, por sua vez, ativa a ERK (cinase regulada por sinal extracelular). É evidente que a regulação espaço-temporal e a especificidade do sinal são questões-chave na sinalização Ras/Raf/MEK/ERK. A propagação do sinal pela via ERK é facilitada pela ligação direta dos componentes da via uns aos outros. (NIAULT; BACCARINI, 2010).

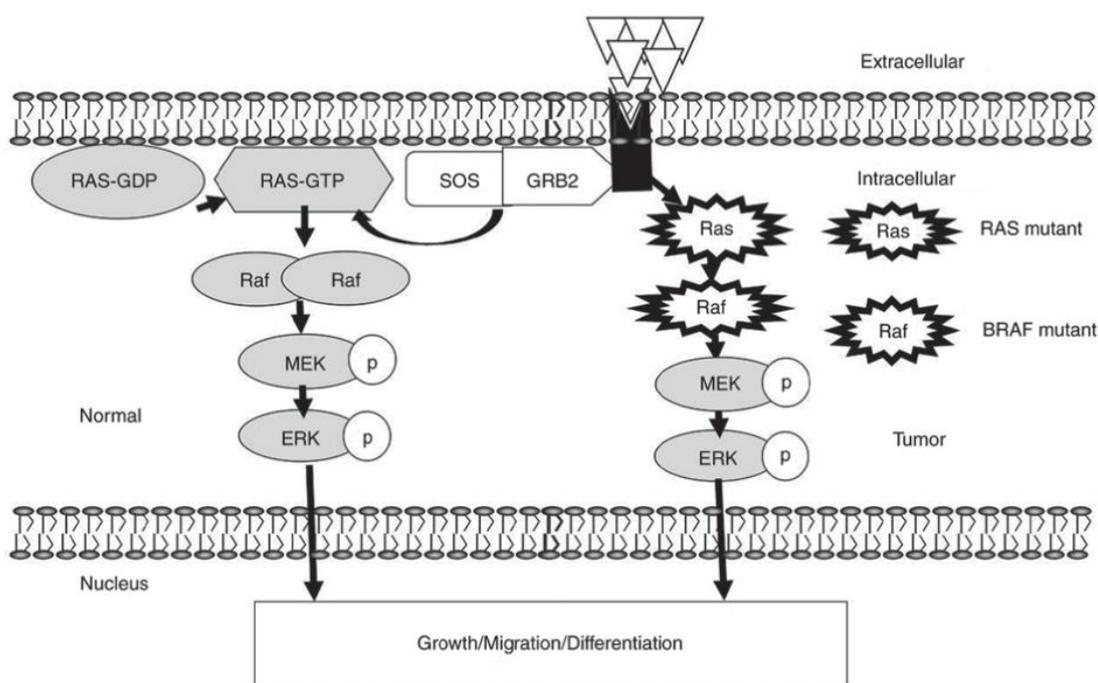


Figura 1. Via de sinalização ERK MAPK. A sinalização ERK MAPK mediada por cinase é ativada sequencialmente por fosforilação. A ERK1/2 na sinalização terminal de kinases em MAPK pode translocar para o núcleo para regular programas de transcrição, e mediar o crescimento, migração e diferenciação. As formas fosforiladas de MEK e ERK são indicadas por círculos brancos. Os receptores de membrana são apresentados por formas cinzentas. Os ligandos são representados por triângulos brancos. O receptor citoplasmático é indicado por uma espessa seta preta. SOS, son of sevenless; GRB2, proteína de ligação do receptor do fator de crescimento 2; p, fosforilado. Retirado de (GUO et al., 2020).

No câncer, os mecanismos de segurança que regulam a sinalização ERK não funcionam, resultando na ativação constitutiva da via. A ativação ERK é comum em tumores malignos em que um receptor de tirosina-cinase, tipicamente o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), é constitutivamente ativo como resultado de mutação somática e/ou sinalização autócrina e é quase invariavelmente observado em tumores com mutações somáticas Ras ou Raf. (NIAULT; BACCARINI, 2010).

A proteína B-Raf é uma serina/treonina cinase codificada no cromossomo 7q34, (cromossomo 7, braço longo, região 3, banda 4) que ativa a via de sinalização da MAPK/ERK. (ASCIERTO et al., 2012). B-Raf é o membro da família Raf mais facilmente ativado por Ras e é a mais ativa em fosforilar MEK. (NIAULT; BACCARINI, 2010). Além disso, sua atividade basal é maior do que de outros membros da família Raf, o que talvez possa explicar a frequente ativação mutacional de BRAF observada em tumores humanos. (WELLBROCK; KARASARIDES; MARAIS, 2004).

Ao longo dos anos, o gene BRAF tem estado cada vez mais associado ao desenvolvimento do câncer. O gene foi encontrado mutado, duplicado ou aberrantemente partido em subconjuntos específicos de neoplasias malignas. (DAVIES et al., 2002)(PFISTER et al., 2008)(BAITEI et al., 2009).

2.5 BRAF e melanoma

A melanomagênese ocorre após eventos mutacionais que produzem vias de sinalização críticas para a sobrevivência celular. A MAPK é uma via de transdução de sinal, envolvida numa variedade de programas fisiológicos, tais como a proliferação celular, diferenciação, desenvolvimento, migração, apoptose e transformação, sendo a

mais relevante no desenvolvimento do melanoma. A via MAPK é ativada pela ligação de um fator de crescimento a um receptor tirosina cinase (RTK) na superfície celular e estimula a atividade da guanosina trifosfatase (GTPase) do RAS. O sinal propaga-se através da cascata RAF, da proteína cinase mitógeno ativada 1 (MAP2K1) e da cinase relacionada com o sinal extracelular (ERK), que entra no núcleo para ativar fatores de transcrição e promover o ciclo celular. No melanoma, a sinalização MAPK desregulada e a ativação sustentada de ERK podem levar à hiperatividade da cascata e subsequente proliferação celular, sobrevivência, invasão, metástase e angiogênese. Outras vias que fazem parte da melanomagenese são a via PI3K-AKT, a via MITF, a via NFKB, a via WNT e alterações no gene CDKN2A. (TEIXIDO et al., 2021) (SINI et al., 2008) (GAJOS-MICHNIEWICZ; CZYZ, 2020).

É sabido que pacientes com melanoma BRAF mutado têm pior prognóstico. (LONG et al., 2011). No trabalho de Davies e colaboradores, foi observado que a atividade cinase basal do BRAF mutado é dez vezes maior que a do BRAF selvagem. (DAVIES et al., 2002).

As mutações em BRAF podem ser classificadas em três classes, de acordo com a atividade da BRAF cinase e ativação constitutiva da via. (DANKNER et al., 2018). A delimitação das mutações patogênicas em três classes distintas pode servir de modelo para orientar as estratégias terapêuticas. (OWSLEY et al., 2021). As mutações da classe I situam-se no códon V600 e apresentam uma atividade cinase extremamente forte, estimulando a ativação monomérica do BRAF. As mutações da classe II são mutações não V600 que ativam o BRAF para sinalizar como um dímero independente do RAS, com uma atividade cinase e efeitos de fosforilação a jusante mais fracos do que os observados na classe I. Por último, as mutações da classe III são consideradas "*kinase-dead*" ou de baixa atividade em comparação com o tipo selvagem. As mutações da Classe III não

podem fosforilar diretamente a MEK, mas mantêm a atividade de ligação do CRAF de uma forma dependente do RAS e podem ainda contribuir para a oncogênese através da ativação do CRAF. (OWSLEY et al., 2021).

2.5.1 Terapia alvo

A terapia sistêmica para melanoma mudou bastante desde a introdução do ipilimumab, um inibidor de CTLA4, em 2011. (STEPHEN HODI et al., 2010). A partir de então, surgiram algumas drogas para o tratamento do melanoma, com aumento da sobrevida global. (PULTE et al., 2019) (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020). Em menos de dez anos, nove novas drogas foram aprovadas para o tratamento do melanoma irresssecável, junto com outras quatro novas aprovações no cenário adjuvante. (SETH et al., 2020).

Em 2020, foi publicada uma orientação (*guideline*) da *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) acerca da terapia sistêmica para melanoma. Foi recomendado que, para pacientes com melanoma metastático, seja feita a avaliação acerca da presença ou não de variantes em BRAF. (SETH et al., 2020). Isto se deve à existência de medicamentos direcionados a neoplasias com BRAF mutado, a assim chamada terapia alvo. (CHENG et al., 2018). A mesma orientação foi publicada pela NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*). (SWETTER et al., 2021).

Como citado por Ito T. et al (ITO et al., 2021), a presença de mutação em BRAF prediz a resposta a inibidores de BRAF/MEK. Considerando os diferentes algoritmos de tratamento baseados no *status* mutacional de BRAF, todos os pacientes com melanoma metastático devem ser testados para a presença ou ausência de mutação em BRAF. O principal alvo dessas novas drogas são as proteínas oriundas de mutações no *locus* V600,

sendo a mais frequente delas a V600E. (OWSLEY et al., 2021) (LOKHANDWALA et al., 2019).

A descoberta de que muitos melanomas contêm mutações em BRAF (DAVIES et al., 2002) levou ao desenvolvimento do vemurafenibe, do dabrafenibe e do encorafenibe, inibidores seletivos da cinase mutada BRAF V600, e do trametinibe, do cobimetinibe e do binimetinibe, inibidores da cinase MEK a jusante. A terapêutica combinada com inibidores BRAF e MEK (por exemplo, dabrafenib mais trametinibe, vemurafenibe mais cobimetinibe, encorafenibe mais binimetinibe) resultou em melhores taxas de sobrevida global e de sobrevida sem progressão de doença em pacientes com melanoma avançado apresentando variantes BRAF V600.(CHENG et al., 2018) (MCARTHUR et al., 2014) (LARKIN et al., 2014) (GRANGE et al., 2015) (LONG et al., 2016) (DUMMER et al., 2018).

Dada a importância da terapia alvo para pacientes com melanoma metastático, a identificação de mutações neste tipo de neoplasia torna-se primordial.

3. JUSTIFICATIVA

Considerando os benefícios que a terapia alvo pode trazer aos pacientes com melanoma, caracterizar um perfil molecular de pacientes com melanoma acral pode ser benéfico para a população. Muitas das padronizações e análises de custo/efetividade levam em consideração a incidência na população, preço do medicamento e seu efeito, tornando necessário conhecer a real incidência de pacientes tratáveis com terapia alvo para estudar, inclusive, o impacto econômico do uso do medicamento. Pacientes com melanoma acral são mais comuns em países onde não predominam caucasianos e tais estudos devem e sempre serão capitaneados por iniciativas locais. O conhecimento desta população e suas reais necessidades de tratamento podem balizar políticas públicas para estes pacientes. Esse tipo de estudo é pioneiro no Brasil e pode servir de estudo-piloto para determinação de parte do perfil molecular de pacientes com melanoma acral em uma população expandida.

4. OBJETIVOS

4.1 Primário

Caracterizar o perfil molecular restrito ao éxon 15 do BRAF do melanoma acral em pacientes matriculados no Instituto Nacional de Câncer entre janeiro de 2003 e dezembro de 2013.

4.2 Secundários

Verificar se há associação entre a presença de mutações no éxon 15 do BRAF e fatores prognósticos histopatológicos (espessura de Breslow, nível de Clark, índice mitótico, infiltrado linfocítico tumoral, regressão, microssatelitose, ulceração, invasão angiolinfática e infiltração perineural), variáveis clínicas e demográficas do melanoma acral.

Verificar se há relação entre a espessura de Breslow e a presença ou não de infiltrado linfocítico tumoral (TIL).

Caracterizar os fatores de risco e de proteção para óbito, considerando as variáveis clínicas, demográficas e histopatológicas.

Relacionar a presença de mutações no éxon 15 do BRAF com o desfecho clínico dos pacientes.

Comparar a sobrevida dos pacientes com melanoma ungueal e com melanoma palmo-plantar.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de estudo retrospectivo, baseado na avaliação de amostras de pacientes matriculados no Instituto Nacional de Câncer (INCA), no período de 01 de janeiro de 2003 a 31 de dezembro de 2013. As lâminas coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE) foram revisadas pela pesquisadora principal, patologista com mais de dez anos de experiência em dermatopatologia, para confirmação do diagnóstico de melanoma e para avaliação dos fatores prognósticos histopatológicos. O bloco de parafina com volume de tumor adequado (no mínimo cerca de 70% de representatividade tumoral) foi utilizado para realização de estudos moleculares.

5.1 Cálculo amostral, gerenciamento de dados e análises estatísticas

Por ser um estudo descritivo, sem hipótese estatística a ser testada, não foi realizado cálculo amostral. Trata-se de amostra por conveniência; foram incluídos pacientes consecutivamente matriculados entre 2003 e 2013, no Instituto Nacional de Câncer, com diagnóstico de melanoma acral.

Um banco de dados foi criado no sistema RedCap®, validado e licenciado para uso no INCA. Este sistema é baseado em internet com o nível de segurança apropriado para que o pesquisador possa inserir todas as informações necessárias, em concordância com as Boas Práticas Clínicas. (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2005). O banco de dados foi idealizado pela pesquisadora principal e customizado pelos gerentes de dados da Área Representativa de Pesquisa Clínica (ARPC/INCA). As variáveis coletadas foram: data do diagnóstico no INCA; idade no momento do diagnóstico (por biópsia); sexo (masculino, feminino); cor da pele auto-referenciada (branca, preta, parda e amarela); localização da lesão (palmar, plantar, subungueal mão, subungueal pé); estadiamento clínico (0 a IV, tendo sido agrupados posteriormente em 0 a II e III a IV para

fins comparativos); data do óbito ou data da última consulta; tipo de amostra (excisional ou incisional); espessura de Breslow; nível de Clark; índice mitótico (em mitoses/ mm²); infiltrado linfocítico tumoral (presente ou ausente); *status* do infiltrado linfocítico tumoral (ativo, inativo); graduação do infiltrado linfocítico tumoral (leve, moderado, acentuado); regressão; microssatelitose; tamanho da microssatelitose (maior eixo em milímetros); ulceração; tamanho da ulceração; tipo de célula predominante (epiteloide ou fusiforme); tipo histopatológico da neoplasia; se a lesão era polipoide ou não; invasão angiolinfática; invasão perineural; presença ou não de necrose; graduação da quantidade de melanina (ausente, leve, moderada, acentuada); fase de crescimento da neoplasia (radial X vertical); alteração molecular encontrada.

Os dados clínicos foram coletados dos prontuários médicos e do sistema de Anatomia Patológica da Divisão de Patologia do INCA. A data de óbito foi consultada nos prontuários médicos e também no Sistema de Informação de Mortalidade da Cidade do Rio de Janeiro (SIM). A coleta de dados clínicos e inserção no banco de dados foi realizada pela pesquisadora principal e por profissional de sua equipe por ela delegado. A pesquisadora principal foi responsável pela precisão e veracidade dos dados clínicos coletados.

Ao final do estudo, os dados foram extraídos e exportados para o programa de estatística R (R CORE TEAM, 2020), versão 4.0.3, para realização das análises estatísticas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Foi realizada uma análise descritiva das variáveis clínicas e demográficas, que foram resumidas em uma tabela. O teste de Shapiro foi utilizado para verificar a hipótese nula de normalidade para as variáveis contínuas idade, espessura de Breslow, tamanho da ulceração e número de mitoses. As variáveis contínuas foram descritas por média e desvio-padrão (DP) ou, quando a distribuição da variável não era normal, por mediana e

intervalo interquartilício (Iiq). As variáveis categóricas foram descritas por frequências absolutas e relativas.

Para verificar associação entre *status* da mutação e os fatores prognósticos foi construído um modelo múltiplo de regressão logística. Primeiramente foi obtido o *odds ratio* (razão de chances - OR) bruto para cada variável. A seguir, as variáveis com p valor menor que 0,20 foram inseridas no modelo múltiplo em modo passo a passo (*forward stepwise*). Os valores de OR brutos e ajustados foram apresentados com seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%).

Para verificar se havia diferença no valor da espessura de Breslow entre os grupos de TIL ausente e TIL presente, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para verificar se havia diferença no valor da mediana da espessura de Breslow entre os grupos de melanina ausente e melanina presente, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para verificar se havia diferença na mediana de idade entre os pacientes com neoplasia que apresentava a variante V600E e os demais pacientes cujas neoplasias apresentaram sequenciamento satisfatório (não V600E e selvagens), foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

A sobrevida global (SG) foi calculada do momento do diagnóstico até o óbito ou até o último contato registrado. Os pacientes vivos ao final do seguimento foram censurados. O método de Kaplan-Meier foi empregado para estimar as curvas de sobrevida, as medianas de sobrevida (com os respectivos IC 95%) e probabilidades de sobrevida em 60 meses. O tempo mediano de seguimento foi calculado pelo método de Kaplan-Meier reverso. As curvas de sobrevida foram comparadas pelo teste de log-rank.

Para verificar associação entre os fatores prognósticos histopatológicos, demográficos e clínicos e sobrevida global foi construído um modelo múltiplo de riscos proporcionais de Cox. Primeiramente foi obtido o *hazard ratio* (razão de risco - HR) bruto para cada variável. A seguir, as variáveis com p valor menor que 0,20 foram inseridas no modelo múltiplo em modo passo a passo (*forward stepwise*). Os valores de HR ajustados foram apresentados com seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%). Seguindo o pressuposto de que as variáveis de exposição devem ser independentes entre si, algumas variáveis não foram incluídas no modelo, por apresentarem forte associação com o estágio clínico, sendo elas: espessura de Breslow, ulceração, tipo histopatológico nodular e fase de crescimento vertical. Outra condição para a inclusão de variáveis no modelo múltiplo foi o pressuposto de proporcionalidade, que foi verificado visualmente, para cada variável, nas curvas de sobrevida. A variável invasão perineural, cujos riscos não se mostraram proporcionais ao longo do tempo, foi incluída no modelo como variável de estratificação (*strata*).

5.2 Critérios de inclusão

- 1 – Pacientes matriculados consecutivamente no Instituto Nacional de Câncer, entre janeiro de 2003 e dezembro de 2013, com diagnóstico de melanoma acral.
- 2 - Presença de bloco de parafina com volume de material adequado (no mínimo cerca de 70% de representatividade tumoral) para realização das análises propostas.
- 3 - Prontuário médico disponível para coleta de informações.
- 4 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelo paciente.
- 5 - Idade acima de 18 anos.
- 6 – Paciente brasileiro.

5.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo casos em que só havia bloco de parafina referente a recidiva local ou a metástase.

5.4 Métodos

Foi realizado levantamento dos casos de melanoma acral, no sistema de Anatomia Patológica da Divisão de Patologia do INCA, utilizando-se os códigos para melanoma de mãos e de pés, de membros inferiores e de membros superiores, totalizando 816 casos correspondentes a 537 pacientes.

Todos os 816 casos, referentes a 537 pacientes, foram acessados no sistema de Anatomia Patológica da Divisão de Patologia do INCA para confirmação da localização (incluídos apenas os casos de palmas, de plantas e subungueais) e da verificação da existência do bloco de parafina no arquivo. Posteriormente, as lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) dos casos de localização acral (incluídas biópsias incisionais e excisionais) foram revistas para confirmação do diagnóstico de melanoma, totalizando 405 pacientes.

Os prontuários médicos e o Sistema de Informação de Mortalidade da Cidade do Rio de Janeiro (SIM) foram acessados para verificação de possíveis óbitos e anotação das datas da última consulta e/ou de consulta agendada destes 405 pacientes. Foram encontrados 150 óbitos nos prontuários médicos e mais 38 óbitos no SIM, totalizando 188 pacientes que foram a óbito.

Houve perdas devido à ausência de bloco de parafina e à ausência de prontuário médico disponível. Ao final da busca, foram obtidos 368 pacientes que preenchem todos os critérios de inclusão.

As lâminas de HE dos 368 pacientes, considerando suas biópsias incisionais e excisionais, foram revistas pela pesquisadora principal e a área com maior representatividade tumoral demarcada (no mínimo cerca de 70% de representatividade tumoral).

5.5 Avaliação histopatológica

Foram utilizadas no estudo apenas as neoplasias primárias. Não foram utilizadas amostras referentes a recidiva local ou a metástase, por exemplo. Todas as lâminas de HE foram revistas pela pesquisadora principal para confirmação do diagnóstico e determinação dos fatores prognósticos histopatológicos. Os fatores prognósticos histopatológicos foram anotados de acordo com a AJCC oitava edição (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2018), conforme descritos anteriormente em “2.3 Fatores prognósticos histopatológicos do melanoma cutâneo”. Além dos fatores prognósticos preconizados pela AJCC, foram incluídas no estudo características como: grau de atividade do TIL (leve, moderado e acentuado), tipo de célula predominante na neoplasia (epitelióide, fusiforme e outro); lesão polipoide (sim ou não), tamanho da microssatelite; tamanho da ulceração; necrose (sim ou não) e quantidade de melanina (ausente, leve, moderada e acentuada).

É importante ressaltar que a avaliação histopatológica foi realizada sem o conhecimento das características clínicas ou dos resultados de sequenciamento.

A graduação da atividade do TIL foi realizada de forma subjetiva pela pesquisadora principal.

O tipo de célula predominante foi avaliado da seguinte forma: se a neoplasia apresentava mais de 50% de um determinado subtipo, este foi considerado predominante.

Se havia quantidades similares dos subtipos principais (epitelióide e fusiforme), esta neoplasia era encaixada no campo “não se aplica”, ou seja, não havia predomínio de determinado tipo celular.

Foram consideradas lesões polipoides aquelas lesões sobrelevadas cuja base era menor que sua superfície.

O tamanho da microssateliteose foi medido com régua milimetrada, no maior eixo do depósito tumoral. Nos casos em que havia mais de um depósito tumoral (microssateliteose), foi medido o maior.

O tamanho da ulceração foi medido com régua milimetrada, na lâmina com maior representatividade de ulceração. Considerou-se ulceração a solução de continuidade do epitélio com sua substituição por exsudato fibrino-necro-leucocitário.

A quantidade de melanina foi avaliada apenas nas células neoplásicas, não tendo sido considerados melanófagos para esta quantificação, que foi realizada de maneira subjetiva, da seguinte forma:

- a) Melanina ausente: neoplasias sem pigmento melânico nas células neoplásicas, após análise minuciosa de todas as lâminas da neoplasia;
- b) Melanina leve: melanina presente no citoplasma de até 25% das células neoplásicas;
- c) Melanina moderada: melanina presente no citoplasma de 26% a 75% das células neoplásicas;
- d) Melanina acentuada: melanina presente no citoplasma de 76% a 100% das células neoplásicas.

5.6 Protocolo experimental

5.6.1 Extração de DNA genômico, PCR e sequenciamento

O DNA genômico de cada tumor incluído nesse estudo foi extraído de tecido fixado em formol e embebido em parafina (*formalin-fixed paraffin-embedded tissue* – FFPE). A área tumoral foi demarcada pela pesquisadora responsável. Amostras com pelo menos 70% de representatividade tumoral (neoplasia viável) foram utilizadas. Três cortes de 10 µm de tecido inserido em parafina foram colocados em um tubo *Eppendorf* e submetidos ao processo de desparafinização “one tube”, cujo protocolo está no apêndice A. A extração de DNA foi realizada com o *kit* QiAmp DNA FFPE tissue kit (50 preps), catálogo número: 56404 - Qiagen. A qualidade e concentração do DNA extraído foram avaliadas por leitura de absorvância em espectrofotômetro *Nanodrop* (*ThermoFisher Scientific*). Em seguida, o éxon 15 do gene BRAF foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os reagentes do *kit* Taq High Fidelity, catálogo número 11304011 e desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTP), ambos da Invitrogen, de acordo com as instruções do fabricante. Para cada reação de PCR de volume de 50 µL, foram utilizados aproximadamente 100 ng de DNA. Utilizamos o iniciador *forward* 5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3' e *reverse* 5'-GGCCAAAATTTAATCAGTGGA-3'. Os primers citados correspondem a uma região de 224 pares de base, entre as posições intrônicas 176.309 e 176.331 (5'- 3') na sequência *forward* e 176.532 e 176.511 (5'- 3') na sequência *reverse*, que incluem o éxon 15 do gene BRAF. A sequência NG_007873.3, depositada no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) disponível foi utilizada como referência de DNA genômico.

Alíquotas (2 µl a 5 µl) dos produtos de PCR foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2% contendo gel red, para confirmar a amplificação.

Em seguida, os produtos de PCR foram purificados utilizando o *kit Purelink Quick PCR Purification Kit* (50 preps), catálogo número K310001- Invitrogen, para posterior confecção das placas de sequenciamento. No preparo das amostras para o sequenciamento foi utilizado o *kit Big-Dye Terminator (Applied Biosystems)*, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços para realização da reação de sequenciamento, no termociclador *Veriti Thermal Cycler, 96 Well (Applied Biosystems)*. O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático *ABI 3130XL DNA Analyzer (Applied Biosystems)*. Após a realização do sequenciamento, os arquivos contendo os dados brutos foram exportados em formato .AB1 e importados para o programa *ChromasPro™ versão 2.1.10 (Technelysium Pty Ltd)* para análise. Os eletroferogramas e suas respectivas sequências de bases nitrogenadas foram visualizados e analisados neste programa.

Para a anotação das variantes genéticas encontradas, as sequências de bases nitrogenadas obtidas foram alinhadas com as sequências de bases nitrogenadas relativas ao gene BRAF depositadas no GenBank, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Como referência de DNA genômico, utilizamos a sequência NG_007873.3. Como referência de DNA complementar, utilizamos a sequência NM_004333.6. No caso de variantes do tipo sentido trocado ou *missense*, que conferiram mudanças na sequência proteica, a sequência NP_004324.2 foi utilizada como referência e as substituições foram analisadas considerando as alterações no códon e conseqüente alteração no resíduo de aminoácido.

Posteriormente, as variantes identificadas foram classificadas quanto à sua patogenicidade. Para isso, foram utilizadas informações da base de dados Ensembl, bem como outras bases de dados relevantes, como o ClinVar, o COSMIC e o dbSNP. Foram considerados critérios como frequência na população, impacto funcional predito e associação com doenças conhecidas.

A avaliação dos eletroferogramas foi realizada sem o conhecimento das características clínicas ou histopatológicas.

6. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INCA (parecer número 958.016). Trata-se de um estudo descritivo, retrospectivo, portanto não houve nenhum tipo de intervenção de qualquer natureza. Cada paciente incluído recebeu o tratamento habitual da instituição, dentro ou fora de protocolos de estudos clínicos. Foi estabelecida codificação de cada paciente, garantindo a confidencialidade das informações.

Todos os aspectos éticos envolvidos encontram-se de acordo com a resolução CNS 466/12 (Publicada no DOU nº 12 – quinta-feira, 13 de junho de 2013 – Seção 1 – Página 59), que dispõe sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

6.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

O conteúdo do TCLE pode ser visto no apêndice B.

Foi solicitada ao Comitê de Ética em Pesquisa isenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os pacientes cujos óbitos foram verificados nos prontuários médicos e no Sistema de Informação de Mortalidade da Cidade do Rio de Janeiro (SIM). A solicitação foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em 27 de outubro de 2015, Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE): 40068614.1.0000.5274. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado por 11 pacientes e um deles se recusou a participar do estudo. Após três tentativas frustradas de contato por carta e/ou por telefone com o restante dos pacientes vivos, foi solicitada isenção do TCLE ao Comitê de Ética em Pesquisa do INCA para estes pacientes. Esta solicitação foi aprovada em abril de 2018.

7. FINANCIAMENTO

O Laboratório de Pesquisa Translacional da Divisão de Pesquisa Clínica do INCA utilizou recursos próprios para o desenvolvimento do projeto.

8. RESULTADOS

8.1 Dados clínicos e demográficos

Os resultados descritos a seguir estão resumidos na Tabela 1. Foram estudados 368 pacientes. A idade no momento do diagnóstico variou de 18,8 anos a 110,8 anos, com uma mediana de 67,5 anos e intervalo interquartil (Iq) de 57,2 a 76,0 anos. A distribuição de pacientes femininos e masculinos estava homogênea, sendo 192 (52,2%) do sexo feminino e 176 (47,8%) do sexo masculino. O teste de Shapiro rejeitou a hipótese nula de normalidade para as variáveis contínuas idade e espessura de Breslow, por isso, utilizamos a mediana como medida de tendência central.

Com relação à cor da pele, duzentos e onze (57,3%) pacientes eram brancos, oitenta e quatro (22,8%) pacientes eram pardos e setenta e três (19,8%) eram negros.

Quanto à localização da lesão, duzentos e noventa (78,8%) pacientes apresentavam melanoma plantar, em quarenta e três (11,7%) pacientes o melanoma estava localizado na região subungueal do pé, em vinte (5,4%) pacientes o melanoma estava localizado na região subungueal da mão e quinze (4,1%) pacientes tinham melanoma palmar. Ao agruparmos as localizações, trezentos e cinco (82,9%) pacientes apresentavam melanoma palmo-plantar e sessenta e três (17,1%) eram portadores de melanoma subungueal.

Considerando o estágio clínico, seis (1,6%) pacientes foram alocados no estágio 0, dezesseis (4,3%) correspondiam ao estágio IA, trinta e três (9,0%) ao estágio IB, trinta e oito (10,3%) ao estágio IIA, trinta e seis (9,8%) pacientes ao estágio IIB, oitenta e nove (24,2%) ao estágio IIC, cento e trinta e três (36,1%) foram alocados no estágio III e dezessete (4,6%) estavam no estágio IV de doença. Ao agruparmos os estágios, a distribuição se apresenta da seguinte forma: cinquenta e cinco (14,9%) pacientes

correspondiam aos estádios 0 e I, cento e sessenta e três (44,3%) ao estágio II, cento e trinta e três (36,1%) ao estágio III e dezessete (4,6%) ao estágio IV. A definição dos estádios pode ser vista no apêndice C.

Tabela 1 - Características demográficas, clínico-patológicas e *status* de BRAF

Características		Total
Total N (%)		368
Idade	Mediana (IIq)	67,5 (57,2 a 76,0)
Sexo	Masculino	176 (47,8)
	Feminino	192 (52,2)
Cor da pele	Branca	211 (57,3)
	Preta	73 (19,8)
	Parda	84 (22,8)
Local da lesão	Plantar	290 (78,8)
	Palmar	15 (4,1)
	Subungueal mão	20 (5,4)
	Subungueal pé	43 (11,7)
Local dicotomizado	Palmo-plantar	305 (82,9)
Estadiamento	0	6 (1,6)
	IA	16 (4,3)
	IB	33 (9,0)
	IIA	38 (10,3)
	IIB	36 (9,8)
	IIC	89 (24,2)
	III	133 (36,1)
	IV	17 (4,6)
Estadiamento agrupado	0 e I	55 (14,9)
	II	163 (44,3)
	III	133 (36,1)
	IV	17 (4,6)

Características		Total
Tipo de amostra	Excisional	322 (87,5)
	Incisional	46 (12,5)
Tipo histopatológico	Acral-lentiginoso	303 (82,3)
	Nodular	37 (10,1)
	Não avaliável	28 (7,6)
Lesão polipoide	Não	309 (84,0)
	Sim	59 (16,0)
Breslow	Mediana (Iq)	5,0 (2,4 a 10,0)
Clark	I	9 (2,4)
	II	15 (4,1)
	III	39 (10,6)
	IV	198 (53,8)
	V	107 (29,1)
TIL	Presente	228 (62,0)
	Ausente	140 (38,0)
<i>Status</i> TIL	Inativo	140 (38,0)
	Ativo	88 (23,9)
	Ausente	140 (38,0)
Grau de atividade TIL	Leve	146 (39,7)
	Moderada	66 (17,9)
	Acentuada	16 (4,3)
	(TIL ausente)	140 (38,0)
Microsatelitose	Não	353 (95,9)
	Sim	15 (4,1)
Tamanho da microsatelitose	Mediana (Iq)	2,2 (1,0 a 2,8)

Características		Total
Ulceração	Não	128 (34,8)
	Sim	240 (65,2)
Tamanho ulceração	Mediana (IIq)	10,0 (4,2 a 17,0)
Regressão	Não	335 (91,0)
	Sim	33 (9,0)
Mitoses	Mediana (IIq)	3.0 (1,0 a 7,0)
Tipo de célula predominante	Epiteloide	236 (64,1)
	Fusiforme	103 (28,0)
	Outro	3 (0,8)
	Não se aplica	26 (7,1)
Invasão angiolinfática	Não	325 (88,3)
	Sim	43 (11,7)
Invasão perineural	Não	316 (85,9)
	Sim	52 (14,1)
Necrose	Não	291 (79,1)
	Sim	77 (20,9)
Melanina	Ausente	53 (14,4)
	Leve	105 (28,5)
	Moderada	73 (19,8)
	Acentuada	137 (37,2)
Fase de crescimento	Radial	55 (14,9)
	Vertical	313 (85,1)
<i>Status</i> BRAF	Selvagem	161 (43,8)
	Mutado	23 (6,2)
	(Não avaliados)	184 (50,0)

IIq: Intervalo interquartilico; TIL: Infiltrado linfocítico tumoral.

8.2 Dados histopatológicos

Os resultados descritos a seguir estão resumidos na Tabela 1. A maioria das amostras (322) eram excisionais, ou seja, referentes à exérese completa da neoplasia, correspondendo a 87,5% dos casos. Quarenta e seis amostras eram incisionais, assim sendo, a neoplasia não estava representada em sua totalidade, equivalentes a 12,5% dos casos.

Considerando o tipo histopatológico, trezentos e três (82,3%) casos eram acral-lentiginoso e trinta e sete (10,1%) eram nodular. Vinte e oito (7,6%) não puderam ser classificados quanto ao tipo histopatológico, devido à parcialidade da amostra (biópsias incisionais).

As neoplasias foram classificadas em polipoides ou não polipoides. A maioria das neoplasias não eram polipoides, correspondendo a 309 (84,0%) casos.

A espessura de Breslow variou de 0 mm a 65 mm, com uma mediana de 5,0 mm e intervalo interquartilico (Iiq) de 2,4 a 10,0 mm.

O nível de Clark IV foi o mais prevalente, correspondendo a 198 (53,8%) neoplasias. A distribuição dos níveis de Clark pode ser vista na Tabela 1.

O infiltrado linfocítico estava presente em 228 neoplasias (62%), sendo a maioria inativo, em 140 (38%) casos. A maior parte exibia infiltrado linfocítico leve, em 146 (39,7%) neoplasias. A caracterização do infiltrado linfocítico tumoral está ilustrada nas figuras 2 a 5.

A grande maioria dos casos (353 pacientes - 95,9%) não tinha microssatelitose. O tamanho da microssatelitose variou de 0,2 mm a 13,0 mm, com uma mediana de 2,2 mm.

A maior parte dos casos não apresentava regressão (335 casos – 91,0%). A caracterização de regressão está ilustrada nas figuras 6 e 7.

Duzentos e quarenta casos apresentavam ulceração, correspondendo a 65,2% da amostra.

O número de mitoses por milímetro quadrado variou de 0 a 37, sendo a mediana de 3, com Iq de 1 a 7.

Predominou o subtipo de células epitelioides, em 263 (64,1%) casos. Três casos foram alocados no subtipo “outro”, sendo um de células pequenas, redondas e azuis, outro de células claras e outro de células pleomórficas.

Trezentas e dezesseis neoplasias (85,9%) não tinham invasão perineural. A caracterização de invasão perineural está ilustrada na figura 8.

Trezentas e vinte e cinco neoplasias (88,3%) não apresentavam invasão angiolinfática. A caracterização de invasão angiolinfática está ilustrada na figura 7.

Duzentos e noventa e um tumores (79,1%) não apresentavam necrose.

A maior parte das neoplasias apresentavam pigmento melânico acentuado (137 casos - 37,2%). Cinquenta e três (14,4%) melanomas eram amelanóticos (melanina ausente).

A fase de crescimento mais frequente era a vertical, em 313 (85,1%) casos.

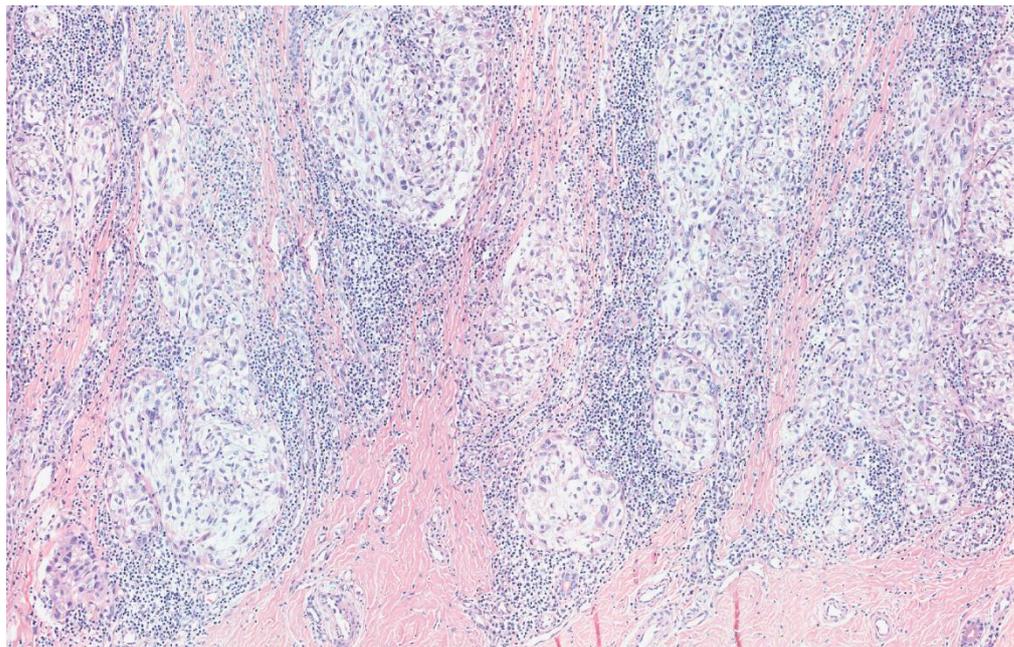


Figura 2 – Infiltrado linfocítico tumoral ativo. Fotomicrografia da neoplasia do paciente ID 33. O linfócitos estão presentes em toda a base da lesão e também permeiam as células neoplásicas. Lâmina escaneada, corada em HE, equivalente a aumento aproximado de 200x.

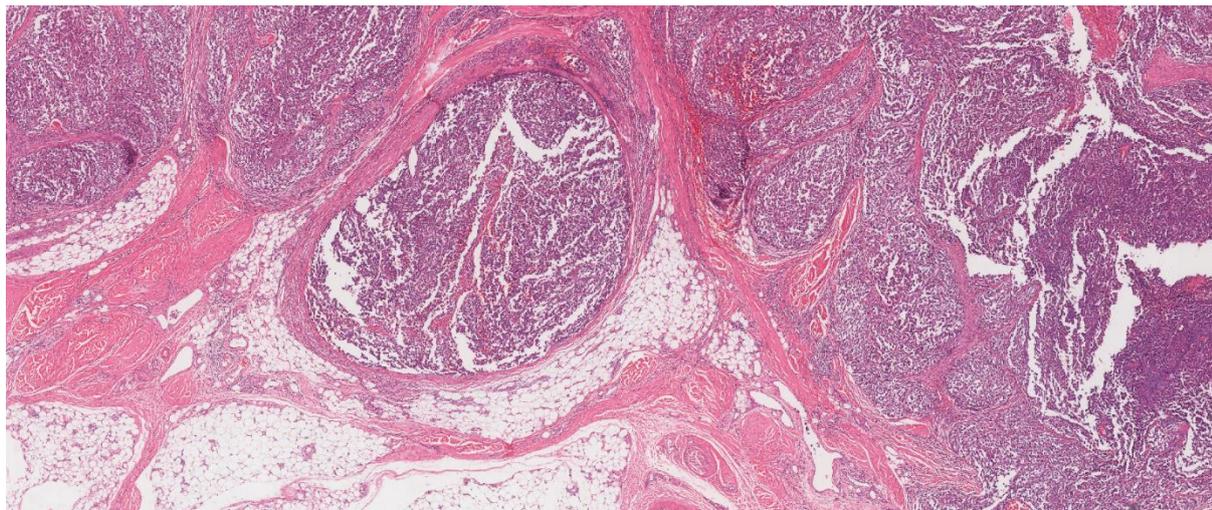


Figura 3 – Infiltrado linfocítico tumoral inativo. Fotomicrografia da neoplasia do paciente ID 93. O linfócitos estão presentes em parte da base da lesão, principalmente no canto inferior direito. Lâmina escaneada, corada em HE, equivalente a aumento aproximado de 100x.

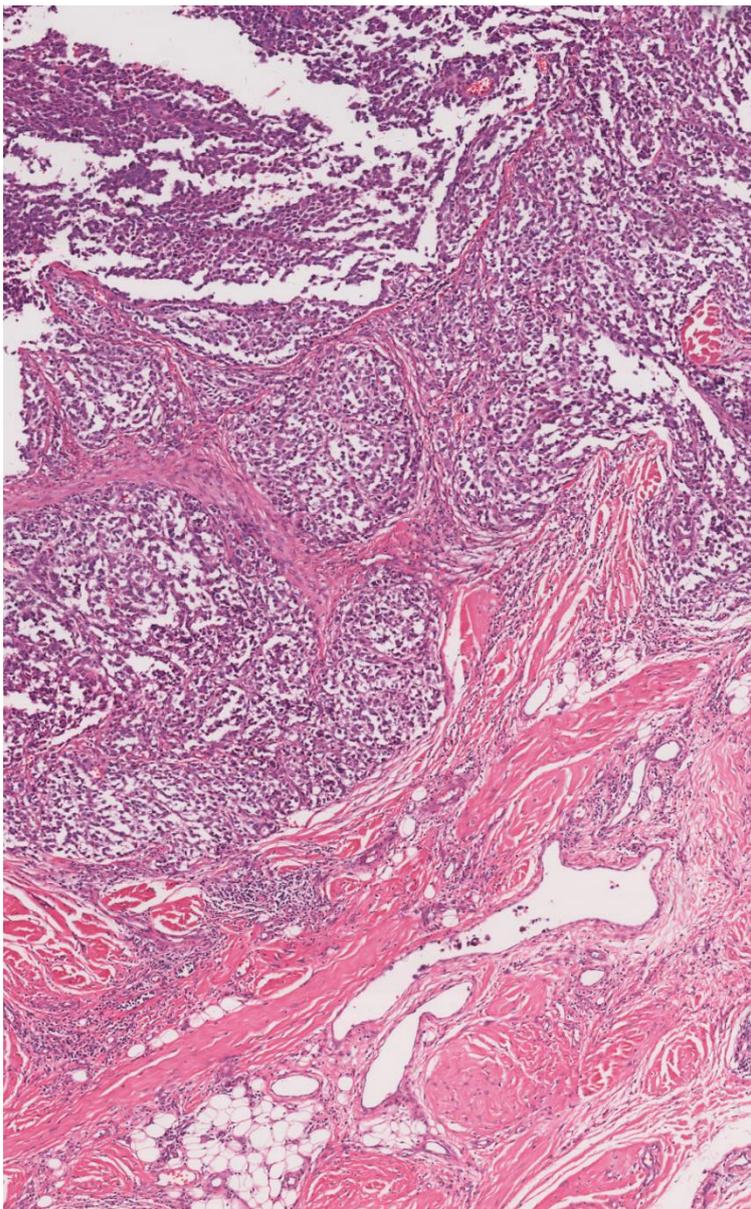


Figura 4 – Infiltrado linfocítico tumoral inativo. Fotomicrografia da neoplasia do paciente ID 93. Detalhe do canto inferior direito ilustrado na figura 3, mostrando os linfócitos em íntimo contato com as células neoplásicas. Lâmina escaneada, corada em HE, equivalente a aumento aproximado de 200x.

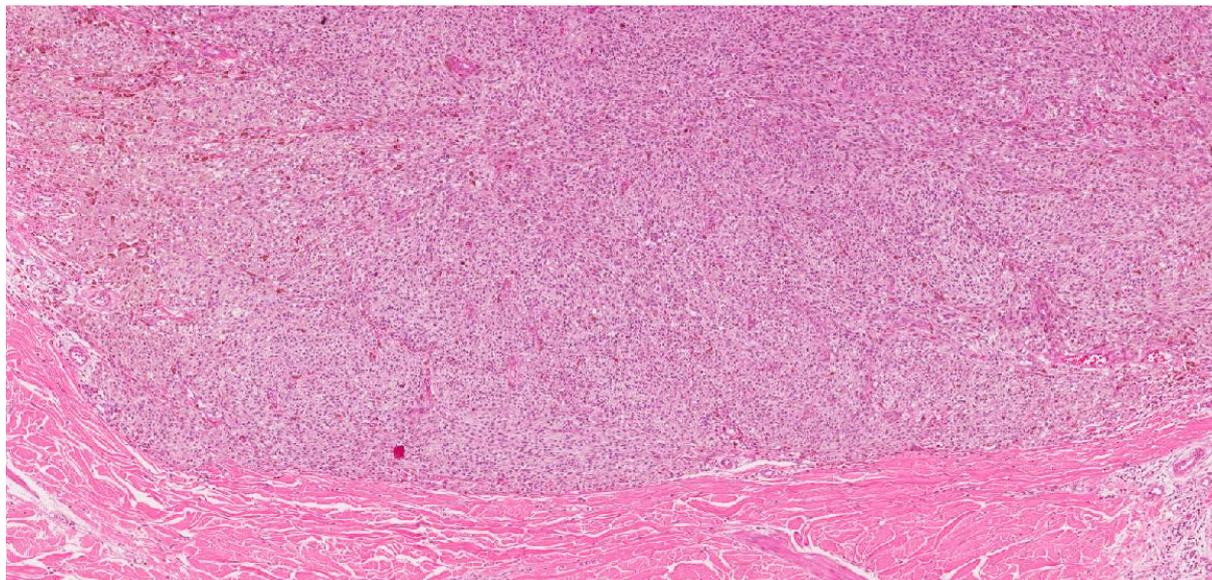


Figura 5 – Infiltrado linfocítico tumoral ausente. Fotomicrografia da neoplasia do paciente ID 89. Não há linfócitos em toda a base da lesão. Lâmina escaneada, corada em HE, equivalente a aumento aproximado de 100x.

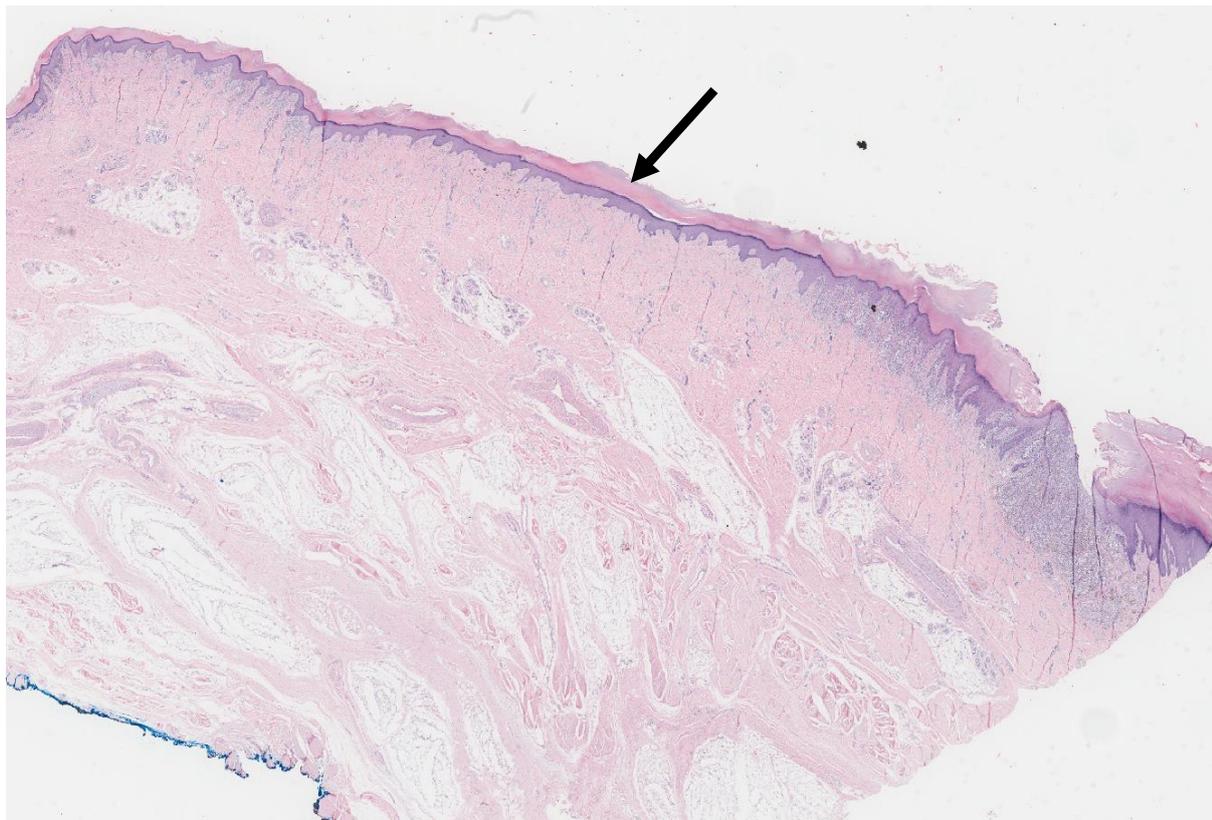


Figura 6 – Regressão. Fotomicrografia da neoplasia do paciente ID 16. No centro (indicado pela seta), nota-se ausência de células neoplásicas. Ver figura 7, a seguir, para maiores detalhes. Lâmina escaneada, corada em HE, equivalente a aumento aproximado de 100x.

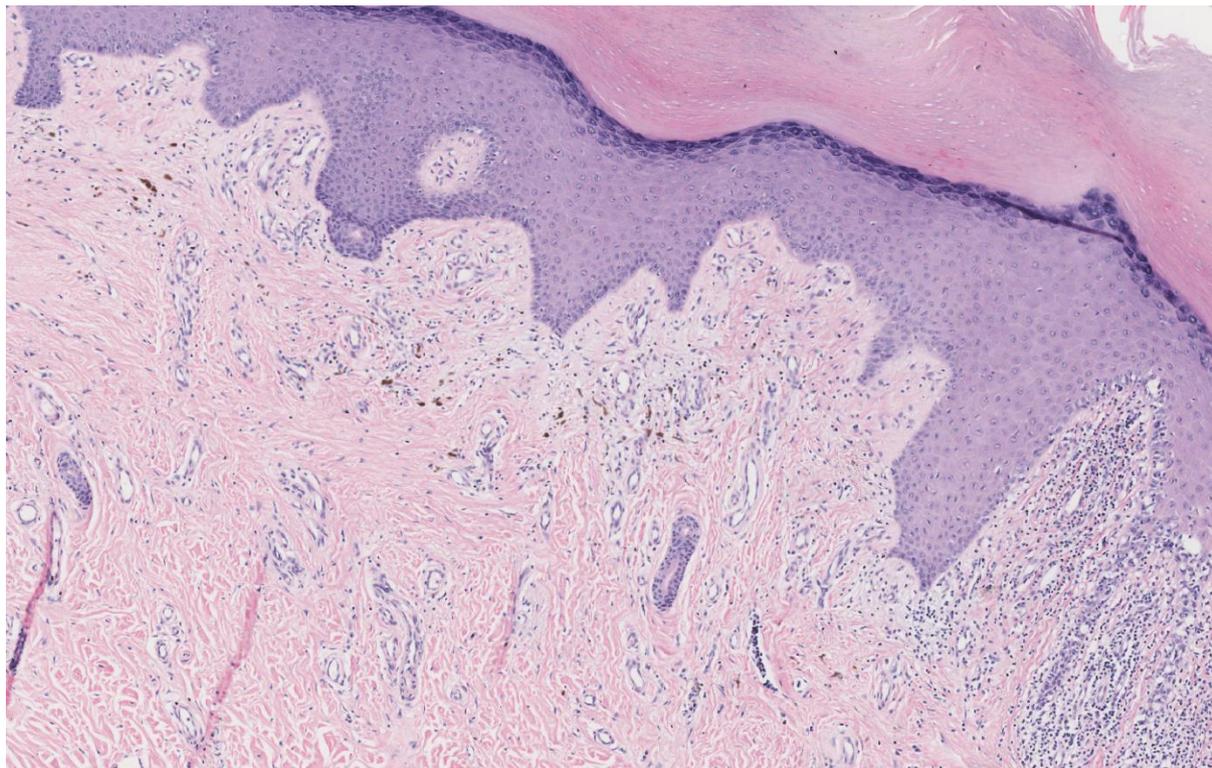


Figura 7 – Regressão. Fotomicrografia da neoplasia do paciente ID 16. Detalhe do centro ilustrado na figura 6. Nota-se ausência de células neoplásicas, nesta região. A derme subjacente mostra fibroplasia, proliferação vascular e melanófagos. Lâmina escaneada, corada em HE, equivalente a aumento aproximado de 200x.

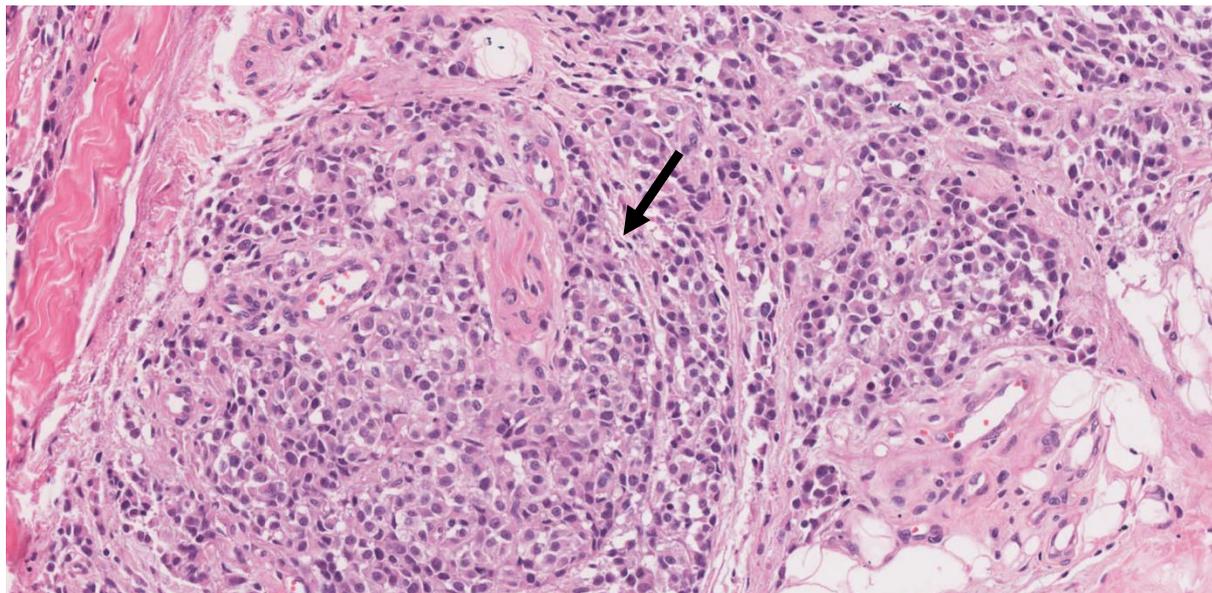


Figura 8 – Invasão perineural. Fotomicrografia da neoplasia do paciente ID 75. As células neoplásicas estão presentes ao redor do nervo (indicado pela seta). Lâmina escaneada, corada em HE, equivalente a aumento aproximado de 400x.

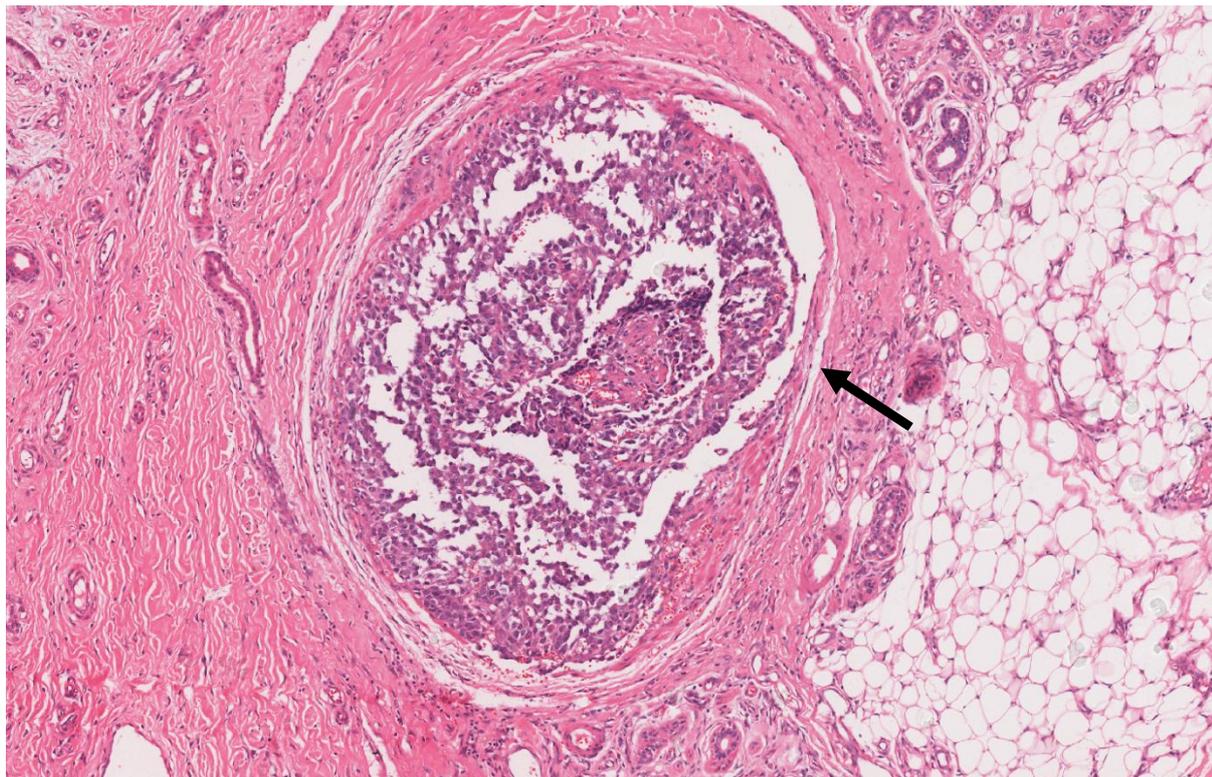


Figura 9 – Invasão angiolinfática. Fotomicrografia da neoplasia do paciente ID 93. As células neoplásicas estão presentes dentro de estrutura vascular (indicada pela seta). Lâmina escaneada, corada em HE, equivalente a aumento aproximado de 400x.

8.3 Variantes de BRAF

Foi realizada extração do DNA de 368 amostras. A quantificação de DNA foi realizada por leitura de absorvância em espectrofotômetro, variando de - 2,3 ng/ μ l a 501,65 ng/ μ l.

Foram feitas reações para amplificação (reação em cadeia da polimerase – PCR) do éxon 15 do BRAF destas 368 amostras, que foram avaliadas em gel de agarose a 2% contendo gel red e consideradas satisfatórias em 261 amostras.

Após revisão de todos os casos no programa Chromas Pro, cento e oitenta e quatro sequenciamentos apresentaram parâmetros satisfatórios para análise. Destes, vinte e três apresentaram variantes em BRAF, o que correspondia a 12,5% das amostras com

sequenciamento satisfatório. Destas, 26% eram V600E. A descrição das variantes foi resumida na Tabela 2.

Tabela 2 – Variantes do éxon 15 do BRAF

ID	DNA	RNA _m	PROTEÍNA	AA	DbSNP	COSMIC	ClinVAr
17	176344C>T	INTRÔNICA	INTRÔNICA				
23	176444G>A,605S>N	NM_004333.6:c.1814G>A	NP_004324.2:p.Ser605Asn	p.S605N	rs121913373	COSM1136	376283
23	176446G>GA,606G>R	NM_004333.6:c.1816G>A	NP_004324.2:p.Gly606Arg	p.G606R		COSM27640	
26	176435C>T,602S>F	NM_004333.6:c.1805C>T	NP_004324.2:p.Ser602Phe	p.S602F			
42	176429T>TA,600V>V/E	NM_004333.6:c.1799T>A	NP_004324.2:p.Val600Glu	p.V600E	rs113488022	COSM476	13961
50	176448G>GC,606G>G/G	NM_004333.6: c.1818G>T	NP_004324.2:p.Gly606Gly	p.G606G		COSM5805301	
79	176398G>GA,590V>V/I	NM_004333.6: c.1768G>A	NP_004324.2:p.Val590Ile	p.V590I		COSM51383	
93	176429T>TA,600V>V/E	NM_004333.6:c.1799T>A	NP_004324.2:p.Val600Glu	p.V600E	rs113488022	COSM476	13961
96	176429T>TA,600V>V/E	NM_004333.6:c.1799T>A	NP_004324.2:p.Val600Glu	p.V600E	rs113488022	COSM476	13961
164	176372A>AG,581N>N/S	NM_004333.6:c.1742A>G	NP_004324.2:p.Asn581Ser	p.N581S	rs121913370	COSM462	
168	176429T>TA,600V>V/E	NM_004333.6:c.1799T>A	NP_004324.2:p.Val600Glu	p.V600E	rs113488022	COSM476	13961
202	176432A>AG,601K>K/R	NM_004333.6:c.1802A>G	NP_004324.2:p.Lys601Arg	p.K601R		COSM133625	
204	176474G>GA,615G>G/E	NM_004333.6:c.1843G>G/A	NP_004324.2:p. Gly615Glu	p.G615E			
223	176351C>CT	INTRÔNICA	INTRÔNICA				
223	176419C>CT,597L>L/L	NM_004333.6:c.1789C>T	NP_004324.2:p.Leu597Leu	p.L597=	rs121913369	COSM133632	

ID	DNA	RNA _m	PROTEÍNA	AA	DbSNP	COSMIC	ClinVAr
233	176469G>GA:613L>L/L	NM_004333.6:c.1839G>A	NP_004324.2:p.Leu613Leu	p.L613=		COSM9158986	
235	176477C>CT,616S>S/F	NM_004333.6:c.1847 C>T	NP_004324.2:p.Ser616Phe	p.S616F		COSM27373	
247	176415T>TG:595F>F/L	NM_004333.6:c.1785T>G	NP_004324.2:p.Phe595Leu	p.F595L		COSM468	
265	176429T>TA:600V>V/E	NM_004333.6:c.1799T>A	NP_004324.2:p.Val600Glu	p.V600E			
278	176437C>CT:603R>R/X	NM_004333.6:c.1807C>C/T	NP_004324.2: p.Arg603X	p.R603X		COSM33729	
308	176500G>A	INTRÔNICA	INTRÔNICA				
329	176437C>T:603R>X	NM_004333.6:c.1807C>C/T	NP_004324.2:p.Arg603X	p.R603X		COSM33729	
331	176320G>GC	INTRÔNICA	INTRÔNICA				
361	176471C>CT,614S>S/F	NM_004333.6:c.1841G>A	NP_004324.2:p.Ser603Phe	p.S614F		COSM6856709	
371	176429T>TA,600V>V/E	NM_004333.6:c.1799T>A	NP_004324.2:p.Val600Glu	pV600E	rs113488022	COSM476	13961

ID: identificação do paciente; DNA: alteração no ácido desoxirribonucleico; RNA_m: alteração no ácido ribonucleico mensageiro; AA: alteração do aminoácido;

DbSNP: *Single Nucleotide Polymorphism database*; COSMIC: *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*; ClinVar: Base de dados do *National Institutes of Health*.

8.3.1 Descrição das variantes do éxon 15 do BRAF

- 1) ID 17 - 176344C>T – É uma variante intrônica, de significado incerto, não reportada nas bases de dados ClinVar, COSMIC ou DbSNP.

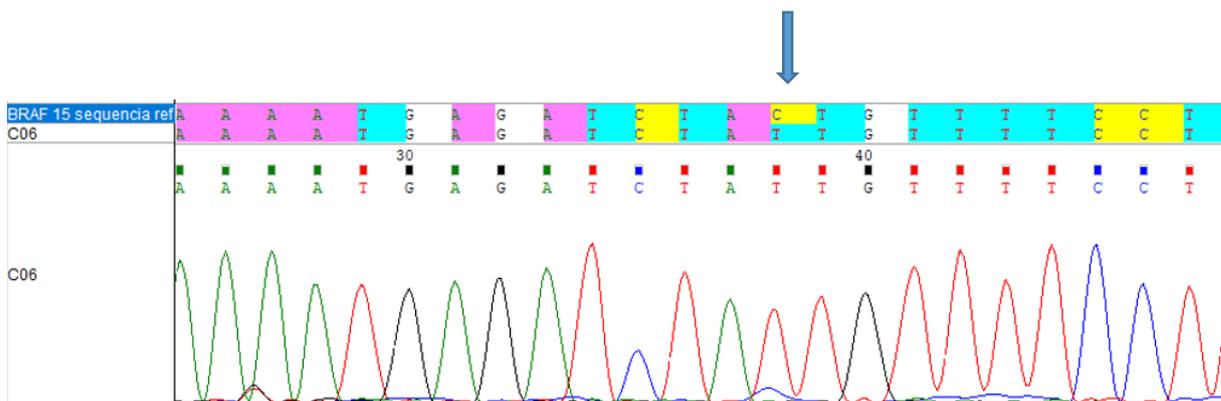


Figura 10 – Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 17. “BRAF 15 sequencia ref” refere-se à sequência de parte do éxon 15 do gene BRAF de acordo com a sequência referência NM_004333.6. C06 representa a sequência da mesma parte do gene BRAF amplificada a partir da amostra do paciente ID 17. As sequências da figura ilustram os nucleotídeos indicados pelo programa de análise. Os picos de diferentes cores representam os diferentes nucleotídeos desta sequência. A seta indica a substituição de um C (azul) por um T (vermelho) na posição 176344, de acordo com NM_004333.6. A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina.

- 2) ID 23 - 176444G>GA, 605S>S/N; 176446G>GA, 606G>G/R – Estas variantes apareceram numa mesma amostra e determinam a troca do aminoácido Serina por Asparagina no códon 605 e de Glicina por Arginina, no códon 606, respectivamente. A primeira, na base de dados DbSNP, está identificada como rs121913373, classificada como provavelmente patogênica. Na base de dados COSMIC está identificada como COSM1136. No ClinVar, está identificada como 376283. Foi descrita em melanoma extensivo superficial. (DEICHMANN et al., 2004) (DEICHMANN et al., 2006). A segunda variante presente nesta amostra não foi encontrada no DbSNP e está identificada no COSMIC como COSM27640,

classificada como patogênica. Foi descrita em adenocarcinoma pulmonar (KINNO et al., 2014), em tumor papilífero muconodular ciliado pulmonar (KAMATA et al., 2016) e em adenoma sebáceo cutâneo. (HARVEY et al., 2016).

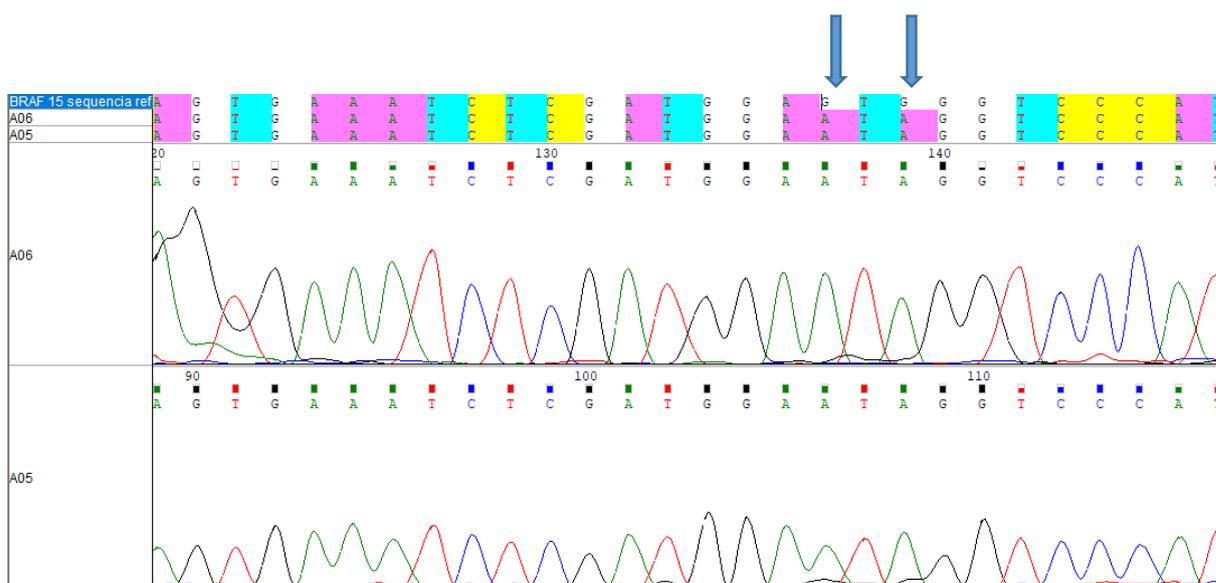


Figura 11 – Eletroferograma ilustrando as variantes encontradas na amostra do paciente ID 23. “BRAF 15 sequencia ref” refere-se à sequência de parte do éxon 15 do gene BRAF de acordo com a sequência referência NM_004333.6. A05 e A06 representam a sequência da mesma parte do gene BRAF amplificada a partir da amostra do paciente ID 23. As sequências da figura ilustram os nucleotídeos indicados pelo programa de análise. Os picos de diferentes cores representam os diferentes nucleotídeos desta sequência. A seta da esquerda indica a substituição de um G (preto) por um A (verde) na posição 176444, de acordo com NM_004333.6. A seta da direita indica a substituição de um G (preto) por um A (verde) na posição 176446, de acordo com NM_004333.6. A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina.

3) ID 26 - 176435C>T; 602S>F – Determina a troca do aminoácido Serina por Fenilalanina no códon 602. Esta variante não está descrita em melanoma nas

bases de dados consultadas (ClinVar, DbSNP e COSMIC). Foi descrita em 2021, em carcinoma mucinoso ovariano de duas pacientes. (CHAO et al., 2021).

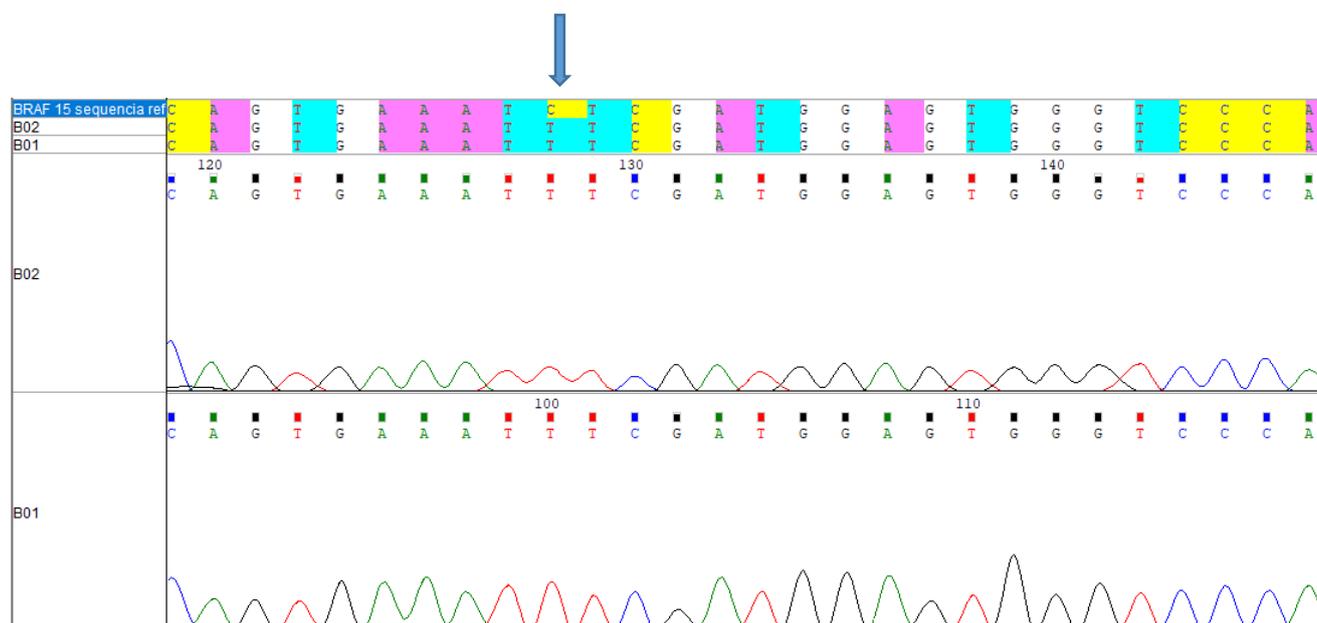


Figura 12 – Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 26. “BRAF 15 sequencia ref” refere-se à sequência de parte do éxon 15 do gene BRAF de acordo com a sequência referência NM_004333.6. B01 e B02 representam a sequência da mesma parte do gene BRAF amplificada a partir da amostra do paciente ID 26. As sequências da figura ilustram os nucleotídeos indicados pelo programa de análise. Os picos de diferentes cores representam os diferentes nucleotídeos desta sequência. A seta indica a substituição de um C (azul) por um T (vermelho) na posição 176435, de acordo com NM_004333.6. A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina.

- 4) ID 42, ID 93, ID 96, ID 168, ID 265, ID 371 - 176429T>TA,600V>V/E – Determina a substituição de Valina por Ácido Glutâmico no códon 600. É a mais importante variante encontrada em melanomas, sendo a mais prevalente dentre as variantes de BRAF. (SI et al., 2012)(LONG et al., 2011)(CHENG et al., 2018).

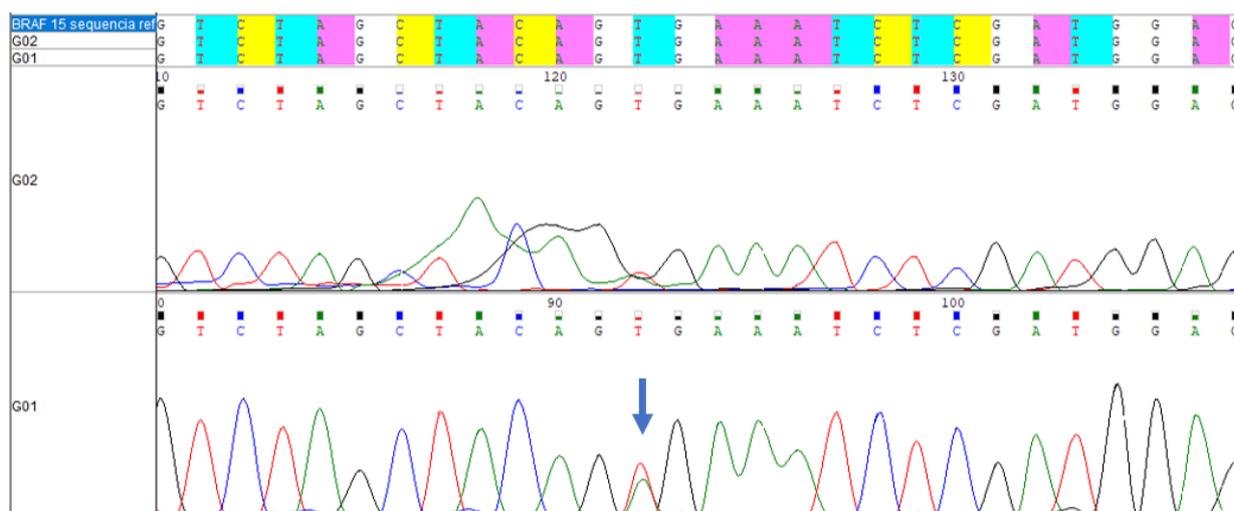


Figura 13 – Eletroferograma ilustrando a variante encontrada nas amostras dos pacientes ID 42, ID 93, ID 96, ID 168, ID 265 e ID 371. “BRAf 15 sequencia ref” refere-se à sequência de parte do éxon 15 do gene BRAf de acordo com a sequência referência NM_004333.6. G01 e G02 representam a sequência da mesma parte do gene BRAf amplificada a partir das amostras destes pacientes. As sequências da figura ilustram os nucleotídeos indicados pelo programa de análise. Os picos de diferentes cores representam os diferentes nucleotídeos desta sequência. A seta indica a substituição de um T (vermelho) por um A (verde) na posição 176429, de acordo com NM_004333.6. A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina.

5) ID 50 - 176448G>GC,606G>G/G – Nomeada COSM5805301 no COSMIC. Variante silenciosa, pois embora tenha havido troca de bases, não houve mudança no aminoácido codificado (Glicina). Isso é explicado devido ao código genético ser degenerado, ou seja, um mesmo aminoácido pode ser codificado por mais de uma trinca de nucleotídeos. Esta variante foi encontrada em microcarcinoma papilífero da tireoide. (CAMESELLE-TEIJEIRO et al., 2009). Esta variante não está descrita em melanoma nas bases de dados consultadas (ClinVar, DbSNP e COSMIC).

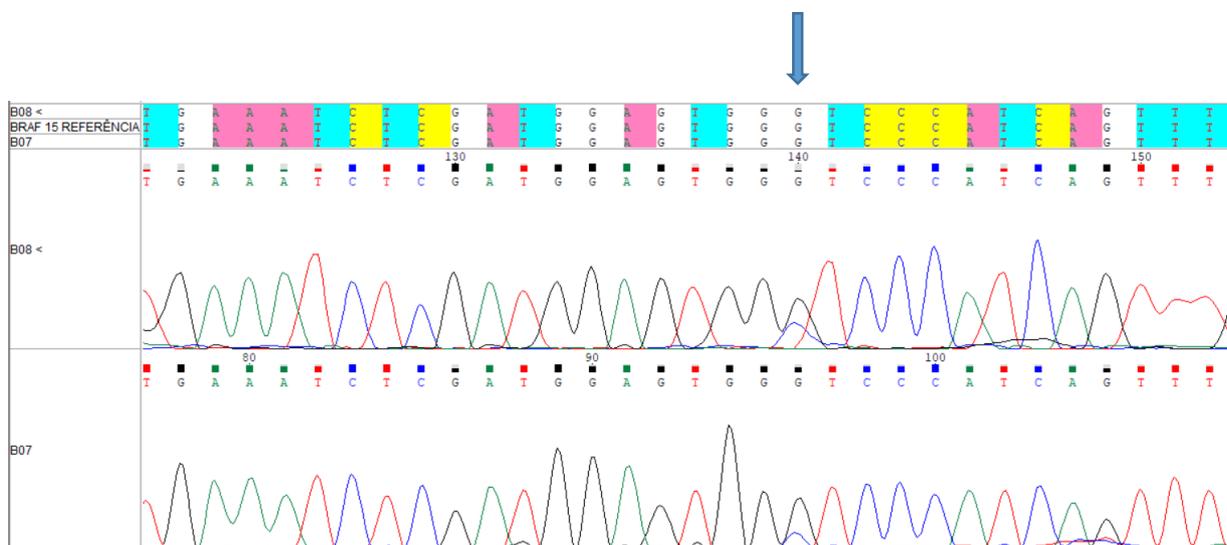


Figura 14 – Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 50. “BRAF 15 REFERÊNCIA” refere-se à sequência de parte do éxon 15 do gene BRAF de acordo com a sequência referência NM_004333.6. B07 e B08 representam a sequência da mesma parte do gene BRAF amplificada a partir da amostra do paciente ID 50. As sequências da figura ilustram os nucleotídeos indicados pelo programa de análise. Os picos de diferentes cores representam os diferentes nucleotídeos desta sequência. A seta indica a substituição de um G (preto) por um C (azul) na posição 176448, de acordo com NM_004333.6. A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina.

- 6) ID 79 - 176398G>GA,590V>V/I – Determina a substituição de Valina por Isoleucina no códon 590. Nomeada COSM51383 no COSMIC, classificada como patogênica. Não reportada no DbSNP ou no ClinVar. Foi descrita em um carcinoma adenoide cístico de glândula salivar. (TETSU et al., 2010). Esta variante não está descrita em melanoma nas bases de dados consultadas (ClinVar, DbSNP e COSMIC).

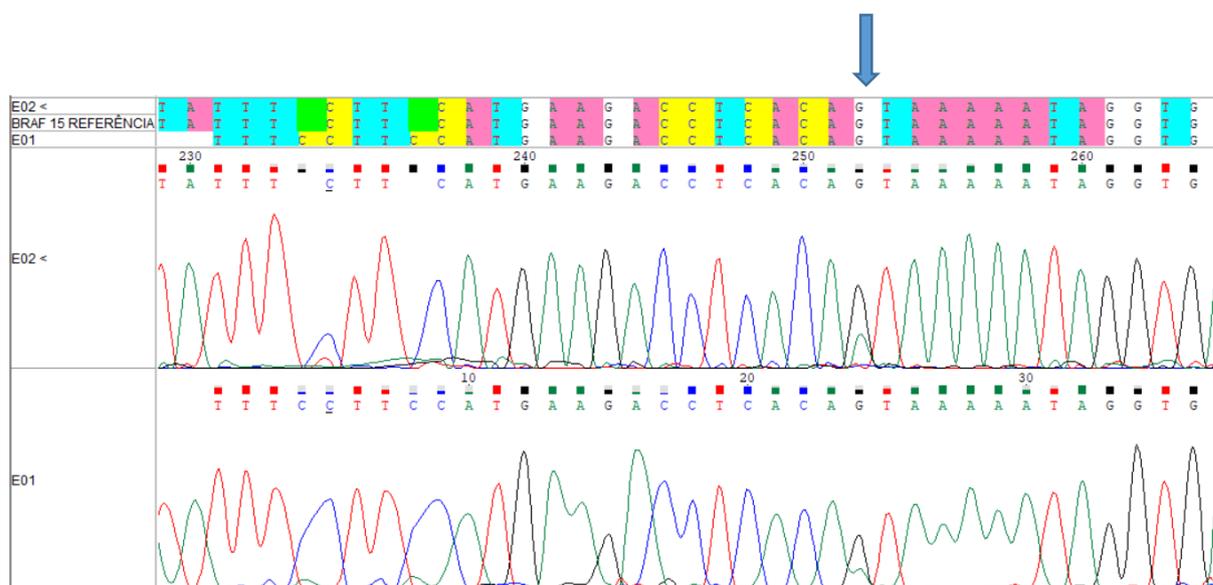


Figura 15 – Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 79. “BRAF 15 REFERÊNCIA” refere-se à sequência de parte do éxon 15 do gene BRAF de acordo com a sequência referência NM_004333.6. E01 e E02 representam a sequência da mesma parte do gene BRAF amplificada a partir da amostra do paciente ID 79. As sequências da figura ilustram os nucleotídeos indicados pelo programa de análise. Os picos de diferentes cores representam os diferentes nucleotídeos desta sequência. A seta indica a substituição de um G (preto) por um A (verde) na posição 176398, de acordo com NM_004333.6. A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina.

- 7) ID 164 - 176372A>AG,581N>N/S – Nomeada COSM462 no COSMIC e rs121913370 no DbSNP. Classificada como provavelmente patogênica. Determina a substituição de Asparagina por Serina no códon 581. Descrita em neoplasias de vários órgãos, inclusive melanoma. (SUEHIRO et al., 2008)(BOTTILLO et al., 2009)(BOARD et al., 2009)(ZHANG et al., 2014)(VAN DE NES et al., 2016)(BONHOMME et al., 2017).

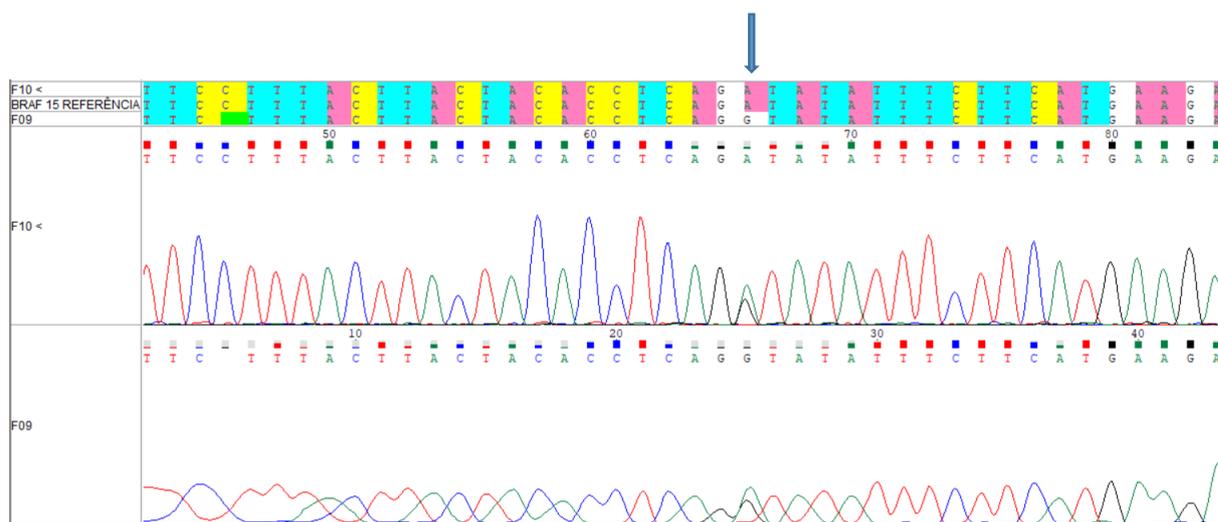


Figura 16 – Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 164. “BRAF 15 REFERÊNCIA” refere-se à sequência de parte do éxon 15 do gene BRAF de acordo com a sequência referência NM_004333.6. F09 e F10 representam a sequência da mesma parte do gene BRAF amplificada a partir da amostra do paciente ID 164. As sequências da figura ilustram os nucleotídeos indicados pelo programa de análise. Os picos de diferentes cores representam os diferentes nucleotídeos desta sequência. A seta indica a substituição de um A (verde) por um G (preto) na posição 176372, de acordo com NM_004333.6. A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina.

- 8) ID 202 – AMOSTRA 303 - 176432A>AG,601K>K/R; COSM133625. Determina a substituição de Lisina por Arginina no códon 601. Descrita em melanoma acral. (CAMESELLE-TEIJEIRO et al., 2009)(LIN et al., 2011). Alguns estudos citam outras variantes neste mesmo códon, em melanoma acral (DIKA et al., 2020)(YEH et al., 2019)(MOON et al., 2018), em melanoma de pele não cronicamente exposta ao sol e em melanoma de mucosa. (LIN et al., 2011).

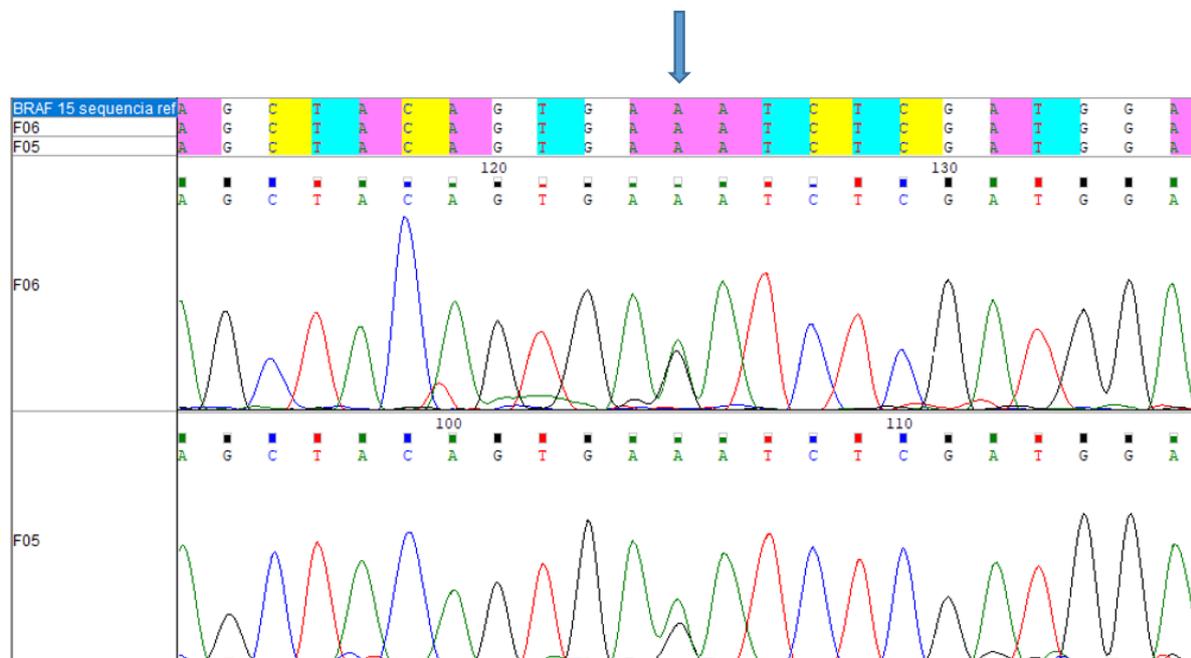


Figura 17 – Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 202. “BRAF 15 sequencia ref” refere-se à sequência de parte do éxon 15 do gene BRAF de acordo com a sequência referência NM_004333.6. F05 e F06 representam a sequência da mesma parte do gene BRAF amplificada a partir da amostra do paciente ID 202. As sequências da figura ilustram os nucleotídeos indicados pelo programa de análise. Os picos de diferentes cores representam os diferentes nucleotídeos desta sequência. A seta indica a substituição de um A (verde) por um G (preto) na posição 176432, de acordo com NM_004333.6. A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina.

9) ID 204 – AMOSTRA 26 - 176474G>GA; 615G>G/E;
 NM_004333.4:c.1843G>G/A. Determina a substituição de Glicina por Ácido Glutâmico no códon 615. Citada em carcinoma papilífero da tireoide. (KOWALIK et al., 2014). Não

reportada nas bases de dados consultadas.

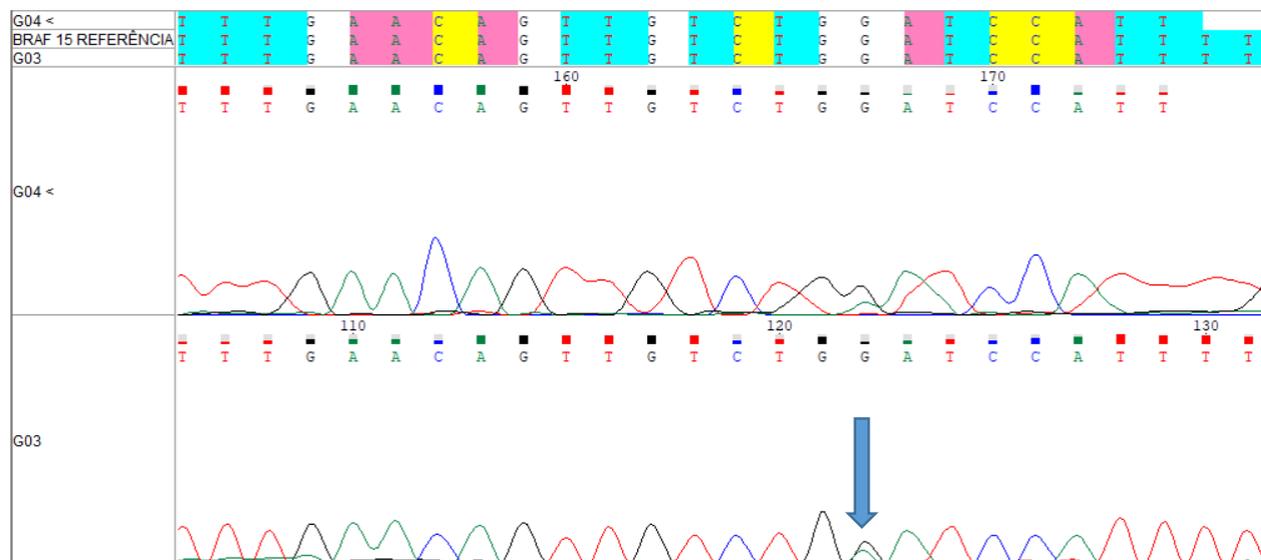


Figura 18 – Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 204. “BRAF 15 REFERÊNCIA” refere-se à sequência de parte do éxon 15 do gene BRAF de acordo com a sequência referência NM_004333.6. G03 e G04 representam a sequência da mesma parte do gene BRAF amplificada a partir da amostra do paciente ID 204. As sequências da figura ilustram os nucleotídeos indicados pelo programa de análise. Os picos de diferentes cores representam os diferentes nucleotídeos desta sequência. A seta indica a substituição de um G (preto) por um A (verde) na posição 176474, de acordo com NM_004333.6. A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina.

10) ID 223 – Esta amostra apresenta duas variantes:

10.1) 176351C>CT. Variante intrônica. Não encontrada nas bases de dados consultadas.

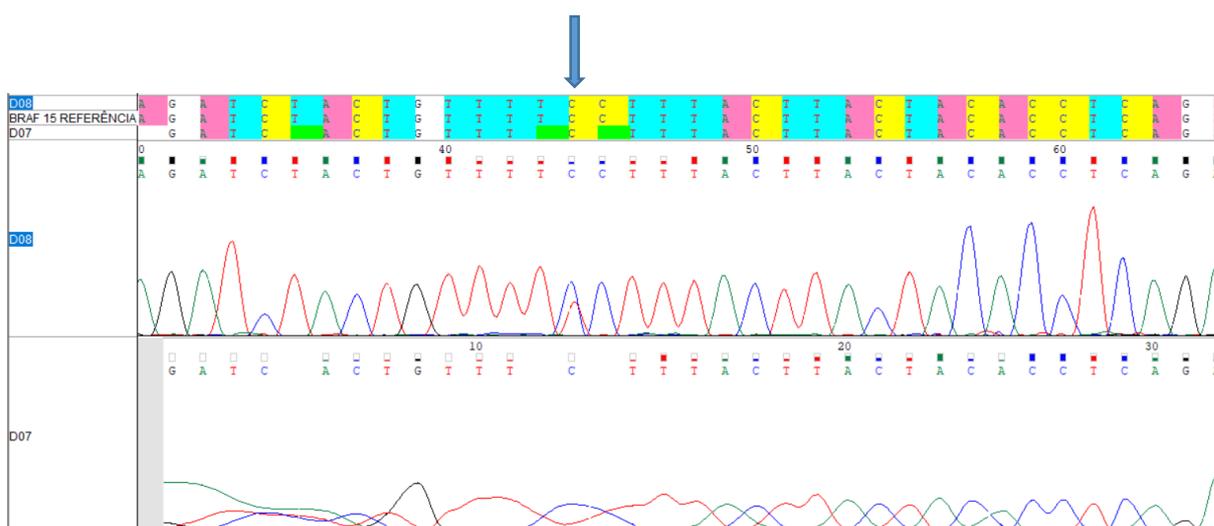


Figura 19 – Eletroferograma ilustrando uma das variantes encontradas na amostra do paciente ID 223. “BRAF 15 REFERÊNCIA” refere-se à sequência de parte do éxon 15 do gene BRAF de acordo com a sequência referência NM_004333.6. D07 e D08 representam a sequência da mesma parte do gene BRAF amplificada a partir da amostra do paciente ID 223. As sequências da figura ilustram os nucleotídeos indicados pelo programa de análise. Os picos de diferentes cores representam os diferentes nucleotídeos desta sequência. A seta indica a substituição de um C (azul) por um T (vermelho) na posição 176351, de acordo com NM_004333.6. A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina.

10.2) 176419C>CT,597L>L/L; COSM133632; rs121913369. Variante silenciosa, pois embora tenha havido troca de bases, não houve mudança no aminoácido codificado (Leucina). Descrita em carcinoma basocelular (LIN et al., 2011)(STAMATELLI et al., 2011) e em carcinoma papilífero da tireoide. (TOUNSI GUETTITI et al., 2022). Uma variante neste códon foi encontrada em melanoma cutâneo não acral. (DUTTON-REGESTER et al., 2013).

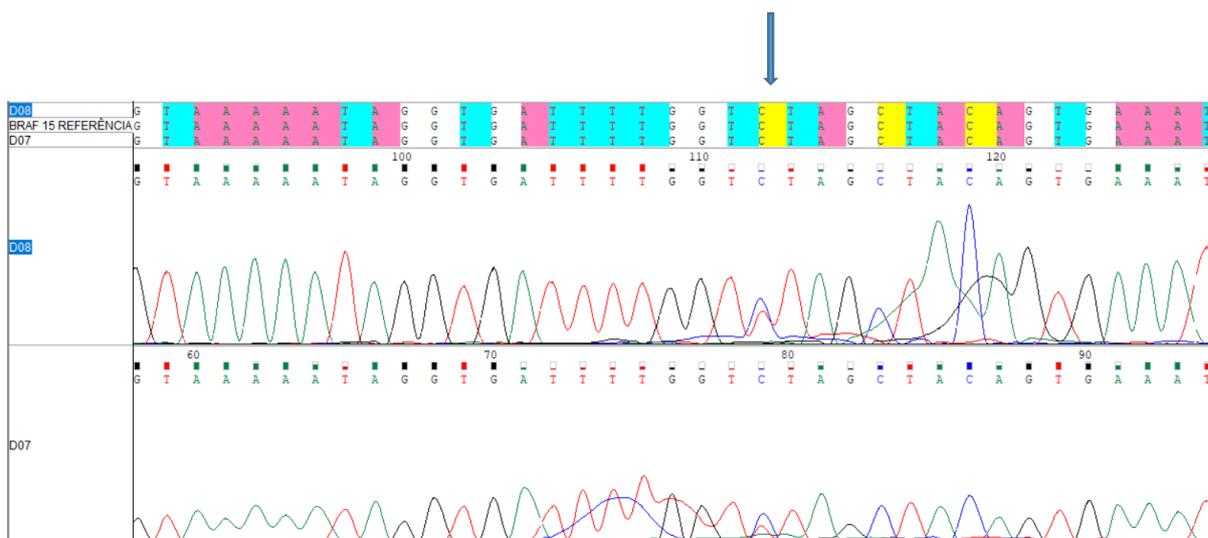


Figura 20 – Eletroferograma ilustrando uma das variantes encontradas na amostra do paciente ID 223. “BRAF 15 REFERÊNCIA” refere-se à sequência de parte do éxon 15 do gene BRAF de acordo com a sequência referência NM_004333.6. D07 e D08 representam a sequência da mesma parte do gene BRAF amplificada a partir da amostra do paciente ID 223. As sequências da figura ilustram os nucleotídeos indicados pelo programa de análise. Os picos de diferentes cores representam os diferentes nucleotídeos desta sequência. A seta indica a substituição de um C (azul) por um T (vermelho) na posição 176419, de acordo com NM_004333.6. A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina.

- 11) ID 233 - 176469G>GA:613L>L/L. Variante silenciosa, pois embora tenha havido troca de bases, não houve mudança no aminoácido codificado (Leucina). Nomeada COSM9158986 no COSMIC. Variantes neste códon foram descritas em mieloma múltiplo. (TESSOULIN et al., 2018). Esta variante não está descrita em melanoma nas bases de dados consultadas (ClinVar, DbSNP e COSMIC).

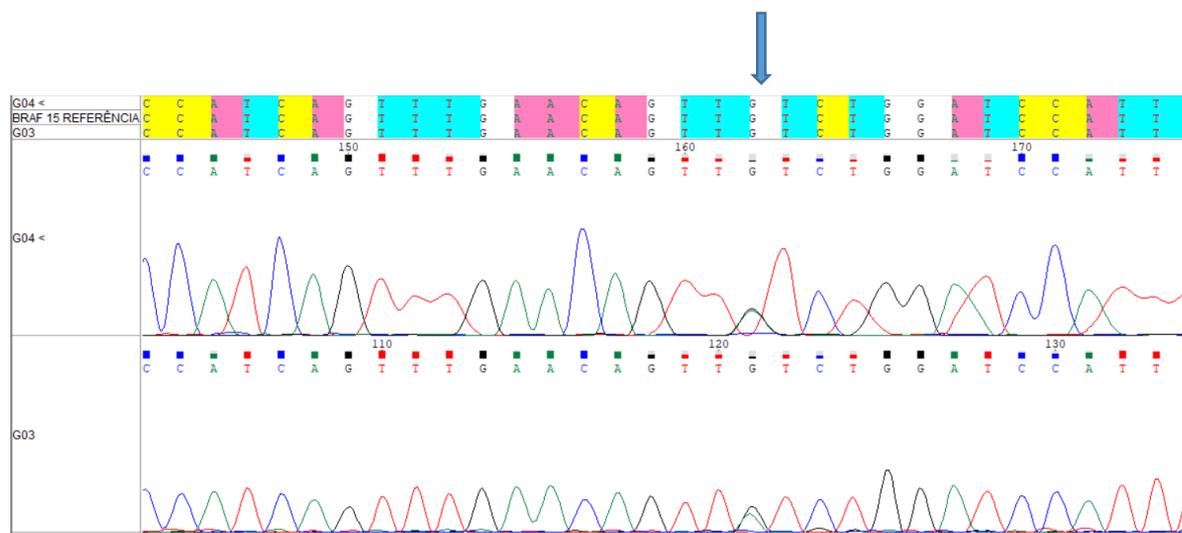


Figura 21 – Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 233. “BRAF 15 REFERÊNCIA” refere-se à sequência de parte do éxon 15 do gene BRAF de acordo com a sequência referência NM_004333.6. G03 e G04 representam a sequência da mesma parte do gene BRAF amplificada a partir da amostra do paciente ID 233. As sequências da figura ilustram os nucleotídeos indicados pelo programa de análise. Os picos de diferentes cores representam os diferentes nucleotídeos desta sequência. A seta indica a substituição de um G (preto) por um A (verde) na posição 176469, de acordo com NM_004333.6. A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina.

12) ID 235 – 176477C>CT,616S>S/F. Nomeada COSM27373 no COSMIC.

Determina a troca do aminoácido Serina por Fenilalanina no códon 616. Descrita em melanoma de mucosa (SI et al., 2012), em carcinoma de tireoide (TOUNSI GUETTITI et al., 2022) e em carcinoma ductal de pâncreas. (SCHÖNLEBEN et al., 2008).

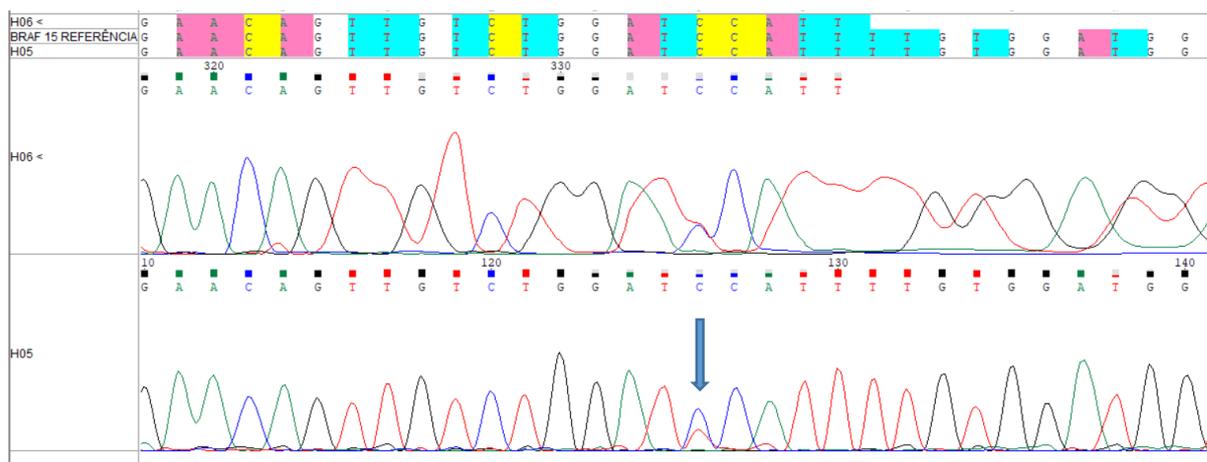


Figura 22 – Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 235. “BRAF 15 REFERÊNCIA” refere-se à sequência de parte do éxon 15 do gene BRAF de acordo com a sequência referência NM_004333.6. H05 e H06 representam a sequência da mesma parte do gene BRAF amplificada a partir da amostra do paciente ID 235. As sequências da figura ilustram os nucleotídeos indicados pelo programa de análise. Os picos de diferentes cores representam os diferentes nucleotídeos desta sequência. A seta indica a substituição de um C (azul) por um T (vermelho) na posição 176477, de acordo com NM_004333.6. A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina.

- 13) ID 247 – 176415T>G:595F>F/L. Determina a troca do aminoácido Fenilalanina por Leucina no códon 595. Nomeada COSM468, no COSMIC. Descrita em sarcoma histiocítico (KORDES et al., 2016), em colangiocarcinoma (TANNAPFEL et al., 2003), em carcinoma colorretal (DAVIES et al., 2002) em leucemia de células cabeludas (RUTERING et al., 2016) e em adenocarcinoma pulmonar (LEE et al., 2010). Esta variante não está descrita em melanoma nas bases de dados consultadas (ClinVar, DbSNP e COSMIC).

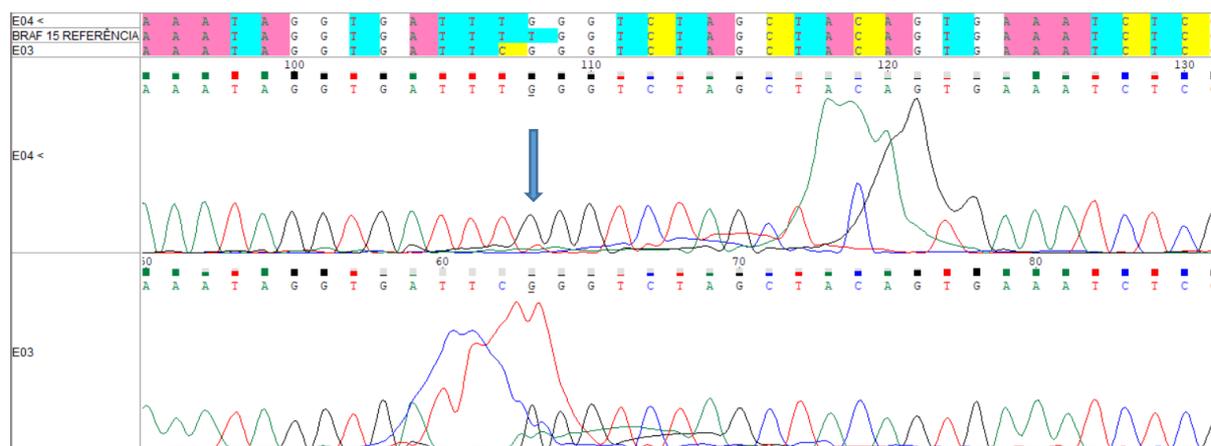


Figura 23 – Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 247. “BRAF 15 REFERÊNCIA” refere-se à sequência de parte do éxon 15 do gene BRAF de acordo com a sequência referência NM_004333.6. E03 e E04 representam a sequência da mesma parte do gene BRAF amplificada a partir da amostra do paciente ID 247. As sequências da figura ilustram os nucleotídeos indicados pelo programa de análise. Os picos de diferentes cores representam os diferentes nucleotídeos desta sequência. A seta indica a substituição de um T (vermelho) por um G (preto) na posição 176415, de acordo com NM_004333.6. A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina.

14) ID 278 e ID 329 - 176437C>CT:603R>R/X. Mutação sem sentido, ou seja, a substitui o das bases nitrogenadas resulta em um códon de parada, encurtando o peptídeo. Nomeada COSM33729 no COSMIC. Descrita em melanoma (PATEL et al., 2013), em carcinoma de endométrio (FENG et al., 2005), em carcinoma basocelular (BONILLA et al., 2016) e em adenocarcinoma gástrico (KOH et al., 2019).

15) ID 308. 176500G>A. Variante intrônica. Não encontrada nas bases de dados consultadas.

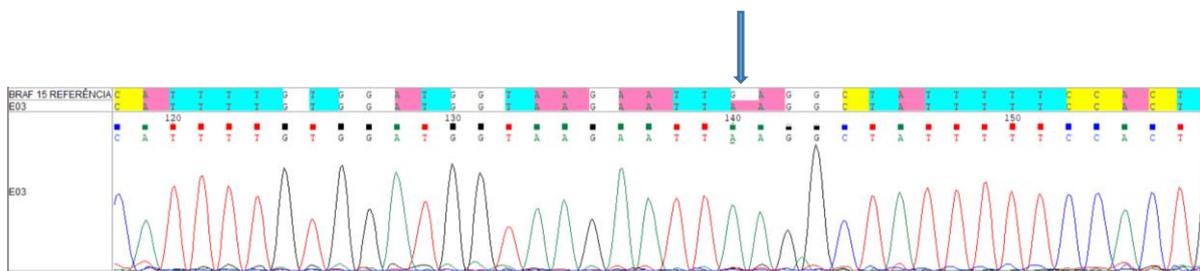


Figura 25 - Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 308. “BRAF 15 REFERÊNCIA” refere-se à sequência de parte do éxon 15 do gene BRAF de acordo com a sequência referência NM_004333.6. E03 representa a sequência da mesma parte do gene BRAF amplificada a partir da amostra do paciente ID 308. As sequências da figura ilustram os nucleotídeos indicados pelo programa de análise. Os picos de diferentes cores representam os diferentes nucleotídeos desta sequência. A seta indica a substituição de um G (preto) por um A (verde) na posição 176500, de acordo com NM_004333.6. A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina.

16) ID 331. 171320G>GC. Variante intrônica. Não encontrada nas bases de dados consultadas.

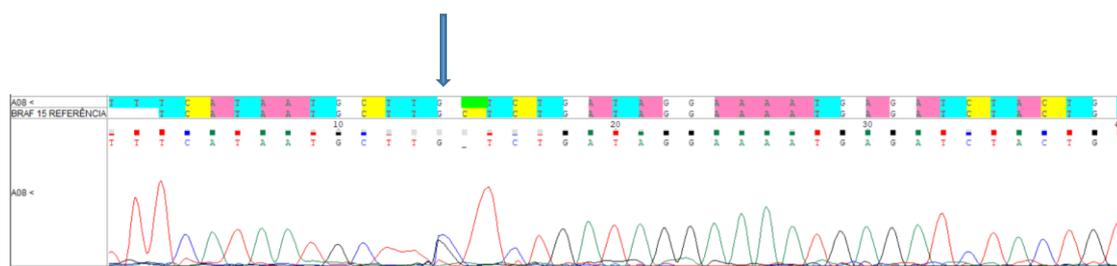


Figura 26 - Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 331. “BRAF 15 REFERÊNCIA” refere-se à sequência de parte do éxon 15 do gene BRAF de acordo com a sequência referência NM_004333.6. A08 representa a sequência da mesma parte do gene BRAF amplificada a partir da amostra do paciente ID 331. As sequências da figura ilustram os nucleotídeos indicados pelo programa de análise. Os picos de diferentes cores representam os diferentes nucleotídeos desta sequência. A seta indica a substituição de um G (preto) por um C (azul) na posição 171320, de acordo com NM_004333.6. A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina.

- 17) ID 361. 176471C>CT,614S>S/F; COSM6856709. Determina a troca do aminoácido Serina por Fenilalanina no códon 614. Descrita em melanoma uveal. (SCHNEIDER et al., 2019).

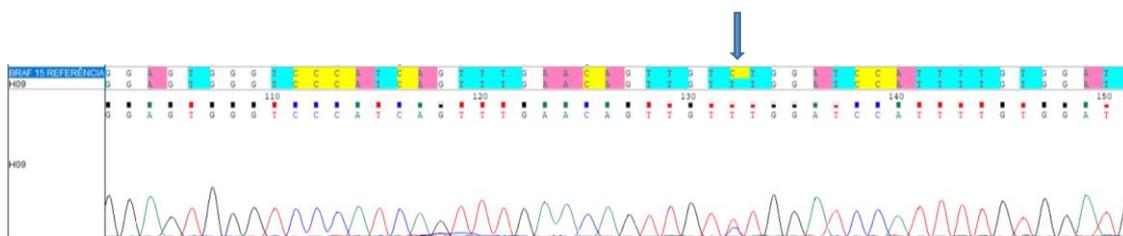


Figura 27 - Eletroferograma ilustrando a variante encontrada na amostra do paciente ID 361. “BRAF 15 REFERÊNCIA” refere-se à sequência de parte do éxon 15 do gene BRAF de acordo com a sequência referência NM_004333.6. H09 representa a sequência da mesma parte do gene BRAF amplificada a partir da amostra do paciente ID 361. As sequências da figura ilustram os nucleotídeos indicados pelo programa de análise. Os picos de diferentes cores representam os diferentes nucleotídeos desta sequência. A seta indica a substituição de um C (azul) por um T (vermelho) na posição 176471, de acordo com NM_004333.6. A: adenina; G: guanina; C: citosina; T: timina.

8.4 Características demográficas e clínico-patológicas por *status* de BRAF

Os resultados das características demográficas e clínico-patológicas dos mutados e dos selvagens podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3. Características demográficas e clínico-patológicas por *status* de BRAF

Características	WT	Mutado	Total	
Total N (%)	161 (87,5)	23 (12,5)	184	
Idade	Mediana (Iiq)	66,0 (57,0 a 75,6)	73,1 (64,0 a 81,6)	66,8 (58,0 a 75,9)

Características		WT	Mutado	Total
Sexo	Masculino	84 (52,2)	7 (30,4)	91 (49,5)
	Feminino	77 (47,8)	16 (69,6)	93 (50,5)
Cor da pele	Branca	94 (58,4)	17 (73,9)	111 (60,3)
	Preta	33 (20,5)	3 (13,0)	36 (19,6)
	Parda	34 (21,1)	3 (13,0)	37 (20,1)
Local da lesão	Plantar	127 (78,9)	16 (69,6)	143 (77,7)
	Palmar	7 (4,3)	1 (4,3)	8 (4,3)
	Subungueal mão	10 (6,2)	3 (13,0)	13 (7,1)
	Subungueal pé	17 (10,6)	3 (13,0)	20 (10,9)
Local dicotomizado	Palmo-plantar	134 (83,2)	17 (73,9)	151 (82,1)
	Subungueal	27 (16,8)	6 (26,1)	33 (17,9)
Estadiamento	0	4 (2,5)	0 (0,0)	4 (2,2)
	IA	9 (5,6)	0 (0,0)	9 (4,9)
	IB	16 (9,9)	1 (4,3)	17 (9,2)
	IIA	21 (13,0)	2 (8,7)	23 (12,5)
	IIB	19 (11,8)	4 (17,4)	23 (12,5)
	IIC	33 (20,5)	8 (34,8)	41 (22,3)
	III	51 (31,7)	6 (26,1)	57 (31,0)
	IV	8 (5,0)	2 (8,7)	10 (5,4)
Estadiamento agrupado	0 e I	29 (18,0)	1 (4,3)	30 (16,3)
	II	73 (45,3)	14 (60,9)	87 (47,3)
	III	51 (31,7)	6 (26,1)	57 (31,0)
	IV	8 (5,0)	2 (8,7)	10 (5,4)
Tipo de amostra	Excisional	144 (89,4)	18 (78,3)	162 (88,0)
	Incisional	17 (10,6)	5 (21,7)	22 (12,0)
Tipo histopatológico	Acral- lentiginoso	138 (85,7)	17 (73,9)	155 (84,2)
	Nodular	16 (9,9)	1 (4,3)	17 (9,2)
	Não avaliável	7 (4,3)	5 (21,7)	12 (6,5)

Características		WT	Mutado	Total
Lesão polipoide	Não	143 (88,8)	21 (91,3)	164 (89,1)
	Sim	18 (11,2)	2 (8,7)	20 (10,9)
Espessura de Breslow	Mediana (Ilq)	4,4 (2,0 a 8,2)	5,0 (3,4 a 6,5)	4,5 (2,2 a 8,0)
Nível de Clark	I	5 (3,1)	0 (0,0)	5 (2,7)
	II	8 (5,0)	0 (0,0)	8 (4,3)
	III	16 (9,9)	1 (4,3)	17 (9,2)
	IV	90 (55,9)	14 (60,9)	104 (56,5)
	V	42 (26,1)	8 (34,8)	50 (27,2)
TIL	Presente	99 (61,5)	13 (56,5)	112 (60,9)
	Ausente	62 (38,5)	10 (43,5)	72 (39,1)
<i>Status</i> TIL	Ativo	39 (24,2)	7 (30,4)	46 (25,0)
	Inativo	60 (37,3)	6 (26,1)	66 (35,9)
	(Ausente)	62 (38,5)	10 (43,5)	72 (39,1)
Grau de atividade TIL	Leve	64 (39,8)	7 (30,4)	71 (38,6)
	Moderada	31 (19,3)	5 (21,7)	36 (19,6)
	Acentuada	4 (2,5)	1 (4,3)	5 (2,7)
	(Ausente)	62 (38,5)	10 (43,5)	72 (39,1)
Microsatelitose	Não	152 (94,4)	22 (95,7)	174 (94,6)
	Sim	9 (5,6)	1 (4,3)	10 (5,4)
Ulceração	Não	67 (41,6)	8 (34,8)	75 (40,8)
	Sim	94 (58,4)	15 (65,2)	109 (59,2)
Tamanho ulceração	Mediana (Ilq)	10,0 (5,0 a 15,0)	10,5 (5,8 a 15,0)	10,0 (5,0 a 15,0)
Regressão	Não	146 (90,7)	23 (100,0)	169 (91,8)
	Sim	15 (9,3)	0 (0,0)	15 (8,2)
Mitoses	Mediana (Ilq)	3,0 (1,0 a 7,0)	4,0 (1,0 a 5,0)	3,0 (1,0 a 6,2)

Características		WT	Mutado	Total
Tipo de célula predominante	Epiteloide	103 (64,0)	19 (82,6)	122 (66,3)
	Fusiforme	46 (28,6)	4 (17,4)	50 (27,2)
	Não se aplica	12 (7,5)	0 (0,0)	12 (6,5)
Invasão angiolinfática	Não	147 (91,3)	16 (69,6)	163 (88,6)
	Sim	14 (8,7)	7 (30,4)	21 (11,4)
Invasão perineural	Não	139 (86,3)	19 (82,6)	158 (85,9)
	Sim	22 (13,7)	4 (17,4)	26 (14,1)
Necrose	Não	132 (82,0)	16 (69,6)	148 (80,4)
	Sim	29 (18,0)	7 (30,4)	36 (19,6)
Melanina	Ausente	22 (13,7)	7 (30,4)	29 (15,8)
	Leve	51 (31,7)	9 (39,1)	60 (32,6)
	Moderada	32 (19,9)	5 (21,7)	37 (20,1)
	Acentuada	56 (34,8)	2 (8,7)	58 (31,5)
Fase de crescimento	Radial	31 (19,3)	1 (4,3)	32 (17,4)
	Vertical	130 (80,7)	22 (95,7)	152 (82,6)

WT: *Wild-type* (selvagem); Iq: Intervalo interquartilico; TIL: Infiltrado linfocítico tumoral.

Comparando os selvagens e mutados, chegamos a resultados interessantes. A mediana de idade dos pacientes com melanoma mutado foi maior do que a mediana de idade dos pacientes com melanoma selvagem, sendo 73,1 anos e 66 anos, respectivamente. A análise multivariada mostrou que esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,026$). No entanto, ao agruparmos apenas os pacientes que apresentaram a variante V600E, nota-se que a mediana de idade destes pacientes foi menor que a dos pacientes cujas neoplasias não apresentavam

esta mutação (ver Tabela 4). Esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,972$).

Tabela 4. Comparação das medianas de idade (V600E x restante do grupo)

Característica		Não V600E	V600E	Total	p
Total N (%)		178 (96,7)	6 (3,3)	184	
Idade	Mediana (Iq)	67,0 (57,9 a 76,0)	65,0 (63,0 a 73,0)	66,8 (58,0 a 75,9)	0,972

Outra característica estatisticamente significativa foi a presença de invasão neoplásica angiolinfática. Dentre os mutados, sete (30,4%) apresentavam invasão angiolinfática, enquanto que 14 (8,7%) selvagens exibiam esta característica. A análise multivariada mostrou $p=0,006$.

A presença de melanina se mostrou estatisticamente significativa na análise univariada ($p=0,045$), sendo 16 pacientes (69,6%) com melanoma melanótico mutado, sete (30,4%) pacientes com melanoma amelanótico mutado, 139 (86,3%) pacientes com melanoma melanótico selvagem e 22 (13,7%) pacientes com melanoma amelanótico selvagem. Esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa na análise multivariada.

Os resultados da associação entre as características demográficas, clínico-patológicas e o *status* de BRAF foram resumidos na Tabela 5.

Tabela 5. Associação entre os fatores demográficos, clínico-patológicos e o *status* de BRAF

Características		WT	Mutado	OR (univariada)	OR (multivariada)
Idade	Mediana (IIq)	66,0 (57,0 a 75,6)	73,1 (64,0 a 81,6)	1,05 (1,01- 1,09, p=0,022)	1,04 (1,01-1,09, p=0,026)
	Sexo				
	Masculino	84 (52,2)	7 (30,4)	-	-
	Feminino	77 (47,8)	16 (69,6)	2,49 (1,01- 6,79 p=0,057)	-
Cor da pele	Branca	94 (58,4)	17 (73,9)	-	-
	Preta	33 (20,5)	3 (13,0)	0,50 (0,11- 1,62, p=0,296)	-
	Parda	34 (21,1)	3 (13,0)	0,49 (0,11- 1,57, p=0,275)	-
Local dicotomizado	Palmo- plantar	134 (83,2)	17 (73,9)	-	-
	Subungueal	27 (16,8)	6 (26,1)	1,75 (0,59- 4,66, p=0,281)	-
Estadiamento	0 e I	29 (18,0)	1 (4,3)	-	-
	II	73 (45,3)	14 (60,9)	5,56 (1,04- 103,06, p=0,105)	-
	III	51 (31,7)	6 (26,1)	3,41 (0,55- 66,11, p=0,267)	-
	IV	8 (5,0)	2 (8,7)	7,25 (0,62- 168,38, p=0,124)	-

Características		WT	Mutado	OR (univariada)	OR (multivariada)
Estadiamento dicotomizado	0 a II	102 (63,4)	15 (65,2)	-	-
	III e IV	59 (36,6)	8 (34,8)	0,92 (0,35- 2,26, p=0,862)	-
Tipo de amostra	Excisional	144 (89,4)	18 (78,3)	-	-
	Incisional	17 (10,6)	5 (21,7)	2,35 (0,71- 6,81, p=0,131)	-
Tipo histopatológico	Acral- lentiginoso	138 (85,7)	17 (73,9)	-	-
	Nodular	16 (9,9)	1 (4,3)	0,51 (0,03- 2,74, p=0,523)	-
	Não avaliável	7 (4,3)	5 (21,7)	5,80 (1,57- 20,28, p=0,006)	-
Lesão polipoide	Não	143 (88,8)	21 (91,3)	-	-
	Sim	18 (11,2)	2 (8,7)	0,76 (0,12- 2,89, p=0,721)	-
Espessura de Breslow	Mediana (IIq)	4,4 (2,0 a 8,2)	5,0 (3,4 a 6,5)	1,01 (0,95- 1,07, p=0,677)	-
Nível de Clark agrupado	I a III	16 (10,8)	1 (4,3)	-	-
	IV	90 (60,8)	14 (60,9)	2,49 (0,45- 46,64, p=0,394)	-
	V	42 (28,4)	8 (34,8)	3,05 (0,50- 58,86, p=0,311)	-

Características		WT	Mutado	OR (univariada)	OR (multivariada)
TIL	Presente	99 (61,5)	13 (56,5)	-	-
	Ausente	62 (38,5)	10 (43,5)	1,23 (0,50- 2,96, p=0,648)	-
<i>Status</i> TIL	Inativo	60 (60,6)	6 (46,2)	-	-
	Ativo	39 (39,4)	7 (53,8)	1,79 (0,56- 5,96, p=0,324)	-
Grau de atividade TIL	Leve	64 (64,6)	7 (53,8)	-	-
	Moderada	31 (31,3)	5 (38,5)	1,47 (0,41- 4,99, p=0,534)	-
	Acentuada	4 (4,0)	1 (7,7)	2,29 (0,11- 18,45, p=0,486)	-
Microsatelitose	Não	152 (94,4)	22 (95,7)	-	-
	Sim	9 (5,6)	1 (4,3)	0,77 (0,04- 4,39, p=0,806)	-
Ulceração	Não	67 (41,6)	8 (34,8)	-	-
	Sim	94 (58,4)	15 (65,2)	1,34 (0,55- 3,49, p=0,534)	-
Tamanho ulceração	Mediana (Iiq)	10,0 (5,0 a 15,0)	10,5 (5,8 a 15,0)	1,00 (0,92- 1,07, p=0,982)	-
Regressão	Não	146 (90,7)	23 (100,0)	-	-
	Sim	15 (9,3)	0 (0,0)	-	-

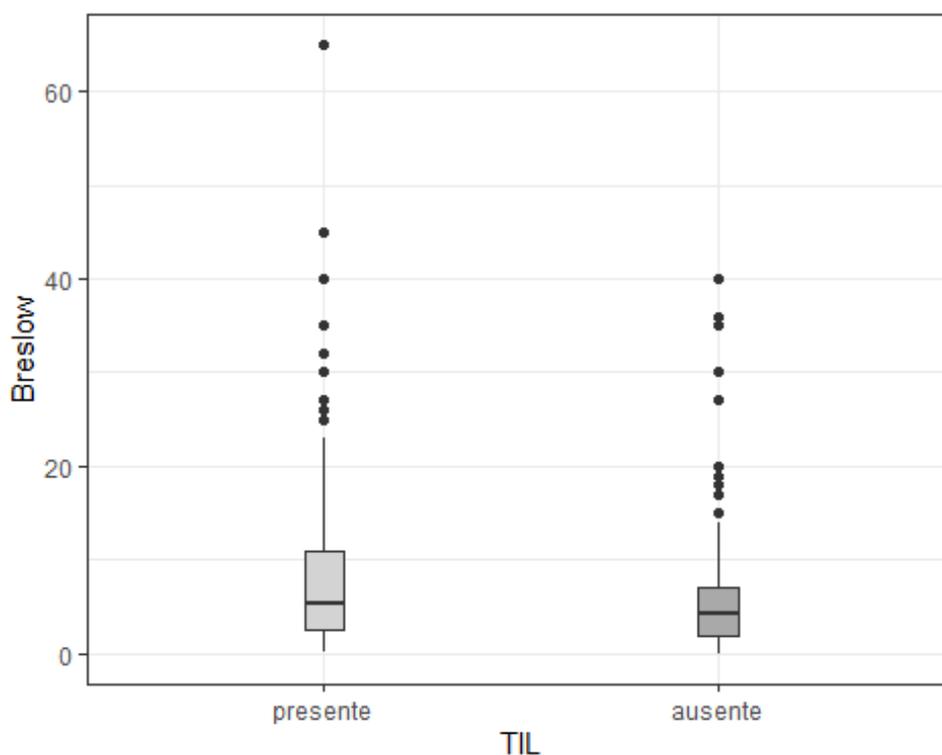
Características		WT	Mutado	OR (univariada)	OR (multivariada)
Mitoses	Mediana (Iiq)	3,0 (1,0 a 7,0)	4,0 (1,0 a 5,0)	1,00 (0,91- 1,08, p=0,974)	-
Tipo de célula predominante	Epitelióide	103 (64,0)	19 (82,6)	-	-
	Fusiforme	46 (28,6)	4 (17,4)	0,47 (0,13- 1,34, p=0,193)	-
	Não se aplica	12 (7,5)	0 (0,0)	-	-
Invasão angiolinfática	Não	147 (91,3)	16 (69,6)	-	-
	Sim	14 (8,7)	7 (30,4)	4,59 (1,55- 12,87, p=0,004)	4,55 (1,50-13,19, p=0,006)
Invasão perineural	Não	139 (86,3)	19 (82,6)	-	-
	Sim	22 (13,7)	4 (17,4)	1,33 (0,36- 3,95, p=0,632)	-
Necrose	Não	132 (82,0)	16 (69,6)	-	-
	Sim	29 (18,0)	7 (30,4)	1,99 (0,71- 5,13, p=0,166)	-
Melanina dicotomizada	Ausente	22 (13,7)	7 (30,4)	-	-
	Presente	139 (86,3)	16 (69,6)	0,36 (0,14- 1,03, p=0,045)	-
Fase de crescimento	Radial	31 (19,3)	1 (4,3)	-	-
	Vertical	130 (80,7)	22 (95,7)	5,25 (1,04- 95,73, p=0,112)	-

WT: *Wild-type* (selvagem); OR: *Odds ratio* (razão de chances)

8.5. Associação entre espessura de Breslow e TIL

A mediana da espessura de Breslow das neoplasias com TIL (TIL presente) foi de 5,4 mm (Ilq: 8,40), enquanto que a mediana desta espessura para neoplasias sem TIL (TIL ausente) foi de 4,3 mm (Ilq: 5,15). Assim sendo, neoplasias mais espessas têm maior proporção de infiltrado linfocítico tumoral (TIL presente). Esta associação foi estatisticamente significativa, com $p=0,009847$. Estes resultados estão ilustrados no Gráfico 1.

Gráfico 1. Associação entre espessura de Breslow e TIL

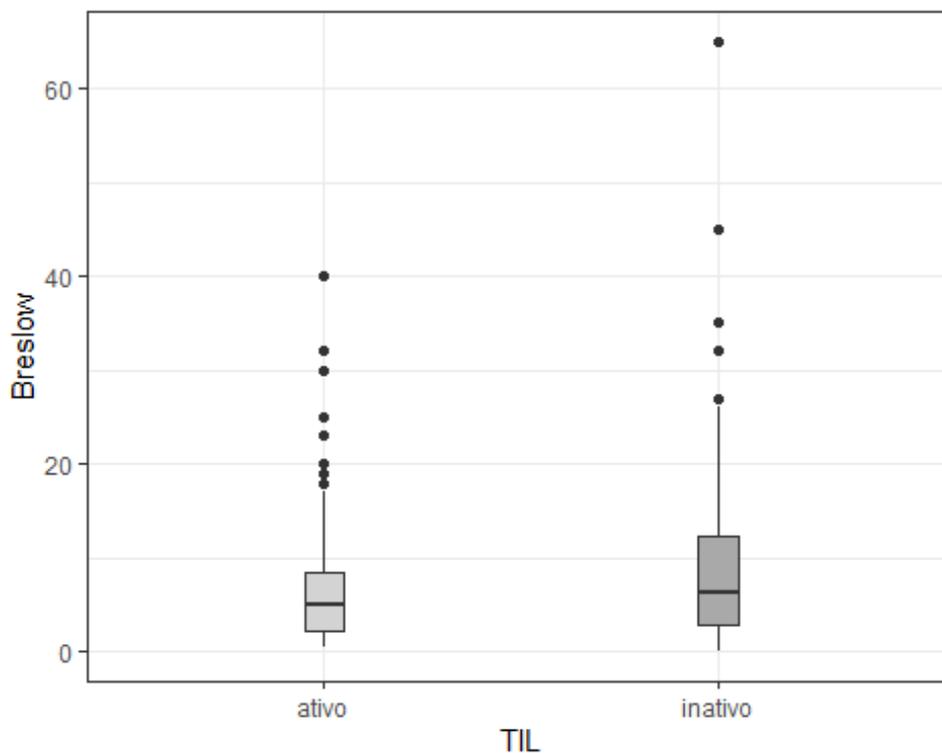


Breslow: espessura de Breslow; TIL: Infiltrado linfocítico tumoral

Considerando a atividade do infiltrado linfocítico tumoral, observamos uma mediana da espessura de Breslow de 5,0 mm (Ilq: 6,30) para as neoplasias com TIL ativo e de 6,4 mm (Ilq: 9,30) para as neoplasias com TIL inativo. Esta diferença foi estatisticamente significativa, com $p=0,04503$. Assim, dentre as neoplasias com TIL

(TIL presente), as mais espessas têm maior proporção de TIL inativo. Estes resultados estão ilustrados no Gráfico 2.

Gráfico 2. Associação entre espessura de Breslow e atividade do TIL



Breslow: espessura de Breslow; TIL: Infiltrado linfocítico tumoral

8.6 Associação entre espessura de Breslow e melanina

A mediana da espessura de Breslow do grupo de pacientes que apresentavam melanomas amelanóticos foi de 7,0 mm, enquanto que a mediana desta espessura do grupo de pacientes que apresentavam melanomas com pigmento melânico foi de 5,0 mm. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,011$). Vide Tabela 6.

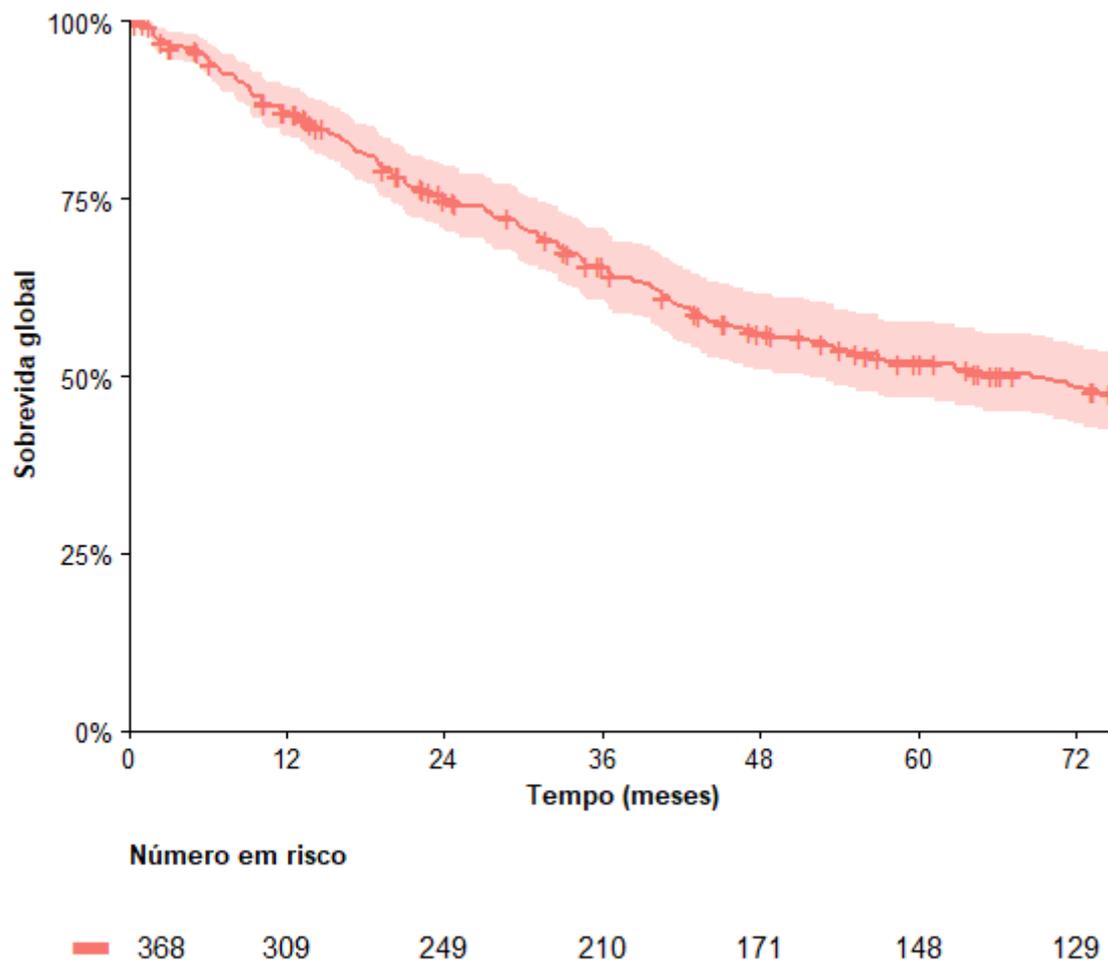
Tabela 6. Associação entre espessura de Breslow e melanina

Característica		Melanina ausente	Melanina presente	Total	p
Total N (%)		53 (14,4)	315 (85,6)	368	
Espessura de Breslow	Mediana (Iiq)	7,0 (3,6 a 15,0)	4,9 (2,0 a 9,9)	5,0 (2,4 a 10,0)	0,011

8.7 Análises de sobrevida global

O tempo de seguimento mediano de todo o grupo (368 pacientes) foi de 95,2 meses (IC95% 90,8 – 104,1). A mediana de sobrevida foi de 68,7 meses (IC95% 51,3 – 96,4). A probabilidade de sobrevida estimada em 60 meses foi de 52% (IC95% 46 a 57). Estes resultados estão ilustrados no Gráfico 3.

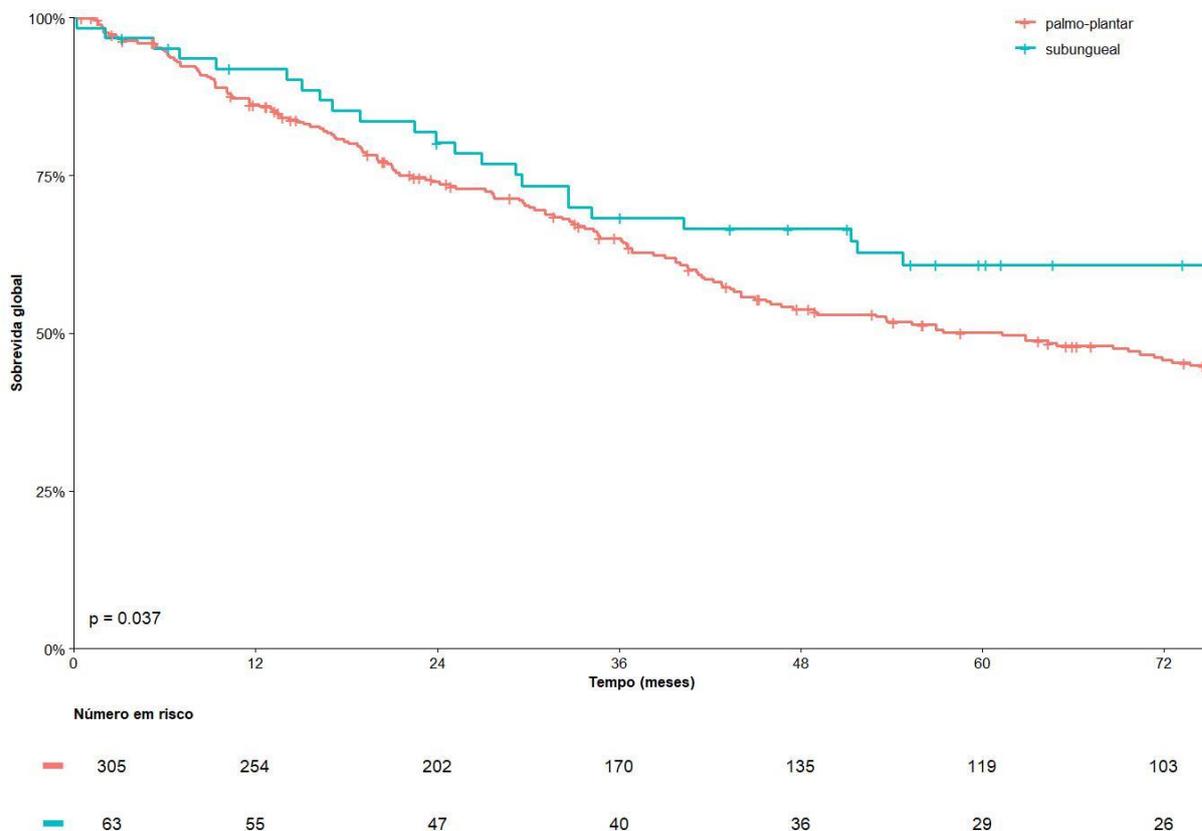
Gráfico 3. Análise de sobrevida global – grupo todo



8.7.1 Análise de sobrevida global por local da lesão

A mediana de sobrevida dos pacientes com melanoma palmo-plantar foi de 61,3 meses (IC95% 45,0 – 89,6) e dos pacientes com melanoma subungueal foi de 130 meses (IC95% 54,8 – NA). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,037$). Esta curva de sobrevida pode ser vista no Gráfico 4.

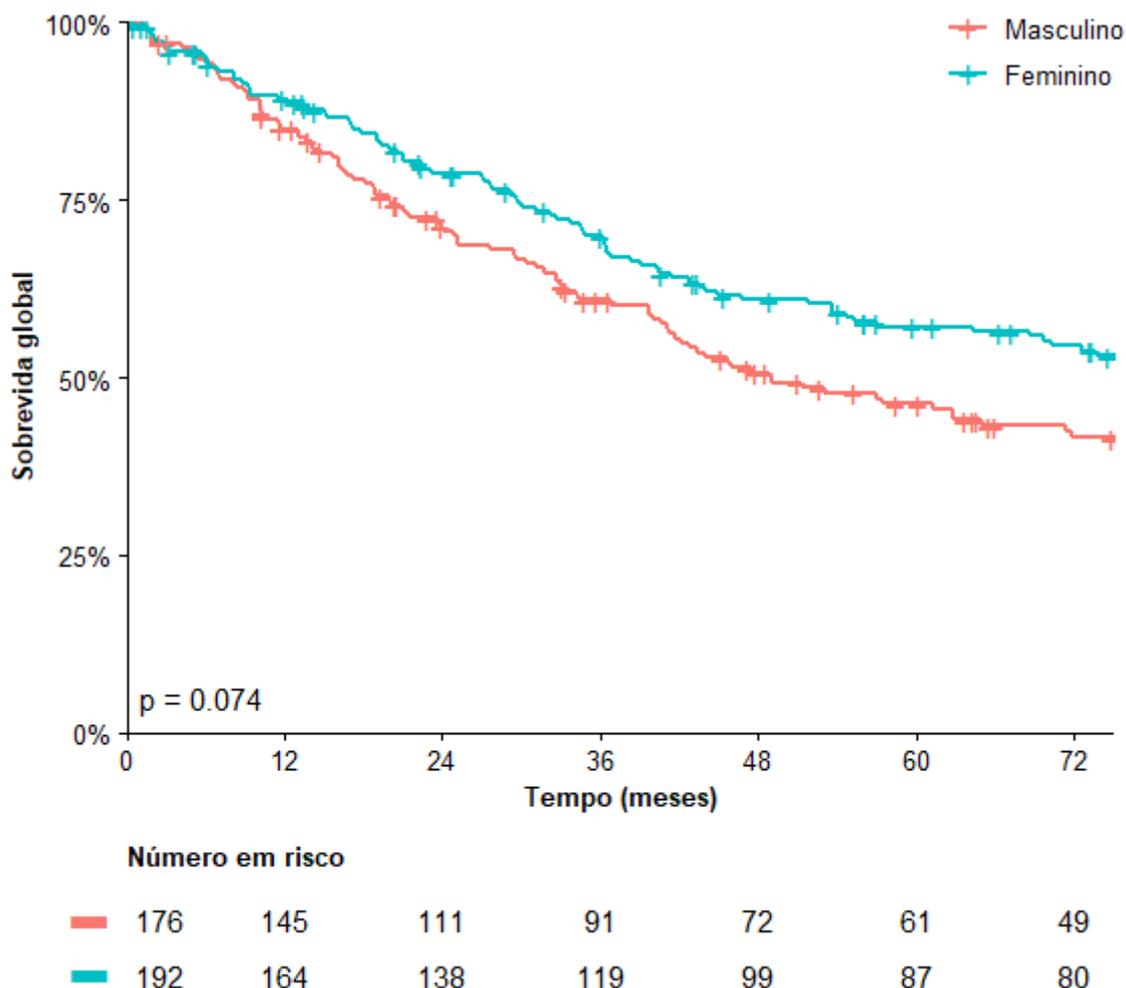
Gráfico 4. Análise de sobrevida global por local da lesão



8.7.2 Análise de sobrevida global por sexo

A mediana de sobrevida para os pacientes do sexo masculino foi de 48,9 meses (IC95% 41,1 – 89,6) e para os pacientes do sexo feminino foi de 91,5 meses (IC95% 64,3 – 123,8). Esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,074$). A probabilidade de sobrevida estimada em 60 meses foi de 46% (IC95% 39 a 54) para os pacientes do sexo masculino e de 57% (IC95% 50 a 65) para os pacientes do sexo feminino. Esta curva de sobrevida está ilustrada no Gráfico 5.

Gráfico 5. Análise de sobrevida global por sexo



8.7.3 Análise de sobrevida global por estágio clínico

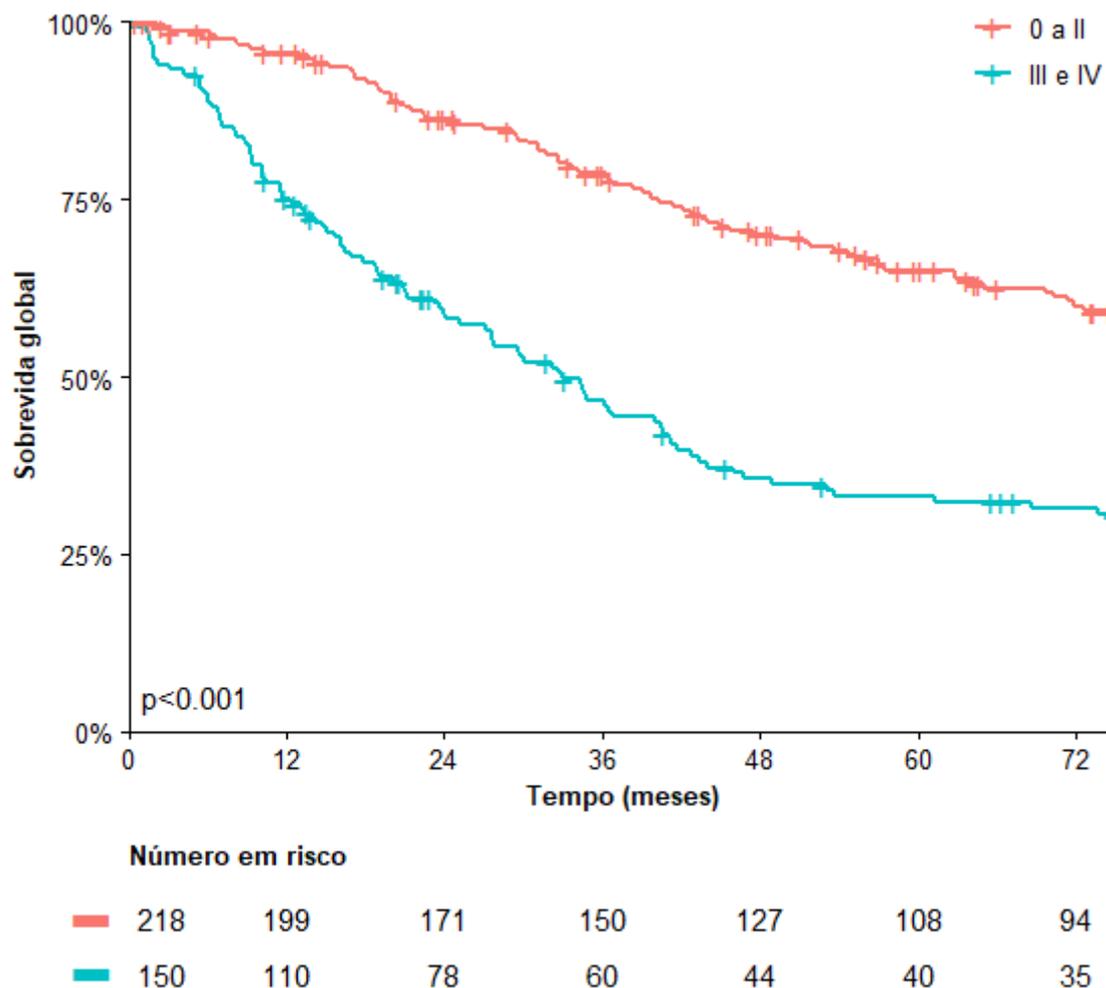
Para esta análise, os estádios foram dicotomizados em 0 a II e III a IV. Esta divisão foi realizada considerando que os estádios III e IV englobam pacientes com doença metastática (ver apêndice C).

A mediana de sobrevida para os pacientes dos estádios 0 a II foi de 105 meses (IC95% 92,4 – 131,1). A mediana de sobrevida para os pacientes dos estádios III e IV foi de 32,9 meses (IC95% 25,1 – 41,2). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

A probabilidade de sobrevida estimada em cinco anos foi de 65% (IC95% 58 a 72) para os pacientes dos estádios 0 a II e de 33% (IC95% 26 a 42) para os pacientes dos estádios III e IV.

Esta curva de sobrevida está ilustrada no Gráfico 6.

Gráfico 6. Análise de sobrevida global por estágio clínico

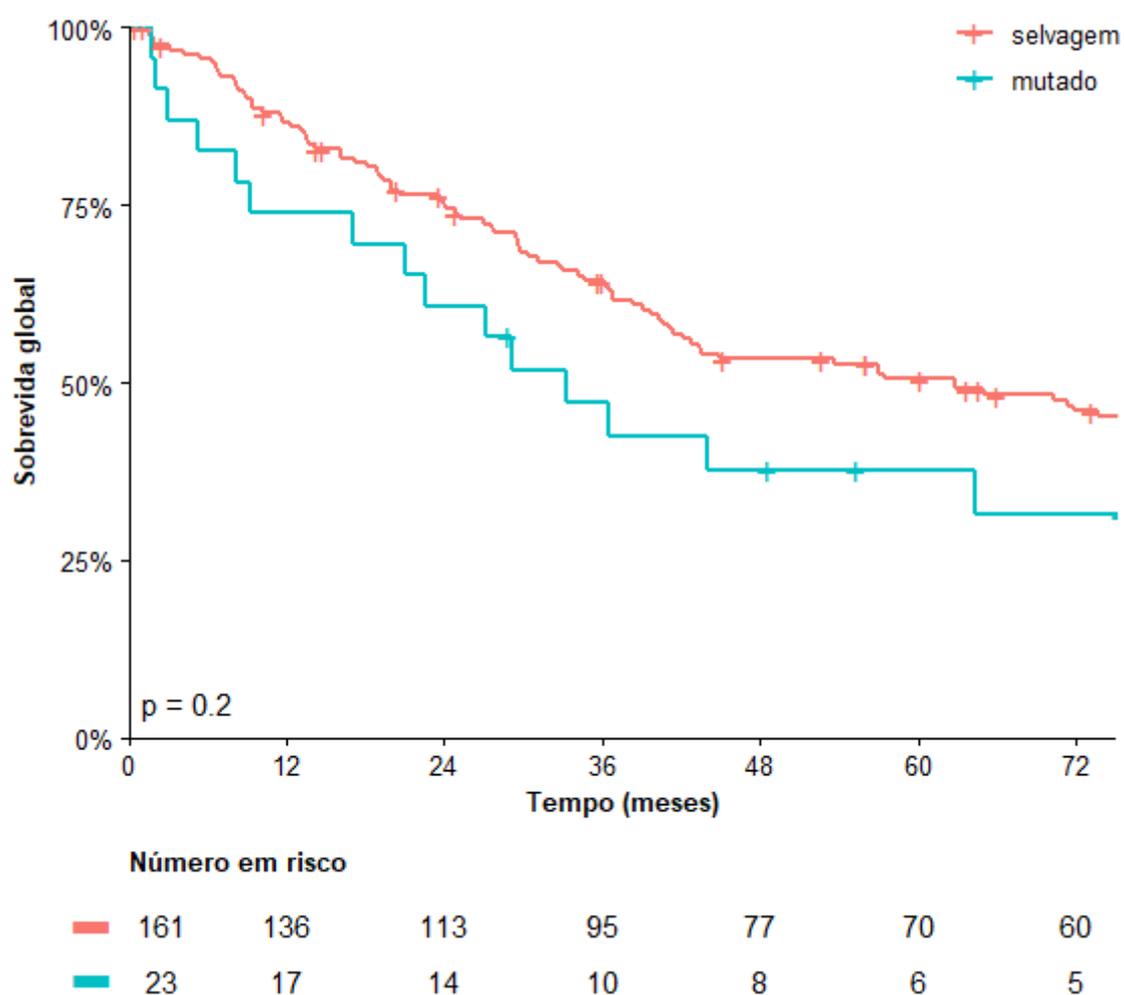


8.7.4 – Análise de sobrevida global por *status* de BRAF

Nesta análise foram inclusos apenas os pacientes com sequenciamento satisfatório (184 pacientes). A mediana de sobrevida dos pacientes com melanoma selvagem foi de 62,8 meses (IC95% 41,5 – 93,7) e dos pacientes com melanoma mutado foi de 33,3 meses (IC95% 21,0 – NA). Esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,2$). O tempo de sobrevida estimada em 60 meses foi de 50% (IC95% 43 a 59)

para os pacientes com melanoma selvagem e de 37% (IC95% 22 a 64) para os pacientes com melanoma mutado. Esta diferença não foi estatisticamente significativa. A curva de sobrevida de acordo com o *status* de BRAF pode ser vista no Gráfico 7.

Gráfico 7. Análise de sobrevida global por *status* de BRAF

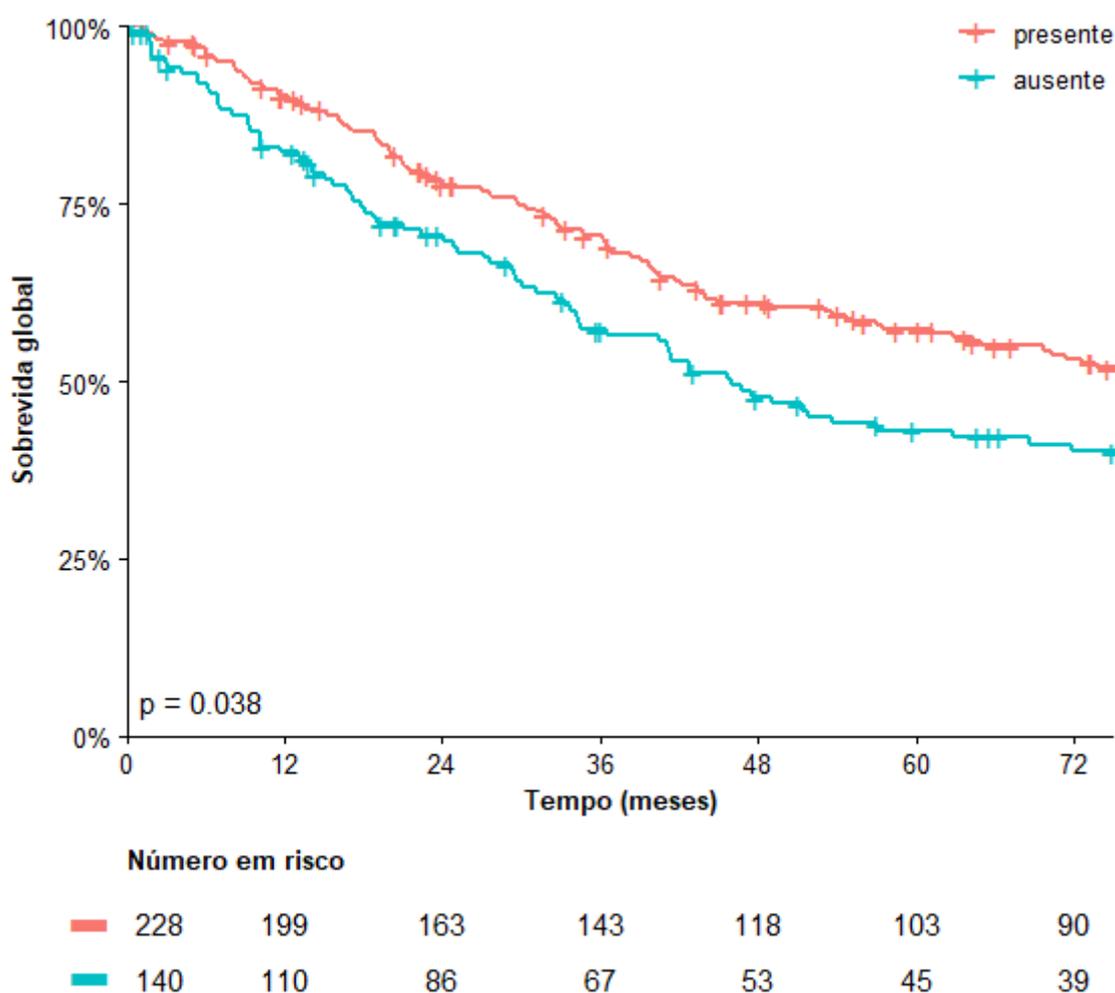


8.7.5. Análise de sobrevida global por TIL

A mediana de sobrevida para os pacientes portadores de melanoma com TIL (TIL presente) foi de 89,6 meses (IC95% 62,9 - 112,5). A mediana de sobrevida para os pacientes portadores de melanoma sem TIL (TIL ausente) foi de 46 meses (IC95% 34,6 - 93,7). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,038$).

A probabilidade de sobrevida estimada em cinco anos foi de 57% (IC95% 50 a 64) para os pacientes portadores de melanoma com TIL (TIL presente) e de 43% (IC95% 35 a 52) para os pacientes portadores de melanoma sem TIL (TIL ausente). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,038$). Esta curva de sobrevida está ilustrada no Gráfico 8.

Gráfico 8. Análise de sobrevida global por TIL



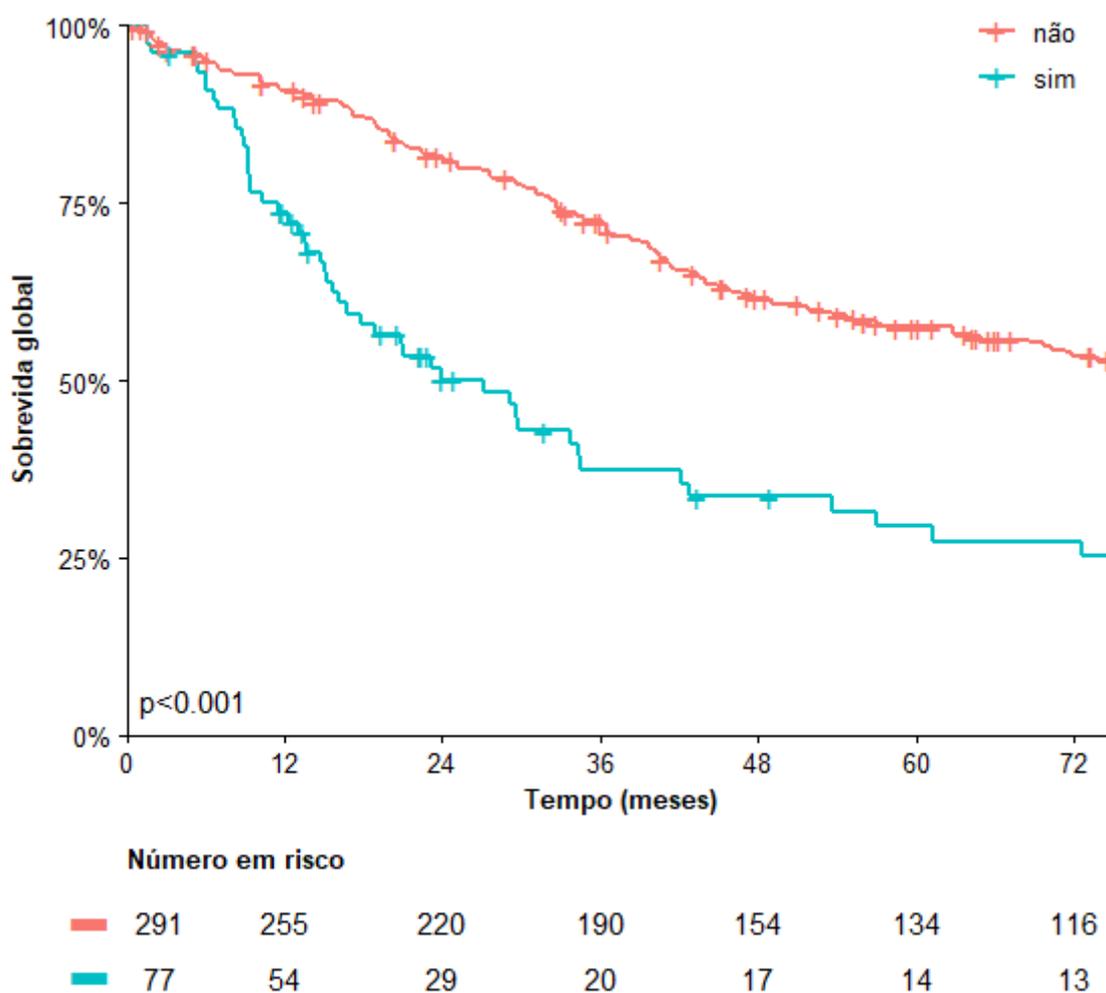
8.7.6. Análise de sobrevida global por necrose

A mediana de sobrevida para os pacientes portadores de melanoma com necrose foi de 27,1 meses (IC95% 16,7 – 42,2). A mediana de sobrevida para os pacientes portadores de melanoma sem necrose foi de 96,4 meses (IC95% 68,6 – 112,5). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

A probabilidade de sobrevida estimada em cinco anos foi de 29% (IC95% 20 a 44) para os pacientes portadores de melanoma com necrose (necrose presente) e de 57% (IC95% 51 a 64) para os pacientes portadores de melanoma sem necrose (necrose ausente).

A curva de sobrevida global por necrose pode ser vista no Gráfico 9.

Gráfico 9. Análise de sobrevida global por necrose



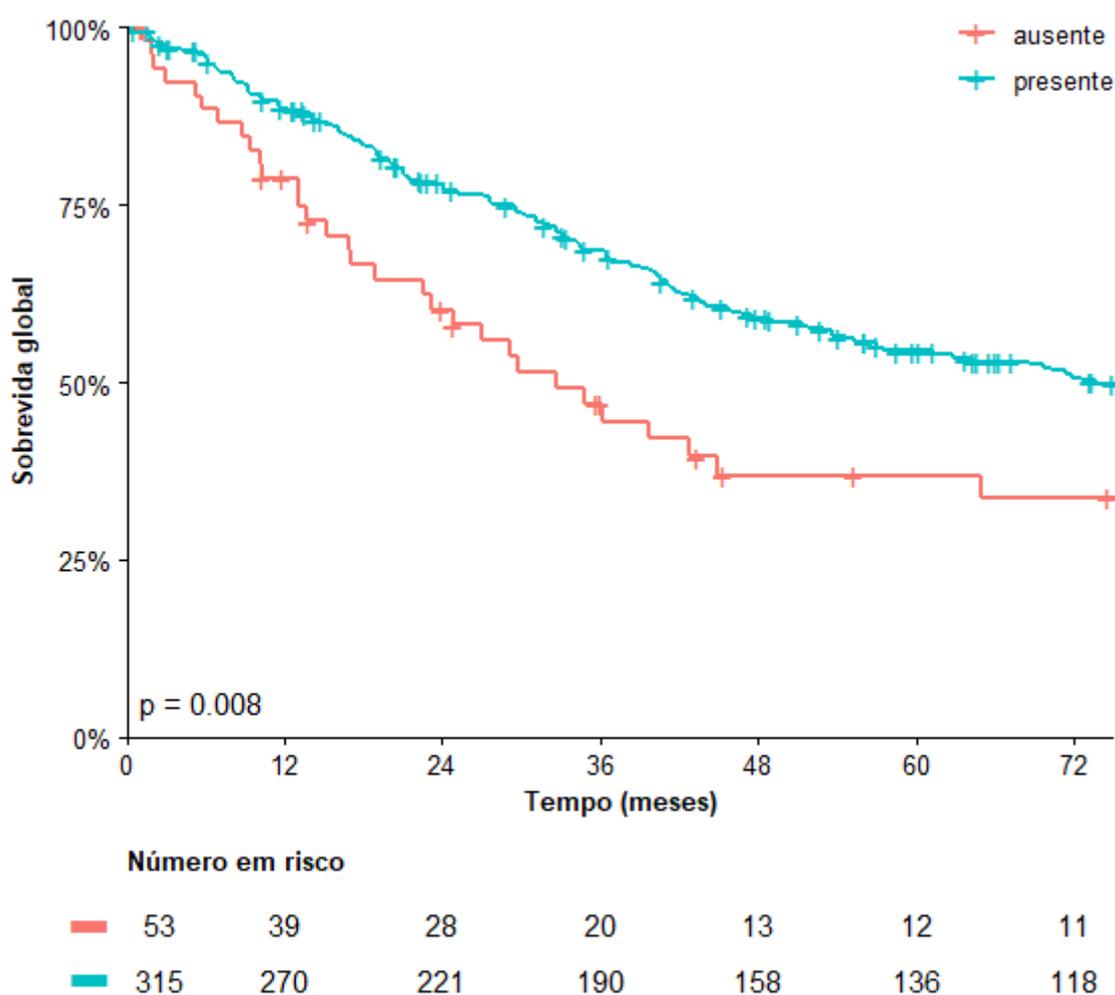
8.7.7. Análise de sobrevida global por melanina

A mediana de sobrevida para os pacientes portadores de melanoma com melanina foi de 73,7 meses (IC95% 56,9 – 103), enquanto que a mediana de sobrevida para os pacientes portadores de melanoma sem melanina (melanoma amelanótico) foi de 32,6 meses (IC95% 23,2 – 124). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,008$).

A probabilidade de sobrevida estimada em cinco anos foi de 54% (IC95% 48 a 60) para os pacientes portadores de melanoma com melanina e de 37% (IC95% 25 a 54) para os pacientes portadores de melanoma sem melanina.

A curva de sobrevida global por melanina está ilustrada no Gráfico 10.

Gráfico 10. Análise de sobrevida global por melanina



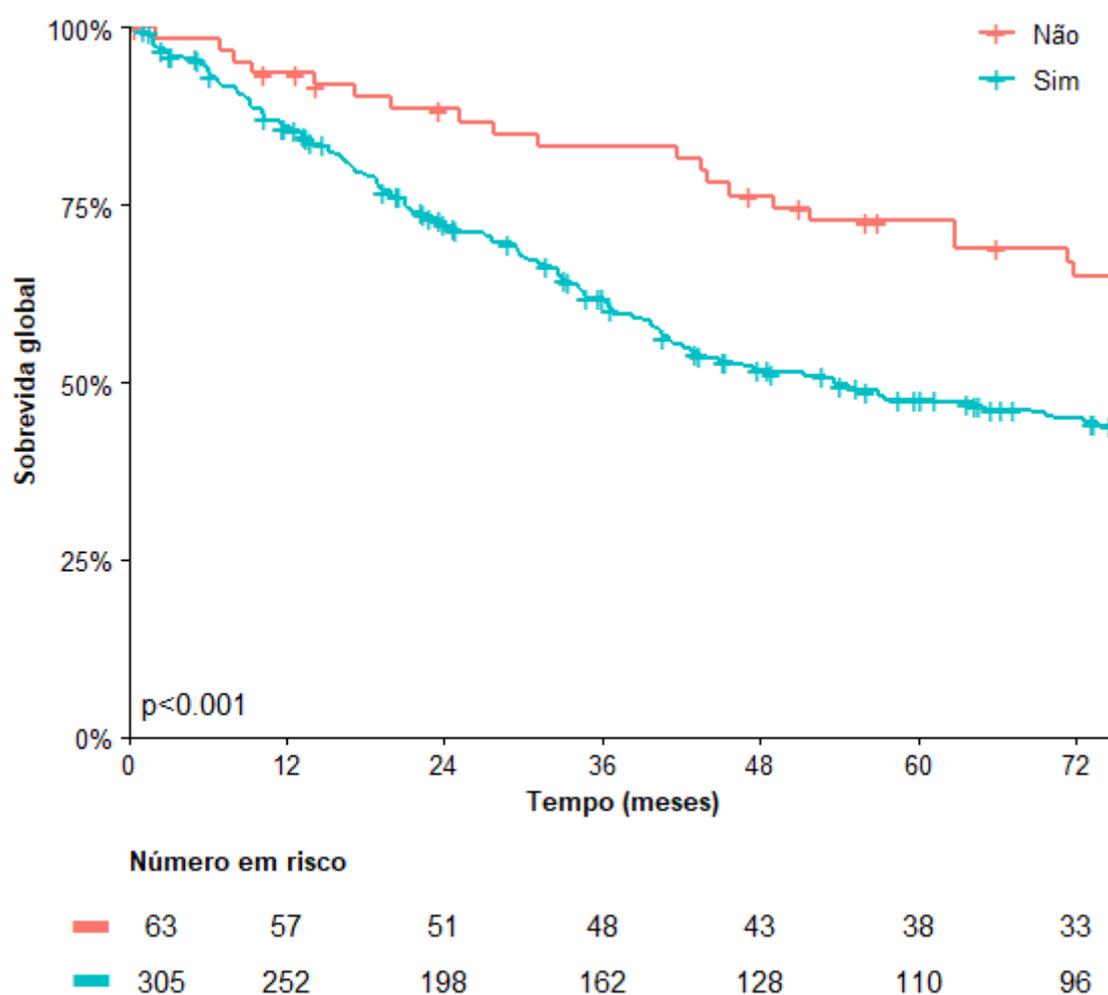
8.7.8. Análise de sobrevida global por mitose

A mediana de sobrevida para os pacientes portadores de melanoma com mitose foi de 53,7 meses (IC95% 41,4 – 77,6), enquanto que a mediana de sobrevida para os pacientes portadores de melanoma sem mitose foi de 131,1 meses (IC95% 100 – NA). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

A probabilidade de sobrevida estimada em cinco anos foi de 47% (IC95% 42 a 54) para os pacientes portadores de melanoma com mitose e de 73% (IC95% 62 a 85) para os pacientes portadores de melanoma sem mitose.

A curva de sobrevida global por mitose pode ser vista no Gráfico 11.

Gráfico 11. Análise de sobrevida global por mitose



8.8 Modelos de riscos proporcionais de Cox

A Tabela 7 exhibe os modelos de riscos proporcionais de Cox. Na última coluna estão apresentados os dados do modelo final, após a realização da modelagem passo a passo. Ficou decidido que algumas variáveis (resumidas na Tabela 8) não seriam inseridas no modelo, apesar do $p < 0,2$, pois apresentavam forte associação com o estágio clínico. Outras variáveis foram colocadas no modelo, mas foram excluídas por não apresentarem $p < 0,05$ no modelo múltiplo.

Tabela 7. Modelos de riscos proporcionais de Cox

Características			HR (univariada)	HR (multivariada)
Idade	Média (DP)	66,1 (13,6)	1,01 (1,00- 1,02, $p=0,095$)	1,01 (1,00-1,02, $p=0,026$)
	Sexo			
	Masculino	176 (47,8)	(ref.)*	-
	Feminino	192 (52,2)	0,78 (0,59- 1,02, $p=0,074$)	0,70 (0,53-0,93, $p=0,014$)
Cor	Branca	211 (57,3)	-	-
	Preta	73 (19,8)	1,21 (0,85- 1,71, $p=0,290$)	-
	Parda	84 (22,8)	1,23 (0,86- 1,74, $p=0,254$)	-
Local dicotomizado	Palmo- plantar	305 (82,9)	-	-
	Subungueal	63 (17,1)	0,65 (0,43- 0,98, $p=0,039$)	0,57 (0,37-0,87, $p=0,009$)
Estádio dicotomizado	III e IV	150 (40,8)	-	-
	0 a II	218 (59,2)	0,44 (0,33- 0,58, $p < 0,001$)	0,52 (0,39-0,70, $p < 0,001$)

Características			HR (univariada)	HR (multivariada)
Tipo histopatológico	Acral-lentiginoso	303 (82,3)	-	-
	Nodular	37 (10,1)	2,19 (1,44- 3,33, p<0,001)	-
	Não avaliável	28 (7,6)	3,44 (2,19- 5,41, p<0,001)	-
Lesão polipoide	Não	309 (84,0)	-	-
	Sim	59 (16,0)	1,55 (1,09- 2,21, p=0,014)	-
Espessura de Breslow	Média (DP)	7,5 (8,1)	1,05 (1,04- 1,06, p<0,001)	-
Nível de Clark agrupado	I a III	39 (11,3)	-	-
	IV	198 (57,6)	1,63 (0,96- 2,77, p=0,073)	-
	V	107 (31,1)	3,24 (1,87- 5,62, p<0,001)	-
TIL	Presente	228 (62,0)	-	-
	Ausente	140 (38,0)	1,35 (1,02- 1,79, p=0,038)	1,48 (1,11-2,00, p=0,008)
Status TIL	Ativo	88 (38,6)	-	-
	Inativo	140 (61,4)	1,37 (0,94- 1,99, p=0,099)	-
Grau de atividade TIL	Leve	146 (64,0)	-	-
	Moderada	66 (28,9)	0,69 (0,46- 1,04, p=0,078)	-
	Acentuada	16 (7,0)	0,74 (0,36- 1,54, p=0,428)	-
Microssatelitose	Não	353 (95,9)	-	-

Características			HR (univariada)	HR (multivariada)
Ulceração	Sim	15 (4,1)	2,72 (1,47- 5,03, p=0,001)	-
	Não	128 (34,8)	-	-
Tamanho ulceração	Sim	240 (65,2)	2,60 (1,88- 3,60, p<0,001)	-
	Média (DP)	11,0 (7,7)	1,04 (1,02- 1,06, p<0,001)	-
Regressão	Não	335 (91,0)	-	-
	Sim	33 (9,0)	0,75 (0,44- 1,27, p=0,280)	-
Mitoses	Média (DP)	5,0 (5,6)	1,05 (1,03- 1,08, p<0,001)	1,03 (1,00-1,06, p=0,047)
Tipo de célula predominante	Epitelioide	236 (64,1)	-	-
	Fusiforme	103 (28,0)	1,28 (0,94- 1,73, p=0,118)	-
	Outro	3 (0,8)	0,57 (0,08- 4,09, p=0,578)	-
	Não se aplica	26 (7,1)	1,00 (0,57- 1,77, p=0,994)	-
Invasão angiolinfática	Não	325 (88,3)	-	-
	Sim	43 (11,7)	1,58 (1,06- 2,36, p=0,025)	-
Necrose	Não	291 (79,1)	-	-
	Sim	77 (20,9)	2,49 (1,82- 3,42, p<0,001)	1,90 (1,34-2,70, p<0,001)
Melanina dicotomizada	Ausente	53 (14,4)	-	-
	Presente	315 (85,6)	0,61 (0,42- 0,88, p=0,009)	0,59 (0,40-0,88, p=0,009)

Características			HR (univariada)	HR (multivariada)
Fase de crescimento	Radial	55 (14,9)	-	-
	Vertical	313 (85,1)	1,86 (1,20- 2,87, p=0,005)	-
<i>Strata</i> (invasão perineural)	Não	316 (85,9)	-	-
	Sim	52 (14,1)	1,89 (1,32- 2,70, p<0,001)	-

DP: Desvio-padrão; HR: *Hazard Ratio* (razão de risco); Ref*: Categoria de referência

Na análise multivariada, foram demonstrados como fatores de risco: idade, ausência de TIL, número de mitoses e presença de necrose. A presença de melanina mostrou ser um fator de proteção, assim como localização subungueal, sexo feminino e estádios clínicos 0 a II.

A verificação da associação entre as variáveis e o estágio clínico foi realizada para selecionar as variáveis que entrariam no modelo, ou seja, para excluir as variáveis redundantes, pois as variáveis de exposição não devem ser associadas entre si, como dito acima.

Estavam associadas com o estágio clínico as seguintes variáveis: espessura de Breslow, ulceração, tipo histopatológico nodular e fase de crescimento vertical. Estes dados estão resumidos na Tabela 8.

Tabela 8. Associação entre as variáveis e o estágio clínico

Variável dependente: estágio dicotomizado		III e IV	0 a II	OR (univariada)
Breslow	Média (DP)	9,4 (7,6)	6,2 (8,1)	0,95 (0,92-0,98, p<0,001)
Ulceração	Não	37 (24,7)	91 (41,7)	-
	Sim	113 (75,3)	127 (58,3)	0,46 (0,29-0,72, p=0,001)
Tipo histopatológico	Acral-lentiginoso	109 (72,7)	194 (89,0)	-
	Nodular	26 (17,3)	11 (5,0)	0,24 (0,11-0,49, p<0,001)
	Não avaliável	15 (10,0)	13 (6,0)	0,49 (0,22-1,06, p=0,070)
Fase de crescimento	Radial	10 (6,7)	45 (20,6)	-
	Vertical	140 (93,3)	173 (79,4)	0,27 (0,13-0,54, p<0,001)

DP: Desvio-padrão.

9. DISCUSSÃO

O número de pacientes estudados é adequado, levando em conta os dados da literatura mundial. Do nosso conhecimento, considerando dados histopatológicos (368 pacientes) e de biologia molecular (184 pacientes), este estudo representa a maior casuística de melanoma acral relatada na literatura.

A mediana de idade (67,5 anos) encontrada está de acordo com os dados da literatura, com pico de incidência na sétima década de vida. (KATO et al., 1999)

Não houve diferença numérica significativa entre os pacientes de sexo feminino e de sexo masculino, o que também está de acordo com os dados da literatura, uma vez que o melanoma acral não tem predileção por sexo. (ELDER et al., 2018e)

A maioria dos pacientes era branca. Isto talvez se deva ao fato de que a cor da pele é auto-referenciada ou até mesmo porque a população brasileira é muito miscigenada. (PENA et al., 2011)(PENA et al., 2009) Nunes e colaboradores (NUNES; QUINTELLA MENDES; KOIFMAN, 2018) citam que as taxas de incidência por grupo étnico (brancos *versus* não brancos) não parecem diferir, e a diferença na proporção de melanoma acral entre os grupos se deve à baixa incidência de melanoma não acral em afrodescendentes e asiáticos. Stevens *et al* (STEVENS; LIFF; WEISS, 1990) chegaram a conclusão semelhante, comentando que, na América do Norte, há pouca diferença na incidência de melanoma plantar entre negros e brancos e que a “bem conhecida diferença proporcional se deve à diminuição da incidência de melanoma em negros noutras superfícies da pele que não as plantas”.

A localização plantar mais comum também está de acordo com os dados da literatura mundial. (BARNHILL; PIEPKORN; BUSAM, 2014).

A maioria dos pacientes (44,3%) chegou à instituição no estágio II. Resultado semelhante foi encontrado por Chang e colaboradores. (CHANG; KARNELL; MENCK, 1998).

Ao agruparmos os estádios, percebe-se que 40,7% dos pacientes chegaram à instituição nos estádios III e IV, ou seja, já apresentavam metástase loco-regional ou à distância. Sendo assim, é imprescindível a realização de políticas públicas de informação à população, uma vez que o melanoma acral pode ser curado em suas fases iniciais. Além disso, é mandatória maior presteza na regulação desses pacientes, visando seu tratamento precoce, com maior possibilidade de cura.

Considerando os dados histopatológicos, a maioria das amostras eram excisionais (87,5%), o que possibilitou ótima avaliação histopatológica quanto ao tipo histopatológico e também quanto aos fatores prognósticos.

Com relação ao tipo histopatológico, a maioria era acral lentiginoso, o que está de acordo com os dados da literatura. Foram encontrados apenas melanomas tipo nodular e tipo acral lentiginoso. Na minha opinião, não existe melanoma tipo extensivo superficial na pele glabra. O melanoma tipo extensivo superficial é um melanoma que está associado a exposição solar intermitente, com baixo grau de dano solar cumulativo, (ELDER et al., 2018b) que não é o caso dos melanomas de pele glabra, especialmente quando se considera a localização mais comum (plantar), uma região em que há pouquíssima ou nenhuma exposição ao sol. Melanomas da transição cutânea pele glabra/ pele não glabra, ou seja, das regiões mediais ou laterais das mãos e dos pés, podem ser diagnosticados como melanoma tipo extensivo superficial, mas, neste caso, não poderiam ser considerados melanomas acrais.

No artigo de THOMAS *et al* (THOMAS *et al.*, 2013), os autores encontraram maior grau de TIL em melanomas mais finos, o que não foi observado neste trabalho. No entanto, naquele artigo, a população estudada é bem diferente, com predomínio de caucasianos (América do Norte, Europa e Austrália) e os melanomas de extremidades foram englobados todos numa mesma categoria, ou seja, não houve separação entre melanomas acrais e não acrais.

O número de casos com sequenciamento satisfatório está de acordo com o esperado, pois as amostras oriundas de FFPE apresentam DNA fragmentado, o que diminui o rendimento das reações de PCR. (DO; DOBROVIC, 2015). Além disso, é sabido que a melanina inibe a Taq polimerase, o que também pode contribuir para o baixo rendimento das reações de PCR. (ECKHART *et al.*, 2000).

O percentual de pacientes com melanoma apresentando mutação em BRAF (12,5%) está de acordo com os dados da literatura, (DURBEC *et al.*, 2012) tendo sido encontradas algumas variantes ainda não descritas em melanoma.

Ao contrário do encontrado por Zebary *et al* (ZEBARY *et al.*, 2013), neste estudo, a mediana de idade dos pacientes com melanoma apresentando mutação em BRAF foi maior do que a mediana de idade dos pacientes com melanoma BRAF selvagem, o que foi estatisticamente significativo. Talvez isto possa ser explicado pela diferença étnica da população, uma vez que Zebary e colaboradores estudaram uma população de origem predominantemente caucasiana (sueca). No estudo de Long *et al* (LONG *et al.*, 2011), foram encontrados resultados semelhantes aos de Zebary *et al* no que diz respeito à idade e à mutação em BRAF, no entanto, naquele estudo, os melanomas de extremidades foram agrupados e o tipo histopatológico acral lentiginoso (tipo mais comum de melanoma acral) não estava representado. Menzies

et al (MENZIES et al., 2012) também encontraram correlação entre pacientes mais jovens e melanomas com mutação em BRAF, no entanto, não foram encontradas mutações em BRAF nos cinco casos de melanoma acral lentiginoso avaliados e a população estudada era predominantemente caucasiana (australianos). Além disso, a mediana de idade dos pacientes com mutação não V600E foi maior que a mediana de idade dos pacientes com mutação V600E. Neste trabalho, o número de mutações não V600E (74%) foi maior que o número de mutações V600E (26%), o que talvez explique a maior mediana de idade dos pacientes apresentando melanoma com mutação em BRAF. Ao analisarmos a mediana de idade apenas dos pacientes que apresentaram a mutação V600E, percebe-se que estes pacientes são mais jovens que os demais, o que está de acordo com os dados da literatura. (LONG et al., 2011)(ZEBARY et al., 2013)(MENZIES et al., 2012) Esta diferença não foi estatisticamente significativa, o que talvez possa ser explicado pela baixa representatividade desta variante nesta coorte.

Outra característica estatisticamente significativa, ao compararmos os mutados e os selvagens, foi a presença de invasão neoplásica angiolinfática dentre os mutados. Sabe-se que os pacientes com mutação em BRAF têm pior prognóstico (HUGDAHL et al., 2016) (LONG et al., 2011), o que talvez possa estar relacionado a invasão neoplásica angiolinfática.

Considerando a análise de sobrevida no que diz respeito ao TIL, ela está de acordo com o esperado, uma vez que pacientes portadores de melanoma com TIL têm melhor prognóstico. (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2018).

Pacientes com melanoma palmo-plantar apresentaram um tempo mediano de sobrevida menor que pacientes com melanoma subungueal, que foi estatisticamente

significativo. Dados semelhantes foram encontrados no estudo de Wei e colaboradores; os autores concluíram que o melanoma plantar tem pior prognóstico que o palmar e que o subungueal. (WEI et al., 2020). No entanto, dados conflitantes foram encontrados no estudo de Holman e colaboradores; os autores observaram maior taxa de metástase nos melanomas subungueais (HOLMAN et al., 2020) e acreditam que “o melanoma subungueal não se enquadra na categoria alargada de melanoma acral e deve ser considerado uma entidade separada...”

Pacientes do sexo feminino apresentaram um tempo mediano de sobrevida maior que pacientes do sexo masculino. É bem estabelecido que pacientes do sexo feminino têm melhor sobrevida quando se trata de melanoma (KHOSROTEHRANI et al., 2015) e dados semelhantes foram encontrados no estudo de Nunes *et al.* (NUNES; QUINTELLA MENDES; KOIFMAN, 2018).

A análise de sobrevida global por estágio clínico está de acordo com o esperado, o que valida a adequação da avaliação histopatológica e dos dados coletados dos prontuários.

Embora não tenha sido estatisticamente significativa, a sobrevida global por *status* de BRAF está de acordo com o esperado, uma vez que pacientes com melanoma BRAF mutado têm pior prognóstico que aqueles com melanoma BRAF selvagem. A ausência de significância estatística talvez possa ser explicada pela baixa representatividade de pacientes com melanoma mutado, nesta coorte.

A análise de sobrevida global por necrose também está de acordo com o esperado, uma vez que neoplasias com necrose tendem a ser mais espessas.

Faz sentido que pacientes portadores de melanoma com pigmento melânico tenham melhor prognóstico que aqueles portadores de melanoma amelanótico, uma vez que o melanoma pigmentado pode ser considerado melhor diferenciado em comparação com o melanoma sem pigmento. Wee e colaboradores observaram que melanomas amelanóticos tinham pior prognóstico que os melanomas pigmentados, comentando que talvez isso pudesse ser explicado pelo atraso no diagnóstico (WEE et al., 2018). Gong e colaboradores realizaram um estudo comparando 16 pacientes com melanoma acral amelanótico e 56 pacientes com melanoma acral pigmentado. (GONG; ZHENG; LI, 2020). Melanomas amelanóticos apresentaram maior espessura de Breslow e ulceração mais frequente, porém, não encontraram diferença na sobrevida. Neste trabalho, o grupo de pacientes com melanoma amelanótico apresentou maior mediana de espessura de Breslow, o que pode explicar sua pior sobrevida, uma vez que a espessura de Breslow está diretamente relacionada ao estágio clínico. (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2018).

Pacientes portadores de melanoma com mitose apresentaram pior curva de sobrevida do que aqueles portadores de melanoma sem mitose, o que também está de acordo com os dados da literatura. (THOMPSON et al., 2011).

Considerando o modelo de riscos proporcionais de Cox, na análise multivariada, foram demonstrados como fatores de risco: idade, ausência de TIL, número de mitoses e presença de necrose. É sabido que idade mais avançada está relacionada a maior incidência de morte em melanoma. (CAVANAUGH-HUSSEY et al., 2015). As três últimas características já foram discutidas acima.

A presença de melanina mostrou ser um fator de proteção, assim como localização subungueal, sexo feminino e estádios clínicos 0 a II, características estas que também já foram discutidas acima.

10. CONCLUSÕES

A frequência de mutações em BRAF, nesta coorte retrospectiva, foi de 12,5%. Destas, 26% eram V600E. Variantes raras e não reportadas também foram encontradas.

Os pacientes com melanoma BRAF mutado apresentaram a mediana de idade maior do que a mediana de idade dos pacientes com melanoma BRAF selvagem.

Invasão angiolinfática esteve mais presente no grupo dos melanomas BRAF mutado.

A mediana da espessura de Breslow das neoplasias com TIL foi maior que a mediana da espessura de Breslow das neoplasias sem TIL.

Foram demonstrados como fatores de risco para óbito: idade, ausência de TIL, número de mitoses e presença de necrose.

Foram demonstrados como fatores de proteção para óbito: presença de melanina, localização subungueal, sexo feminino e estádios clínicos 0 a II.

A mediana de sobrevida dos pacientes com melanoma selvagem foi maior que a mediana de sobrevida dos pacientes com melanoma mutado. Esta diferença não foi estatisticamente significativa.

O tempo mediano de sobrevida de pacientes com melanoma subungueal foi maior que o tempo mediano de sobrevida de pacientes com melanoma palmo-plantar.

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Reportar mutações raras ou novas de uma neoplasia tem o potencial de fornecer informações valiosas sobre a doença. Estas mutações raras ou novas podem ter características únicas que no futuro sejam capazes de contribuir para esclarecer os mecanismos subjacentes do câncer ou potenciais opções de tratamento. Além disso, estas mutações podem vir a ser alvo de medicamentos ou de terapias específicas. Ao relatar estas mutações, investigadores e médicos podem identificar potenciais opções de tratamento para pacientes com estas variantes raras, oferecendo cuidados mais personalizados e eficazes. Uma vez que estudos clínicos incluindo pacientes apenas com estas mutações são inviáveis por conta do pequeno número de pacientes, incluir estas mutações em base de dados e publicações é crucial, principalmente aquelas em que o desfecho também é informado.

Em resumo, relatar mutações raras e desconhecidas associadas ao câncer é essencial para avançar a nossa compreensão da doença, melhorar o atendimento ao paciente e, em última análise, desenvolver tratamentos e medidas preventivas mais eficazes. É um passo crítico na luta contínua contra esta doença complexa, uma vez que o desenho de estudos clínicos específicos para tais mutações é inviável – pelo pequeno número de pacientes - e a maneira mais eficaz de compilar informações relevantes sobre as mesmas é a utilização de bases de dados e publicações.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKBANI, R. et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell**, v. 161, n. 7, p. 1681–1696, 2015.

ALOS, L. et al. TP53 mutation and tumoral PD-L1 expression are associated with depth of invasion in desmoplastic melanomas. **Annals of Translational Medicine**, v. 8, n. 19, p. 1218–1218, 2020.

ALVES-SILVA, J. et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **American Journal of Human Genetics**, v. 67, n. 2, p. 444–461, 2000.

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. Melanoma of the skin. In: EDGE, S. B. et al. (Eds.). . **AJCC Cancer Staging Manual**. 8th. ed. Chicago: American College of Surgeons, 2018. p. 563–581.

ARNOLD, M. et al. Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. **JAMA Dermatology**, v. 158, n. 5, p. 495–503, 2022.

ARRINGTON III, J. H. et al. Plantar lentiginous melanoma: a distinctive variant of human cutaneous malignant melanoma. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 1, n. 2, p. 131–143, 1977.

ASCIERTO, P. A. et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 85, p. 1–9, 2012.

BAITEI, E. Y. et al. Aberrant BRAF splicing as an alternative mechanism for oncogenic B-Raf activation in thyroid carcinoma. **Journal of Pathology**, v. 217, p. 707–715, 2009.

BARNHILL, R. L. et al. Nodular melanoma. In: **Who Classification of Tumors Online - Skin Tumors**. [s.l: s.n.].

BARNHILL, R. L.; PIEPKORN, M.; BUSAM, K. J. Acral melanoma. In: BARNHILL, R. L.; PIEPKORN, M.; BUSAM, K. J. (Eds.). . **Pathology of Melanocytic Nevi and Melanoma**. 3rd. ed. Springer Heidelberg New York Dordrecht London: [s.n.]. p. 376–379.

BELLO, D. M. et al. Prognosis of acral melanoma: A series of 281 patients. **Annals of Surgical Oncology**, v. 20, n. 11, p. 3618–3625, 2013.

BIAN, S. X. et al. Acral lentiginous melanoma—Population, treatment, and survival using the NCDB from 2004 to 2015. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 34, n. 6, p. 1049–1061, 2021.

BOARD, R. E. et al. Detection of BRAF mutations in the tumour and serum of patients enrolled in the AZD6244 (ARRY-142886) advanced melanoma phase II study. **British Journal of Cancer**, v. 101, n. 10, p. 1724–1730, 2009.

BONHOMME, B. et al. Molecular Pathology of Anaplastic Thyroid Carcinomas: A Retrospective Study of 144 Cases. **Thyroid**, v. 27, n. 5, p. 682–692, 2017.

BONILLA, X. et al. Genomic analysis identifies new drivers and progression pathways in skin basal cell carcinoma. **Nature Genetics**, v. 48, n. 4, p. 398–406, 2016.

BORKOWSKA, A. et al. Mutation profile of primary subungual melanomas in Caucasians. **Oncotarget**, v. 11, n. 25, p. 2404–2413, 2020.

BOTTILLO, I. et al. Germline and somatic NF1 mutations in sporadic and NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumours. **Journal of Pathology**, v. 217, p. 693–701, 2009.

BRADFORD, P. T. et al. Acral lentiginous melanoma: Incidence and survival patterns in the United States, 1986-2005. **Archives of Dermatology**, v. 145, n. 4, p. 427–434, 2009.

BROIT, N. et al. Systematic review and meta-analysis of genomic alterations in acral melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 35, n. 3, p. 369–386, 2022.

CAMESELLE-TEIJEIRO, J. et al. BRAF mutation in solid cell nest hyperplasia associated with papillary thyroid carcinoma. A precursor lesion? **Human Pathology**, v. 40, n. 7, p. 1029–1035, 2009.

CAVANAUGH-HUSSEY, M. W. et al. Older Age is Associated with a Higher Incidence of Melanoma Death but a Lower Incidence of Sentinel Lymph Node Metastasis in the SEER Databases (2003–2011). **Annals of Surgical Oncology**, v. 22, n. 7, p. 2120–2126, 2015.

CHANG, A. E.; KARNELL, L. H.; MENCK, H. R. The national cancer data base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: A summary of 84,836 cases from the past decade. **Cancer**, v. 83, n. 8, p. 1664–1678, 1998.

CHAO, W. R. et al. High frequency of BRAF mutations in primary mucinous ovarian carcinoma of Taiwanese patients. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 60, n. 6, p. 1072–1077, 2021.

CHENG, L. et al. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: A move toward precision medicine. **Modern Pathology**, v. 31, n. 1, p. 24–38, 1 jan. 2018.

CROWSON, A. N.; MAGRO, C. M.; MIHM, M. C. Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node. **Modern Pathology**, v. 19, p. S71–

S87, 2006.

CURTIN, J. A. et al. Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 20, p. 2135–2182, 2005.

CURTIN, J. A. et al. Somatic Activation of KIT in Distinct Subtypes of Melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, p. 4340–4346, 2006.

DAFTARY, K. et al. Differences in the demographics, incidence, and survival of palmar and plantar acral melanoma: a population-based study. **Archives of Dermatological Research**, v. 315, p. 957–961, 2023.

DANKNER, M. et al. Classifying BRAF alterations in cancer: New rational therapeutic strategies for actionable mutations. **Oncogene**, v. 37, n. 24, p. 3183–3199, 2018.

DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, p. 949–954, 2002a.

DAVIES, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949–954, 2002b.

DE MELO, A. C. et al. Melanoma signature in Brazil: Epidemiology, incidence, mortality, and trend lessons from a continental mixed population country in the past 15 years. **Melanoma Research**, v. 28, n. 6, p. 629–636, 2018.

DE MÉLO, K. C. et al. Temporal analysis of malignant skin melanoma mortality in Brazil: 2000 to 2016. **Surgical and Cosmetic Dermatology**, v. 11, n. 4, p. 287–294, 2019.

DEICHMANN, M. et al. B-raf exon 15 mutations are common in primary melanoma resection specimens but not associated with clinical outcome. **Oncology**, v. 66, n. 5,

p. 411–419, 2004.

DEICHMANN, M. et al. The oncogenic B-raf V599E mutation occurs more frequently in melanomas at sun-protected body sites. **International Journal of Oncology**, v. 29, n. 1, p. 139–145, 2006.

DIKA, E. et al. BRAF, KIT, and NRAS Mutations of Acral Melanoma in White Patients. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 153, n. 5, p. 664–671, 2020.

DO, H.; DOBROVIC, A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: Causes and strategies for minimization. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 64–71, 2015.

DUMMER, R. et al. Overall survival in patients with BRAF -mutant melanoma receiving encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib (COLUMBUS): a multicentre , open-label , randomised , phase 3 trial. **Lancet Oncology**, v. 2045, n. 18, p. 1–13, 2018.

DURBEC, F. et al. Melanoma of the hand and foot: Epidemiological, prognostic and genetic features. A systematic review. **British Journal of Dermatology**, v. 166, n. 4, p. 727–739, 2012.

DUTTON-REGESTER, K. et al. Melanomas of unknown primary have a mutation profile consistent with cutaneous sun-exposed melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 26, n. 6, p. 852–860, 2013.

ECKHART, L. et al. Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 271, n. 3, p. 726–730, 2000.

ELDER, D. E. et al. Acral melanoma. In: ELDER, D. E. et al. (Eds.). . **WHO Classification of Skin Tumours**. 4th. ed. Lyon: IARC, 2018a. p. 116–118.

ELDER, D. E. et al. Low CSD-melanoma (superficial spreading melanoma). In: ELDER, D. E. et al. (Eds.). . **WHO Classification of Skin Tumours**. 4th. ed. Lyon: IARC, 2018b. p. 76–77.

ELDER, D. E. et al. Nodular melanoma. In: ELDER, D. E. et al. (Eds.). . **WHO Classification of Skin Tumours**. 4th. ed. Lyon: IARC, 2018c. p. 145–146.

ELDER, D. E. et al. Melanocytic tumours in chronically sun-exposed skin. In: ELDER, D. E. et al. (Eds.). . **WHO Classification of Skin Tumors**. 4th. ed. Lyon: IARC Press, 2018d. p. 102–107.

ELDER, D. E. et al. Acral melanoma. In: ELDER, D. E. et al. (Eds.). . **WHO Classification of Skin Tumours**. 4th. ed. Lyon: IARC Press, 2018e. p. 116–118.

ELDER, D. E.; MURPHY, G. F. Histogenetic variants of nontumorigenic melanoma (radial growth phase). In: SILVERBERG, S. G.; GARDNER, W. A.; SOBIN, L. H. (Eds.). . **Melanocytic Tumors of the Skin AFIP Atlas of Tumor Pathology**. 4th. ed. Washington, DC: American Registry of Pathology; Armed Forces Institute of Pathology, 2010. p. 278.

ERDMANN, F. et al. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008-are recent generations at higher or lower risk? **International Journal of Cancer**, v. 132, n. 2, p. 385–400, 2013.

FENG, Y. Z. et al. BRAF mutation in endometrial carcinoma and hyperplasia: Correlation with KRAS and p53 mutations and mismatch repair protein expression. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 17, p. 6133–6138, 2005.

GAJOS-MICHNIEWICZ, A.; CZYZ, M. Wnt signaling in melanoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4852, p. 1–31, 2020.

GONG, H. Z.; ZHENG, H. Y.; LI, J. Clinicopathological characteristics and prognosis of amelanotic acral melanoma: A comparative study with pigmented acral melanoma. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 61, n. 4, p. 358–361, 2020.

GRANGE, F. et al. Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 1, p. 30–39, 2015.

GUO, Y. et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 19, p. 1997–2007, 2020.

GUY, G. P. et al. Vital signs: melanoma incidence and mortality trends and projections - United States, 1982-2030. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 64, n. 21, p. 591–6, 2015.

HARVEY, N. T. et al. Circumscribed sebaceous neoplasms: a morphological, immunohistochemical and molecular analysis. **Pathology**, v. 48, n. 5, p. 454–462, 2016.

HOCKER, T.; TSAO, H. Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. **Human Mutation**, v. 28, n. 6, p. 578–588, 2007.

HOLMAN, B. N. et al. Clinical and molecular features of subungual melanomas are site-specific and distinct from acral melanomas. **Melanoma research**, v. 30, n. 6, p. 562–573, 2020.

HUGDAHL, E. et al. BRAF-V600E expression in primary nodular melanoma is associated with aggressive tumour features and reduced survival. **British Journal of Cancer**, v. 114, n. 7, p. 801–808, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). **Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer**. Rio de Janeiro: [s.n.].

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Melanoma of skin**. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>, acesso em 22 de janeiro de 2024.

ITO, T. et al. BRAF Heterogeneity in Melanoma. **Current Treatment Options in Oncology**, v. 22, n. 20, p. 1–11, 2021.

KAMATA, T. et al. Frequent BRAF or EGFR mutations in ciliated muconodular papillary tumors of the lung. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 11, n. 2, p. 261–265, 2016.

KATO, T. et al. Epidemiology and prognosis of plantar melanoma in 62 Japanese patients over a 28-year period. **International Journal of Dermatology**, v. 38, n. 7, p. 515–519, 1999.

KHOSROTEHRANI, K. et al. Melanoma survival is superior in females across all tumour stages but is influenced by age. **Archives of Dermatological Research**, v. 307, n. 8, p. 731–740, 2015.

KIM, R. H. et al. Prevalence of the EGFR T790M and other resistance mutations in the Australian population and histopathological correlation in a small subset of cases. **Pathology**, v. 52, n. 4, p. 410–420, 2020.

KINNO, T. et al. Clinicopathological features of nonsmall cell lung carcinomas with

BRAF mutations. **Annals of Oncology**, v. 25, n. 1, p. 138–142, 2014.

KOH, J. et al. Somatic mutational profiles of stage II and III gastric cancer according to tumor microenvironment immune type. **Genes Chromosomes and Cancer**, v. 58, n. 1, p. 12–22, 2019.

KORDES, M. et al. Cooperation of BRAF F595L and mutant HRAS in histiocytic sarcoma provides new insights into oncogenic BRAF signaling. **Leukemia**, v. 30, n. 4, p. 937–946, 2016.

KOWALIK, A. et al. Occurrence other than V600E mutation in the BRAF gene in papillary thyroid carcinoma. **Endocrine Abstracts**, v. 35, p. 1147, 2014.

LARKIN, J. et al. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 20, p. 1867–1876, 2014.

LEE, J. H.; CHOI, J. W.; KIM, Y. S. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: A meta-analysis. **British Journal of Dermatology**, v. 164, n. 4, p. 776–784, 2011.

LEE, S. Y. et al. Somatic mutations in epidermal growth factor receptor signaling pathway genes in non-small cell lung cancers. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 5, n. 11, p. 1734–1740, 2010.

LIN, J. et al. Polyclonality of BRAF mutations in primary melanoma and the selection of mutant alleles during progression. **British Journal of Cancer**, v. 104, n. 3, p. 464–468, 2011.

LOKHANDWALA, P. M. et al. Clinical mutational profiling and categorization of BRAF mutations in melanomas using next generation sequencing. **BMC Cancer**, v. 19, n.

665, p. 1–10, 2019.

LONG, G. V. et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 10, p. 1239–1246, 2011.

LONG, G. V et al. Overall Survival and Durable Responses in Patients With BRAF V600 – Mutant Metastatic Melanoma Receiving Dabrafenib Combined With Trametinib. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 8, p. 871–891, 2016.

MALDONADO, J. L. et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 24, p. 1878–1880, 2003.

MARKOVIC, S. N. et al. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: Epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 82, n. 3, p. 364–380, 2007.

MARTA, G. N. et al. Trends in Melanoma Mortality in Brazil: A Registry-Based Study. **JCO Global Oncology**, v. 6, p. 1766–1771, 2020.

MCARTHUR, G. A. et al. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF V600E and BRAF V600K mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3 , randomised , open-label study. **Lancet Oncology**, v. 15, p. 323–332, 2014.

MCGOVERN, V. J. The classification of melanoma and its relationship with prognosis. **Pathology**, v. 2, n. 2, p. 85–98, 1970.

MENZIES, A. M. et al. Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 12, p. 3242–3249, 2012.

MOON, K. R. et al. Genetic Alterations in Primary Acral Melanoma and Acral Melanocytic Nevus in Korea: Common Mutated Genes Show Distinct Cytomorphological Features. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 4, p. 933–945, 2018.

NIAULT, T. S.; BACCARINI, M. Targets of Raf in tumorigenesis. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 7, p. 1165–1174, 2010.

NUNES, L. F.; QUINTELLA MENDES, G. L.; KOIFMAN, R. J. Acral melanoma: A retrospective cohort from the Brazilian National Cancer Institute (INCA). **Melanoma Research**, v. 28, n. 5, p. 458–464, 2018.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Boas Práticas Clínicas : Documento das Américas. **IV Conferência Pan-Americana para harmonização da regulamentação farmacêutica**, p. 88, 2005.

OWSLEY, J. et al. Prevalence of class I – III BRAF mutations among 114 , 662 cancer patients in a large genomic database. **Experimental Biology and Medicine**, v. 246, p. 31–39, 2021.

PATEL, S. P. et al. Clinical responses to selumetinib (AZD6244; ARRY-142886)-based combination therapy stratified by gene mutations in patients with metastatic melanoma. **Cancer**, v. 119, n. 4, p. 799–805, 2013.

PATTERSON, J. W.; HOSLER, G. A.; PRENSHAW, K. L. Lentigines, Nevi and Melanomas. In: PATTERSON, J. W.; HOSLER, G. A.; PRENSHAW, K. L. (Eds.). . **Weedon's Skin Pathology**. 5th. ed. [s.l.] Elsevier Limited, 2021. p. 931.

PENA, S. D. J. et al. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 10, p. 870–876, 2009.

PENA, S. D. J. et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. 1–9, 2011.

PFISTER, S. et al. BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 5, p. 1739–1749, 2008.

PILIANG, M. P. Acral lentiginous melanoma. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 31, n. 2, p. 281–288, 2011.

PULTE, D. et al. Changes in Population-Level Survival for Advanced Solid Malignancies With New Treatment Options in the Second Decade of the 21st Century. **Cancer**, v. 125, p. 2656–2665, 2019.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria R Foundation for Statistical Computing, , 2020.

Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>

RUTERING, J. et al. Mutational Landscape of Metastatic Cancer Revealed from Prospective Clinical Sequencing of 10,000 Patients. **Nature Medicine**, v. 5, n. 6, p. 1–8, 2016.

SAMARA, M. et al. Mutation profile of KRAS and BRAF genes in patients with colorectal cancer: Association with morphological and prognostic criteria. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 16793–16802, 2015.

SCHNEIDER, B. et al. Frequent and Yet Unreported GNAQ and GNA11 Mutations are Found in Uveal Melanomas. **Pathology and Oncology Research**, v. 25, n. 4, p. 1319–1325, 2019.

SCHÖNLEBEN, F. et al. PIK3CA, KRAS, and BRAF mutations in intraductal papillary mucinous neoplasm/carcinoma (IPMN/C) of the pancreas. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 393, n. 3, p. 289–296, 2008.

SETH, R. et al. Systemic Therapy for Melanoma: ASCO Guideline. **Journal of Clinical Oncology**, v. 38, p. 3947–3970, 2020.

SI, L. et al. Prevalence of BRAF V600E mutation in Chinese melanoma patients: Large scale analysis of BRAF and NRAS mutations in a 432-case cohort. **European Journal of Cancer**, v. 48, n. 1, p. 94–100, 2012.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 70, n. 1, p. 7–30, 2020.

SINI, M. C. et al. Molecular alterations at chromosome 9p21 in melanocytic naevi and melanoma. **British Journal of Dermatology**, v. 158, n. 2, p. 243–250, 2008.

STAMATELLI, A. et al. B-Raf mutations, microsatellite instability and p53 protein expression in sporadic basal cell carcinomas. **Pathology and Oncology Research**, v. 17, n. 3, p. 633–637, 2011.

STEPHEN HODI, F. et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 8, p. 711–723, 2010.

STEVENS, N. G.; LIFF, J. M.; WEISS, N. S. Plantar melanoma: Is the incidence of melanoma of the sole of the foot really higher in blacks than whites? **International Journal of Cancer**, v. 45, n. 4, p. 691–693, 1990.

SUEHIRO, Y. et al. Epigenetic-genetic interactions in the APC/WNT, RAS/RAF, and

P53 pathways in colorectal carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 9, p. 2560–2569, 2008.

SWETTER, S. M. et al. Melanoma: Cutaneous, Version 2.2021 Featured Updates to the NCCN Guidelines. **JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 19, n. 4, p. 364–376, 2021.

TANNAPFEL, A. et al. Mutations of the BRAF gene in cholangiocarcinoma but not in hepatocellular carcinoma. **Gut**, v. 52, n. 5, p. 706–712, 2003.

TEIXIDO, C. et al. Molecular markers and targets in melanoma. **Cells**, v. 10, n. 9, p. 1–31, 2021.

TESSOULIN, B. et al. Whole-exon sequencing of human myeloma cell lines shows mutations related to myeloma patients at relapse with major hits in the DNA regulation and repair pathways. **Journal of Hematology and Oncology**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2018.

TETSU, O. et al. Mutations in the c-Kit gene disrupt mitogen-activated protein kinase signaling during tumor development in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. **Neoplasia**, v. 12, n. 9, p. 708–717, 2010.

THOMAS, N. E. et al. Tumor-Infiltrating Lymphocyte Grade in Primary Melanomas Is Independently Associated With Melanoma-Specific Survival in the Population-Based Genes , Environment and Melanoma Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 33, p. 4252–9, 2013.

THOMPSON, J. F. et al. Prognostic Significance of Mitotic Rate in Localized Primary Cutaneous Melanoma : An Analysis of Patients in the Multi-Institutional American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging Database. **Journal of Clinical**

Oncology, v. 29, p. 2199–2205, 2011.

TOUNSI GUETTITI, H. et al. BRAF V600E and Novel Somatic Mutations in Thyroid Cancer of Libyan Patients. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 23, n. 12, p. 4029–4037, 2022.

VAN DE NES, J. et al. Targeted next generation sequencing reveals unique mutation profile of primary melanocytic tumors of the central nervous system. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 127, n. 3, p. 435–444, 2016.

WEE, E. et al. Clinically amelanotic or hypomelanotic melanoma: Anatomic distribution, risk factors, and survival. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 79, n. 4, p. 645- 651.e4, 2018.

WEI, X. et al. The Clinicopathological and Survival Profiles Comparison Across Primary Sites in Acral Melanoma. **Annals of Surgical Oncology**, v. 27, n. 9, p. 3478–3485, 2020.

WELLBROCK, C.; KARASARIDES, M.; MARAIS, R. The RAF proteins take centre stage. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 11, p. 875–885, 2004.

YEH, I. et al. Targeted Genomic Profiling of Acral Melanoma. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 111, n. 10, p. 1–10, 2019.

ZEBARY, A. et al. KIT, NRAS, BRAF and PTEN mutations in a sample of Swedish patients with acral lentiginous melanoma. **Journal of Dermatological Science**, v. 72, p. 284–289, 2013.

ZELL, J. A. et al. Survival for patients with invasive cutaneous melanoma among ethnic groups: The effects of socioeconomic status and treatment. **Journal of**

Clinical Oncology, v. 26, n. 1, p. 66–75, 2008.

ZHANG, L. et al. BRAF kinase domain mutations are present in a subset of chronic myelomonocytic leukemia with wild-type RAS. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 5, p. 499–504, 2014.

APÊNDICE A – Protocolo de desparafinização *One Tube* para extração de DNA

- 1) Adicionar 200 μ L da solução (descrita ao final do protocolo).
- 2) Incubar a 90 graus Celsius por 15 minutos.
- 3) Resfriar a 55 graus Celsius por 5 minutos.
- 4) Adicionar 40 μ L de proteinase K (14 - 22mg/ml).
- 5) Incubar a 55 graus Celsius *overnight* (aproximadamente 16 horas).
- 6) Inativar a proteinase K a 80 graus Celsius por 15 minutos.
- 7) Centrifugar por 10 minutos a 13000 rpm, a 4 graus Celsius.
- 8) Transferir o sobrenadante para outro eppendorf de 1,5 ml, sem pipetar a parafina.

Purificação – KIT Invitrogen (para purificação de produto de PCR)

- 9) Adicionar 800 μ L do Binding Buffer.
- 10) Transferir 500 μ L para a coluna e centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto.
- 11) Descartar o líquido.
- 12) Repetir os passos 10 e 11.
- 13) Adicionar 650 μ L do Wash Buffer.
- 14) Centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto.
- 15) Descartar o líquido.
- 16) Centrifugar novamente a 13000 rpm por 3 minutos.
- 17) Transferir a coluna para um novo eppendorf de 1,5 ml.
- 18) Adicionar 50 μ L do Elution Buffer.
- 19) Aguarde 5 minutos (temperatura ambiente).
- 20) Centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto.

Solução: 50 mmol/l Tris-HCL (pH 8.5), 100 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 0,5% Tween 20 e 0,5% NP40.

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Projeto de pesquisa: Características moleculares e sua relação com fatores prognósticos histopatológicos no melanoma acral de pacientes do INCA.

Investigador principal: Aretha Brito Nobre

Nome do Voluntário: _____

Você está sendo convidado(a) a participar de um projeto porque tem diagnóstico de melanoma acral. Para que você possa decidir se quer participar ou não deste projeto, precisa conhecer seus benefícios, riscos e conseqüências. Após receber todas as informações abaixo, você poderá fornecer seu consentimento por escrito, caso queira participar.

PROPÓSITO DO PROJETO:

No Instituto Nacional de Câncer (INCA) está sendo desenvolvido um projeto de pesquisa que deverá ajudar na obtenção de conhecimento sobre um determinado tipo de câncer de pele chamado melanoma acral. Você está sendo convidado (a) a participar deste projeto de pesquisa porque teve o diagnóstico de melanoma acral. O objetivo desse projeto de pesquisa é identificar algumas características das células deste tipo de melanoma que, talvez futuramente, possam ajudar no tratamento dos pacientes com esse tipo de câncer.

OBJETIVO DO PROJETO:

Estamos buscando identificar características de moléculas presentes nas células do melanoma acral, ou seja, tentando caracterizar parte do perfil molecular de melanoma acral de pacientes matriculados no INCA. Além disso, tentaremos relacionar essas características com os achados da patologia (histopatológico).

PROCEDIMENTOS DO PROJETO:

Se você concordar em participar deste projeto de pesquisa, os pesquisadores participantes consultarão seus registros médicos e poderão utilizar parte do material armazenado no arquivo da Divisão de Patologia (DIPAT) do INCA que foi utilizado para seu diagnóstico (isto é, blocos de parafina). O seu tumor será analisado por técnicas de laboratório para pesquisar as características do melanoma.

MÉTODOS ALTERNATIVOS:

Caso você não deseje participar deste projeto de pesquisa, basta que você não assine este Termo de Consentimento, e nenhuma amostra de tumor será utilizada, nem os seus registros médicos serão consultados.

RISCOS:

Não estão previstos riscos físicos a você pela sua participação neste projeto. Nenhuma nova amostra de tumor será coletada para realização deste projeto. Os materiais utilizados nesse projeto de pesquisa são parte excedente dos materiais coletados para exames laboratoriais de rotina que são importantes para o diagnóstico de sua doença. Apenas uma parte do seu tumor arquivada na Divisão de Patologia (DIPAT) do INCA será utilizada para este projeto de pesquisa.

BENEFÍCIOS:

Este projeto de pesquisa não oferece benefícios diretos a você. Se você concordar com o uso do material biológico do modo descrito acima, é necessário esclarecer que você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre eventuais resultados decorrentes das pesquisas. O benefício principal da sua participação é possibilitar que, no futuro, com os resultados alcançados com esse projeto, tratamentos mais eficazes possam ser desenvolvidos para os pacientes que tenham esse tipo de tumor.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS:

Seu acompanhamento médico no Instituto Nacional de Câncer (INCA) não sofrerá nenhum tipo de alteração por conta de sua participação neste projeto. Todo o seu tratamento e acompanhamento médico serão os mesmos, independentes de sua decisão de autorizar ou não a participação no projeto.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS:

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA) e equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado, nem seu número de prontuário, ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos. Nenhum dado que identifique você será revelado.

CUSTOS:

Se você concordar com o uso de uma amostra de seu tumor do modo descrito acima, é necessário esclarecer que você não terá quaisquer custos ou forma de pagamento pela sua participação no projeto de pesquisa. Você não precisará vir ao hospital para realizar nenhum procedimento referente a este projeto. A participação no projeto é voluntária e você não sofrerá nenhuma penalidade caso não autorize a sua participação. Todo o seu tratamento e acompanhamento médico serão os mesmos, independentes de sua decisão de autorizar ou não a participação no projeto.

BASES DA PARTICIPAÇÃO:

É importante que você saiba que a sua participação neste projeto é completamente voluntária e que você pode se recusar a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de

benefícios aos quais você tem direito. Caso você decida interromper sua participação no projeto, a equipe assistente deve ser comunicada, a utilização do material armazenado e os exames relativos ao projeto serão imediatamente interrompidos e nenhum dado de seu registro médico será utilizado.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS:

Nós estimulamos você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento da realização deste projeto. Neste caso, por favor, ligue para a Dra. Aretha Nobre, no telefone 32073445. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do projeto, também pode contar com um contato imparcial, o CEP-INCA. O CEP-INCA é um órgão institucional que tem por objetivo proteger o bem-estar dos participantes da pesquisa. Se você tem perguntas sobre os seus direitos como um participante da pesquisa, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Nacional de Câncer, situado à Rua do Resende 128 sala 203, Centro, Rio de Janeiro. Endereço eletrônico: cep@inca.gov.br Telefones: (21) 3207-4550/4556 – Horário de Atendimento: 09:00 às 16:00 horas.

CONSENTIMENTO:

Li as informações acima e entendi o propósito deste projeto assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Ficou claro que minha participação é isenta de despesas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste projeto.

Eu recebi uma via assinada deste formulário de consentimento.

_____ ____ / ____ / ____
(Assinatura do Paciente) dia mês ano

(Nome do Paciente – letra de forma)

_____ ____ / ____ / ____
(Assinatura de Testemunha, se necessário) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste projeto ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

_____ ____ / ____ / ____
(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano

Rubrica do paciente

Rubrica do pesquisador

APÊNDICE C – Definição dos estádios clínicos (AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER, 2018)

T	N	M	Estádio clínico
Tis	N0	M0	0
T1a	N0	M0	IA
T1b	N0	M0	IB
T2a	N0	M0	IB
T2b	N0	M0	IIA
T3a	N0	M0	IIA
T3b	N0	M0	IIB
T4a	N0	M0	IIB
T4b	N0	M0	IIC
Qualquer T	≥ N1	M0	III
Qualquer T	Qualquer N	M1	IV

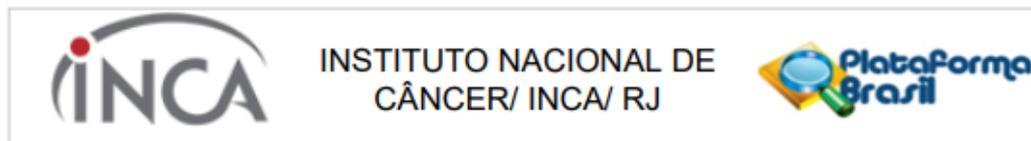
	Espessura de Breslow	Ulceração
Tis (melanoma in situ)	Não aplicável	Não aplicável
T1		
T1a	< 0,8 mm	sem ulceração
T1b	< 0,8 mm	com ulceração
	0,8 mm - 1,0 mm	com ou sem ulceração
T2		
T2a	>1,0 - 2,0 mm	sem ulceração
T2b	>1,0 - 2,0 mm	com ulceração
T3		
T3a	>2,0 mm - 4,0 mm	sem ulceração
T3b	>2,0 mm - 4,0 mm	com ulceração
T4		
T4a	> 4,0 mm	sem ulceração
T4b	> 4,0 mm	com ulceração

≥ N1: Metástase para linfonodo regional ou metástase em trânsito, lesão satélite e/ou microssatelite sem linfonodos com metástase.

ANEXO A – Prêmio de primeiro lugar na Categoria Trabalhos de Investigação, apresentado durante a Décima Quarta Conferência Brasileira sobre Melanoma, Curitiba, 2021.



ANEXO B – Parecer consubstanciado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Características moleculares e sua relação com fatores prognósticos histopatológicos no melanoma acral de pacientes do INCA.

Pesquisador: Aretha Brito Nobre

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 40068614.1.0000.5274

Instituição Proponente: Divisão de Patologia

Patrocinador Principal: Instituto Nacional do Câncer

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 958.016

Data da Relatoria: 23/02/2015

Apresentação do Projeto:

Conforme Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 942.007, datado de 30 de Janeiro de 2015.

Objetivo da Pesquisa:

Conforme Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 942.007, datado de 30 de Janeiro de 2015.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 942.007, datado de 30 de Janeiro de 2015.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 942.007, datado de 30 de Janeiro de 2015.

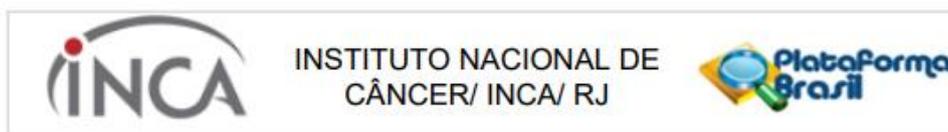
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 942.007, datado de 30 de Janeiro de 2015.

Recomendações:

Não se aplica.

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO **CEP:** 20.231-092
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 **Fax:** (21)3207-4556 **E-mail:** cep@inca.gov.br



Continuação do Parecer: 958.016

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se da análise das pendências apontadas no Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 942.007, datado de 30 de Janeiro de 2015:

1 - Quanto ao Protocolo de Pesquisa:

1.1 - Com base na Resolução 466/12, solicitam-se esclarecimentos sobre como será conduzido o processo de obtenção do consentimento informado.

1.2 - Quanto ao cronograma, solicita-se adequação em relação à data de início do estudo, dado que o mesmo ainda se encontra em análise no CEP-INCA

1.3 - Quanto ao orçamento, solicita-se discriminar as despesas previstas (por exemplo, materiais de escritório, exames imuno-histoquímicos, análises moleculares, etc.)

1.4 - No corpo do projeto e no cadastro da PB, alterar ao lonho do texto os termos "descritivo" por "associação" e nos "Objetivos Secundários" substituir o termo "Relacionar" por "Assiciar".

1.5 - No cadastro da PB, alterar a fonte de financiamento de "Próprio" para "Institucional".

RESPOSTAS:

1.2 – Cronograma alterado. Início do estudo modificado para 16.03.2015.

1.3 – Despesas discriminadas, conforme sugestão.

1.4 – Modificado conforme sugestão. As alterações realizadas estão em vermelho, nas páginas 12, 13 e 18 do projeto.

1.5 – Modificado conforme sugestão.

ANÁLISE: PENDÊNCIAS ATENDIDAS

2 - Quanto ao TCLE:

2.1 - Solicita-se que o documento contenha uma breve descrição do que é um Comitê de Ética em Pesquisa e qual o seu papel na avaliação e monitoramento de uma pesquisa.

2.2 - Solicita-se que o termo "cópia" seja substituído por "via".

RESPOSTAS:

2.1 – Modificado conforme sugestão. A alteração realizada está em vermelho na página 4 do TCLE.

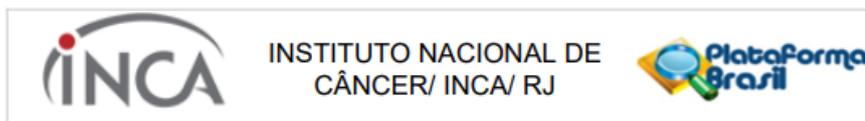
2.2 - Modificado conforme sugestão. A alteração realizada está em vermelho na página 5 do TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIAS ATENDIDAS

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO **CEP:** 20.231-092
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 **Fax:** (21)3207-4556 **E-mail:** cep@inca.gov.br



Continuação do Parecer: 958.016

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Ressalto o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo.

RIO DE JANEIRO, 20 de Fevereiro de 2015

Assinado por:
Carlos Henrique Debenedito Silva
(Coordenador)