

# Estudo genético do gene p16 pela técnica de PCR-SSCP e expressão de proteína p16 em melanomas de mucosa oral e melanomas cutâneos\*

## *Genetic analysis of p16 gene by PCR-SSCP technique and protein p16 expression in oral mucosa and skin melanomas\**

Ricardo Hsieh<sup>1</sup>Fabrício Bitu Sousa<sup>2</sup>Aline Firmiano<sup>3</sup>Fabio Daumas Nunes<sup>4</sup>Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães<sup>5</sup>Mírian Nacagami Sotto<sup>6</sup>

**Resumo:** FUNDAMENTOS - A deleção e mutação do gene CDKN2a que codifica um inibidor específico da ciclina dependente de quinase 4, a proteína p16, têm sido implicadas na tumorigênese do melanoma cutâneo. Entretanto, pouco se conhece sobre essas alterações genéticas em melanomas de mucosa oral.

OBJETIVOS - Verificar a presença de alterações no gene p16 e sua expressão protéica em melanomas esporádicos orais e cutâneos.

MATERIAL E MÉTODOS - Avaliaram-se 36 espécimes de melanoma primário (sete orais e 29 cutâneos). Analisaram-se três exons do gene p16, pela técnica da reação em cadeia da polimerase/polimorfismo conformacional de fita simples do DNA. Verificou-se a expressão tecidual de proteína p16 por técnica imuno-histoquímica. Relacionaram-se os resultados com a espessura dos melanomas cutâneos.

RESULTADOS - Cinco dos sete melanomas orais e 17 dos 29 melanomas cutâneos apresentaram indício de alteração no gene p16. Alterações do exon 2 foram as mais freqüentes, sendo 19 casos nos produtos obtidos com o mesmo iniciador. Observou-se expressão tecidual de p16 em apenas um melanoma oral, em 10/13 (76,9%) casos de melanoma cutâneo de espessura até 1mm e em sete de oito (87,5%) casos de espessura superior a 1mm.

CONCLUSÃO - A freqüência de indícios de alteração na análise genética de p16 nos melanomas de mucosa oral foi de 71,42% e de 58,6% nos cutâneos. É possível sugerir a participação de alterações do gene p16 na patogenia do melanoma esporádico de mucosa oral. Não houve relação da sugestão de alteração genética do gene p16 e de sua expressão tecidual com a espessura dos melanomas cutâneos de diferentes subtipos histológicos.

Palavras-chave: Biologia molecular; Genes p16; Imuno-histoquímica; Melanoma

**Abstract:** BACKGROUND - Deletion and mutation of gene CDKN2a, which encodes a specific inhibitor of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4), the protein p16, has been regarded as related to cutaneous melanoma tumorigenesis. However, little is known about those alterations in oral mucosa melanomas.

OBJECTIVES - To verify possible p16 gene mutations and its protein expression in sporadic melanomas in oral mucosa and skin.

MATERIAL AND METHODS - 36 primary sporadic melanoma paraffin-embedded specimens (seven oral mucosa and 29 skin lesions) were subjected to molecular analysis of exons 1, 2 and 3 of p16 gene using polymerase chain reaction/single strand conformational polymorphism technique. p16 protein expression was demonstrated by an immunohistochemical technique. Data obtained were correlated with tumor thickness.

RESULTS - Five out of seven oral melanomas, and 17 out of 29 skin lesions displayed signs of alteration in p16 gene molecular analysis. Alterations in exon 2 of p16 gene were the most frequent. Protein p16 expression was observed in only one oral melanoma and in 10/13 (76.9%) skin melanomas up to 1.0 mm-thick and in 7/8 (87.5%) lesions thicker than 1.0 mm.

CONCLUSIONS - Frequency of alterations disclosed by p16 gene molecular analysis in oral mucosa melanomas was 71.42% and 58.6% in cutaneous lesions. The obtained data suggest that p16 gene alterations play a role in the pathogenesis of sporadic melanoma of the oral mucosa. Neither protein p16 expression, nor p16 gene alteration had correlation with tumor thickness.

Keywords: Genes, p16; Immunohistochemistry; Melanoma; Molecular biology

Recebido em 06.07.2005.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 29.08.2006.

\* Trabalho realizado no Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina e no Laboratório de Biologia Molecular da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia. Universidade de São Paulo - São Paulo (SP), Brasil.

Conflito de interesse declarado: Nenhum

<sup>1</sup> Mestrando em Dermatologia no Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - São Paulo (SP), Brasil. Bolsista CAPES.

<sup>2</sup> Professor Doutor do Departamento de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Ceará - Fortaleza (CE), Brasil. Pós-Doutorado no Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - São Paulo (SP), Brasil.

<sup>3</sup> Aluna de Iniciação Científica, Graduanda de Biomedicina. Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - São Paulo (SP), Brasil.

<sup>4</sup> Professor-associado da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - São Paulo (SP), Brasil.

<sup>5</sup> Professora-associada da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo - São Paulo (SP), Brasil.

<sup>6</sup> Professora-associada do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - São Paulo (SP), Brasil.

## INTRODUÇÃO

O melanoma é o mais maligno dos tumores cutâneos e acomete indivíduos predominantemente na idade adulta, entre 30 e 60 anos de idade. A incidência de melanomas cutâneos, apesar dos avanços no campo da prevenção, tem aumentado.<sup>1</sup> Nos Estados Unidos, a incidência desse tumor passou de 1:1.500 indivíduos, em 1953, para 1:100 indivíduos, em 1996.<sup>2</sup>

Cerca de 90% dos melanomas ocorrem na superfície cutânea, e quase 2% surgem nas superfícies mucosas. Os sítios mais comuns para melanomas mucosos são a região de cabeça e pescoço. Melanomas mucosos, em geral, ocorrem com incidência anual de quatro casos por 10 milhões de habitantes, enquanto melanomas orais têm incidência de 1,2 caso por 10 milhões de habitantes/ano.<sup>3</sup>

Os melanomas orais acometem indivíduos na sexta e sétima décadas de vida. Os sítios anatômicos mais comuns são palato duro, gengiva e mucosa alveolar,<sup>4</sup> representando 0,5% das neoplasias da cavidade oral. As séries de melanomas bucais recentemente descritas têm números pequenos de casos, como a série de Garzino-Demo et al.,<sup>5</sup> com 10 casos num período de 10 anos, e a de Buchner et al.,<sup>6</sup> com cinco casos no total de 773 lesões melanocíticas solitárias bucais, num período de 19 anos.

A deleção e mutação do gene MTS1 (multiple tumor suppressor 1) localizado no cromossomo 9p21, que codifica um inibidor da ciclina dependente de quinase 4, p16, têm sido implicadas na tumorigênese do melanoma e de outras neoplasias.<sup>7</sup> A perda de expressão de p16 tem sido relacionada com a progressão do melanoma familiar.<sup>8</sup> Entretanto, a perda parcial ou incompleta de expressão de p16 é também verificada nos melanomas esporádicos.<sup>9</sup>

Pouco se conhece a respeito da tumorigênese dos melanomas mucosos da cavidade oral. Na tentativa de compreender os mecanismos peculiares dessa neoplasia, buscou-se verificar a existência de possíveis alterações do gene p16, por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase/polimorfismo conformacional de fita simples do DNA (PCR-SSCP), e a expressão da proteína p16, pela análise imuno-histoquímica, e sua correlação com melanomas cutâneos.

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram avaliados 36 espécimes de melanoma primário. Sete eram de lesões da cavidade oral (três do palato, três do palato com extensão para o rebordo alveolar e um do lábio inferior) e 29 de lesões cutâneas (seis casos de lentigo maligno melanoma de até 1mm de espessura, um caso de lentigo maligno melanoma de espessura superior a 1mm; cinco casos de melanoma de tipo extensivo superficial de até 1mm de espessura; seis casos de melanoma de tipo extensi-

vo superficial de espessura superior a 1mm; quatro casos de melanoma acral lentiginoso com espessura de até 1mm e sete casos de melanoma acral lentiginoso de espessura superior a 1mm). Nenhum paciente apresentava antecedentes familiares de melanoma.

## Análise genética de p16

Foram obtidos entre 10 e 20 cortes de 10µm dos espécimes embebidos em parafina, colhidos em lâminas de vidro previamente lavadas em álcool absoluto. Com o auxílio de lâmina de bisturi, o tecido tumoral foi microdissecado dos cortes não corados e visualizado com lupa estereoscópica. Como referência foram utilizados cortes seqüenciais, corados com hematoxilina e eosina, de forma a auxiliar no momento da microdissecção.<sup>10,11</sup> O material dissecado, em condições estéreis, foi transportado para tubos Eppendorf para a extração do DNA. Para tanto, os cortes foram submetidos à desparafinização com xilol a 65°C e lavagem em cadeia descendente de etanóis.

O material foi incubado em tampão de lise (Tris-HCl 1M pH 8,0; EDTA 0,5M pH8; NaCl 1M; SDS 10%) e proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) na concentração de 500µg/µL. Os tubos foram mantidos em banho-maria de três a cinco dias a 55°C, até a completa dissolução do corpo de fundo do tecido. Adicionou-se proteinase K (10 a 30µL na concentração de 250µg/µL) em intervalos de 24 horas, e os tubos foram invertidos, pelo menos uma vez ao dia. Fez-se a inativação da enzima por meio de temperatura de 95°C, durante 10 minutos.<sup>12,13</sup>

Foram adicionados aos tubos Eppendorf 200µL de acetato de amônio 4M (Synth, BR), para a precipitação da proteína. Fez-se agitação por 20 segundos, em velocidade máxima, em cuba com gelo, durante cinco minutos, e centrifugação a 15.000 x g, por três minutos. O sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para outro tubo de 1,5mL. Para a precipitação do DNA foram adicionados 600µL de isopropanol. Após homogeneização, fez-se centrifugação a 15.000 x g por cinco minutos. O corpo de fundo dos tubos foi lavado com etanol 70% e centrifugado a 16.000 x g, por um minuto. Removido o etanol 70%, o corpo de fundo do DNA foi dissolvido em 30-50µL de tampão TE (Tris-HCL 10mM, pH 7,4 e EDTA 1mM, pH 8) e mantido a 4°C até a quantificação e detecção da pureza em espectrofotômetro para utilização na PCR.

Obtidas as amostras de DNA dos casos avaliados, fez-se a quantificação espectrofotométrica (260/280nm) em espectrofotômetro (DU 640, Nucleic Acid and Protein Analyzer, Beckman, USA) utilizando 5µL do DNA e 995µL de solução de TRIS/EDTA. A integridade do material foi visualizada em gel de agarose 0,8% (massa/volume) contendo 5µL de brometo de etídio (GIBCO BRL, Life

Technologies). Os DNAs foram diluídos para a concentração final de 100ng a partir do resultado obtido relativo à concentração do DNA, em cada caso.

A análise de possíveis alterações do gene p16 foi realizada pela técnica de PCR-SSCP.<sup>14</sup>

Os iniciadores (Quadro 1) foram desenhados com base em seqüência depositada no GeneBank (número de acesso AF527803) utilizando o programa GeneTool 1.0 (BioTools Incorporated, Alberta, Canadá), para amplificar no máximo 200 pares de bases (pb) dos exons 1, 2 e 3 do gene p16.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador modelo PTC-100TM (Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc.). Submeteu-se o material durante dois minutos a 95°C, seguidos por 35 ou 38 ciclos de um minuto a 94°C, um minuto entre 60°C e 64°C (conforme o iniciador, quadro 1) e 40 segundos a 72°C, finalizando com uma extensão de 10 minutos a 72°C. A amplificação de cada um dos casos foi verificada pela passagem de 10µL do produto da PCR em gel de agarose 1% (1g de NueSieve) GTG) agarose - FMC, BioProducts, Rockland, Manie USA; 1g de Seakem) GTG) agarose - FMC, BioProducts, Rockland, Manie USA; 100mL de TRIS-acetato/EDTA 10X, 4µL de brometo de etídio) contido em uma cuba de eletroforese (OWL Scientific Plastics, Inc., USA). Utilizaram-se 5µL de "Low DNA Mass Ladder" (Life Technologies, Gibco BRL, U.S.) para estimar a massa do exemplar de DNA dos casos e para comparar a intensidade das bandas.

Constatada a amplificação dos produtos de PCR em gel de agarose, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (modificação do método de Maniatis et

al.<sup>15</sup>). Foi utilizado gel na concentração de 8% (29,9ml de H<sub>2</sub>O mili-Q, 2,6mL TAE 10X, 5,2mL de glicerol 50%, 14,3mL de acrilamida 30%, 520µL APS 10% e 52µL Temed) obtendo-se uma faixa efetiva de separação de 60 a 400pb, abrangendo assim a faixa de tamanho dos fragmentos do estudo. O produto da PCR foi misturado a um tampão de corrida (formamida 98%, EDTA 10mM, bromofenolblue 0,05% e xilenocyanol 0,05%) e colocado a 95°C durante 10 minutos para a desnaturação. Após seu resfriamento em gelo, a mistura foi aplicada nas canaletas do gel, montado na cuba de eletroforese. Em uma das canaletas foi aplicado o padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder, Life Technologies) para a determinação do peso molecular do fragmento amplificado. A corrida foi feita em tampão TAE 1X, durante aproximadamente cinco horas, à temperatura ambiente (TA). Após o término da corrida, o gel foi corado pela prata e revelado para a visualização das bandas do DNA. Inicialmente fez-se uma fixação com solução de etanol 10% e ácido acético 0,75% durante 20 minutos. Em seguida, procedeu-se à impregnação pela prata 0,2% durante 30 minutos, lavagem em água mili-q durante dois minutos, revelação em solução de NaOH 3% e formaldeído 0,3% por no mínimo 20 minutos. A reação foi finalizada com solução de ácido acético 10% durante 10 minutos, lavagem em água mili-Q durante 10 minutos e secagem em papel celofane. Todos os procedimentos foram realizados na ausência de luz, sob agitação à TA (método modificado de Bassan et al.<sup>16</sup>).

Em todas as reações de PCR foram utilizados controle positivo (caso de hiperplasia fibrosa inflamatória oral) e controle negativo, constituído por todos

**QUADRO 1:** Estudo genético do gene p16. Seqüência dos iniciadores utilizados segundo o exon e número de pares de base

Exon	Iniciadores	Seqüência (5' - 3')	Tamanho (pb)	Ciclos	TM (°C)
1	P16G	GGAGGGGCTGGCTGGTCAC CGCACCTCCTTACCCGACC	181	38	64
	P16F	CGGGGTCGGGTAGAGGAGGTGC GCGCTACCTGATTCCAATCCC	173	35	60
2	P16E	TGGAAACTGGAAGCAAATGTAGG CGCGCCGTGGAGCAGCAG	198	35	60
	P16D	GGAGCCCAACTGCGCCGACCC GCAGCCGCGCGCAGGTACCGT	198	35	64
	P16C	GCGGGGGGCACCAGAGGCAGTAA CCGATTGGCGCGTGAGCTGAGG	186	35	62
3	P16B	CCCCGGTCGCGCTTTCTCTG CGTCCCTACCGGCATTGAAA	195	35	60
	P16A	CAAGAGAGGAGGGCGGGATGTG CTACGAAAGCGGGGTGGGTTGT	197	35	62

pb- pares de base; TM - temperatura média

os reagentes presentes na reação e isento de DNA.

A observação e documentação das reações foi feita por transluminador de luz ultravioleta (UV – Fotodyne, INC) e câmera fotográfica Polaroid (DS 4 – Fischer Biotech), com filme Polaroid tipo 667. Em todos os géis foi colocado, para interpretação padrão, um marcador de pb (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen).

Todos os géis foram “escaneados” e gravados em formato TIFF, RGB, 300 dpis (preto-e-branco) no programa AdobePhotoshop 5.0. Os resultados de cada caso foram comparados ao do espécime de hiperplasia fibrosa inflamatória oral. A análise foi realizada por três observadores e se estabeleceram padrões comparativos de análise (do 1 ao 14). Todos os procedimentos foram realizados em duplicata.

### Demonstração de expressão de proteína p16

Fez-se a demonstração de possível expressão da proteína p16 por meio da técnica de imuno-histoquímica, com o anticorpo primário monoclonal p16<sup>INKa</sup> Ab-4, clone 16P04 Labvision (Fremont, CA, USA) diluído 1/40, precedida de exposição antigênica com tampão citrato pH 6,0 aquecido por microondas. Fez-se incubação com o anticorpo primário, durante uma noite, a 4°C e revelação da reação com o sistema LSAB-DAKO. O cromógeno utilizado foi a 3,3'-diaminobenzidine com níquel (DAB/Níquel). Omitiu-se a contracoloração para facilitar a visualização da reatividade nuclear. Como controle positivo da reação utilizaram-se fragmentos de nevo nevocelular.<sup>17,18</sup> Como controle negativo da reação, o anticorpo primário foi substituído por solução salina tamponada com fosfato. A expressão de p16 foi considerada positiva quando mais de 10% das células neoplásicas exibiam imunomarcagem nuclear ao exame de campos microscópicos de 400x.<sup>19</sup>

### RESULTADOS

Os resultados da análise molecular do gene p16 em sete melanomas da cavidade oral e 29 tumores cutâneos estão relatados abaixo e no quadro 2. Não houve amplificação em dois dos espécimes de melanoma de cavidade oral.

#### Exon 1

Ao se analisarem os padrões de migração de bandas referentes aos produtos de PCR do iniciador p16F, observou-se um único padrão (padrão 10), semelhante ao controle. Com o iniciador p16G observaram-se quatro padrões de migração de bandas: padrão 11 (padrão normal semelhante ao controle) e padrões 12, 13 e 14 (padrões sugestivos de alterações). Os melanomas da mucosa oral exibiram padrão 13, e os tumores cutâneos, independentemente de sua espessura, demonstraram padrões 12, 13 e 14 de migração de bandas (Figura 1).

#### Exon 2

Três padrões de migração de bandas foram verificados com o iniciador p16C: o padrão 5 (padrão normal semelhante ao controle) e os padrões 6 e 7 (padrões sugestivos de alterações). Melanomas mucosos e melanomas cutâneos extensivos superficiais demonstraram os padrões 6 e 7 de migração; os subtipos lentigo maligno e acral lentiginoso apresentaram apenas o padrão 6 de migração. Os padrões 8 e 9, referentes aos iniciadores p16D e p16E, respectivamente, foram semelhantes aos padrões exibidos pelo controle (Figura 2).

#### Exon 3

Com o iniciador p16A, o mesmo padrão de migração de bandas (semelhante ao controle – padrão 1) foi encontrado tanto nos tumores de mucosa oral quanto nos tumores cutâneos, não demonstrando assim qualquer indício de alteração dessa região do gene. Com o iniciador p16B foram observados três padrões de migração de bandas: padrão 2 (semelhante ao controle) e padrões 3 e 4 (padrões sugestivos de alteração). O padrão 3 foi observado nos casos de lentigo maligno melanoma de espessura menor ou igual a 1mm. O padrão 4 foi encontrado nos melanomas de tipo extensivo superficial, independente de sua espessura. Todos os tumores mucosos exibiram o padrão 2 de migração de bandas (Figura 3).

### Demonstração de expressão de proteína p16

No controle positivo representado por nevo nevocelular, a expressão de p16 fez-se com padrão de marcação nuclear forte e, por vezes, marcação citoplasmática (Figura 4A). A imunomarcagem citoplasmática não foi considerada positividade de expressão de p16 nos casos estudados.

Dos cinco melanomas mucosos apenas um (caso 30) exibiu imunomarcagem nuclear em cerca de 30% das células neoplásicas (Figura 4B).

Dos 21 casos de melanoma cutâneo submetidos à imuno-histoquímica para demonstração da proteína p16, 17 apresentaram imunomarcagem nuclear considerada positiva (i.e. acima de 10% de núcleos de células neoplásicas imunomarcados). Dos seis casos de lentigo maligno melanoma de espessura de até 1mm, cinco apresentaram expressão de p16. O único caso de lentigo maligno melanoma de espessura superior a 1mm não exibiu imunomarcagem positiva. Quatro em cinco casos de melanoma extensivo superficial delgado (de até 1mm de espessura) expressaram a proteína p16. Os quatro casos de melanoma extensivo superficial, com espessura superior a 1mm, marcaram-se pelo anticorpo p16. Um de dois casos de melanoma acral lentiginoso de até 1mm de espessura exibiu imunomarcagem para p16 (Figura 4C), e todos os três casos de melano-

**QUADRO 2:** Análise molecular de p16 pela técnica de PCR-SSCP e demonstração da expressão de p16 por técnica imuno-histoquímica em melanomas orais e cutâneos

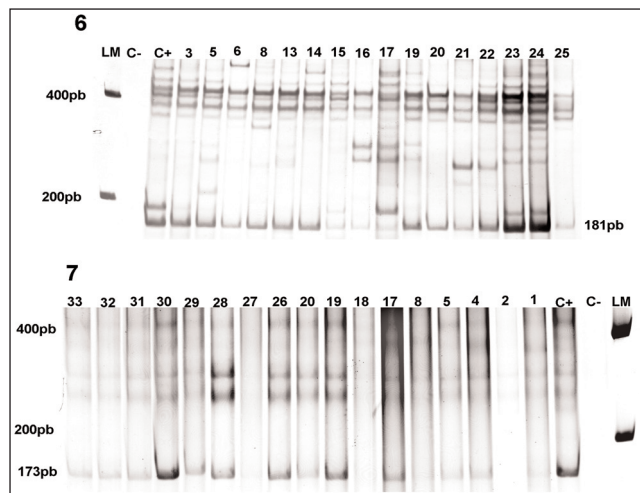
Tipo	Casos	EXON 3		EXON 2			EXON 1		Proteína p16
		p16A	p16B	p16C	p16D	p16E	p16F	p16G	
<b>Melanoma Oral</b>	7	NA	P2	P6*	P8	NA	NA	NA	Neg
	8	P1	P2	P7*	P8	P9	P10	P13*	Neg
	9	P1	NA	P6*	NA	P9	NA	NA	NR
	18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NR
	29	P1	P2	P6*	P8	P9	P10	NA	Neg
	30	P1	P2	P6*	P8	P9	P10	NA	Pos
	36	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	Neg
<b>L1</b>	5	P1	P2	P6*	NA	P9	P10	P12*	Pos
	6	P1	P3*	NA	NA	NA	NA	P13*	Pos
	10	NA	NA	P5	NA	NA	NA	NA	Neg
	11	P1	P2	P6*	NA	NA	NA	NA	Pos
	15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	P11	Pos
	21	P1	P2	P6*	P8	P9	NA	P14*	Pos
<b>L2</b>	4	P1	P2	NA	P8	P9	P10	NA	Neg
<b>S1</b>	14	P1	P4*	P6*	NA	P9	P10	P13*	Neg
	17	P1	P2	P5	P8	P9	P10	P11	Pos
	19	P1	P4*	P7*	P8	NA	P10	P12*	Pos
	22	P1	NA	P5	P8	P9	P10	P14*	Pos
	23	P1	NA	P5	P8	P9	P10	P11	Pos
<b>S2</b>	3	P1	P2	P5	P8	P9	P10	P11	Pos
	13	P1	P4*	P6*	P8	P9	P10	P13*	Pos
	20	P1	P4*	P7*	NA	NA	P10	P12*	Pos
	24	P1	NA	P5	P8	P9	P10	P11	Pos
	27	P1	P2	P5	NA	P9	P10	NA	NR
	28	P1	NA	P6*	NA	NA	P10	NA	NR
<b>A1</b>	16	P1	NA	P6*	NA	NA	NA	P12*	Neg
	32	P1	P2	P6*	NA	P9	P10	NA	Pos
	33	P1	P2	P5	NA	P9	P10	NA	NR
	35	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NR
<b>A2</b>	1	P1	P2	P6*	P8	P9	P10	NA	NR
	2	NA	NA	P5	P8	NA	P10	NA	Pos
	12	NA	NA	P6*	NA	NA	NA	NA	NR
	25	P1	NA	NA	NA	NA	P10	P12*	Pos
	26	P1	P2	P6*	NA	P9	P10	NA	Pos
	31	P1	P2	P6*	NA	P9	P10	NA	NR
	34	NA	P2	NA	NA	P9	NA	NA	NR

L1: Lentigo maligno melanoma inferior ou igual a 1mm; L2: Lentigo maligno melanoma superior a 1mm; S1: Melanoma extensivo superficial inferior ou igual a 1mm; S2: Melanoma extensivo superficial superior a 1mm; A1: Melanoma acral lentiginoso inferior ou igual a 1mm; A2: Melanoma acral lentiginoso superior a 1mm; NA: não amplificou; P1: Padrão 1 (semelhante ao controle); P2: Padrão 2 (semelhante ao controle); P3\* (indício de alteração); P4\* (indício de alteração); P5: Padrão 5 (semelhante ao controle); P6\*: Padrão 6 (indício de alteração); P7\*: Padrão 7 (indício de alteração); P8: Padrão 8 (semelhante ao controle); P9: Padrão 9 (semelhante ao controle); P10: Padrão 10 (semelhante ao controle); P11: Padrão 11 (semelhante ao controle); P12\*: Padrão 12 (indício de alteração); P13\*: Padrão 13 (indício de alteração); P14\*: Padrão 14 (indício de alteração). NR: não realizada. Controle da análise molecular de p16: extrato de DNA de espécime de hiperplasia fibrosa inflamatória de mucosa oral. Pos: presença de expressão de p16; Neg: ausência de expressão de p16

ma acral lentiginoso espesso (espessura superior a 1mm) expressaram a proteína p16 (Figura 4D).

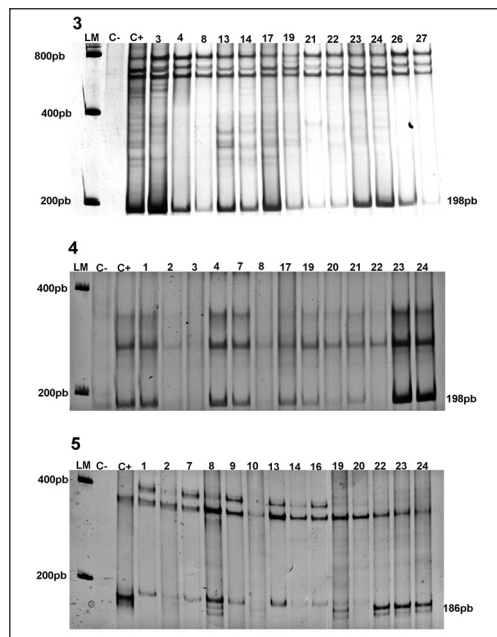
Comparando-se, nos mesmos tumores, os resultados da expressão, ou ausência de expressão, de p16 (pela técnica imuno-histoquímica) com os indícios de

alteração observados pela análise molecular (Quadro 1), observa-se que: três dos quatro casos de melanoma de mucosa oral com ausência de expressão de proteína p16, ao estudo imuno-histoquímico, apresentaram alteração na análise molecular do gene p16. O caso com presença



**FIGURA 1:** Análise molecular do gene p16 pela técnica de PCR/SSCP com iniciadores do exon 1: 6) p16G – padrão 11 (semelhante ao controle): casos 3, 15, 17, 23, 24; padrão 12: casos 5, 16, 19, 20, 25; padrão 13 (sugestivo de alteração): casos 6, 8, 13, 14; padrão 14 (sugestivo de alteração): casos 21, 22. 7) p16F – todos os casos com padrão 10 (semelhante ao controle). LM: “Low Mass”; Pb: Pares de bases; C: controle (hiperplasia fibrosa inflamatória); C-: controle negativo

de expressão tecidual de p16 apresentou indício de alteração na análise do exon 2 (p16C). Dos 17 espécimes de melanoma cutâneo com expressão de p16 evidenciada pela técnica imuno-histoquímica, 11 apresentaram indício de alteração de p16 pela análise molecular realizada. Seis casos com expressão de p16 não apresentaram indício



**FIGURA 2:** Análise molecular do gene p16 pela técnica de PCR/SSCP com iniciadores do exon 2: 3) p16E – todos com padrão 9 (semelhante ao controle); 4) p16D – todos com padrão 8 (semelhante ao controle); 5) p16C – padrão 5 (semelhante ao controle): casos 2, 22, 23 e 24; padrão 6 (sugestivo de alteração): casos 1, 7, 9, 13, 14, 16 e 20; padrão 7 (sugestivo de alteração): casos 8 e 19. LM: Low Mass; Pb: Pares de bases; C: controle (hiperplasia fibrosa inflamatória); C-: controle negativo

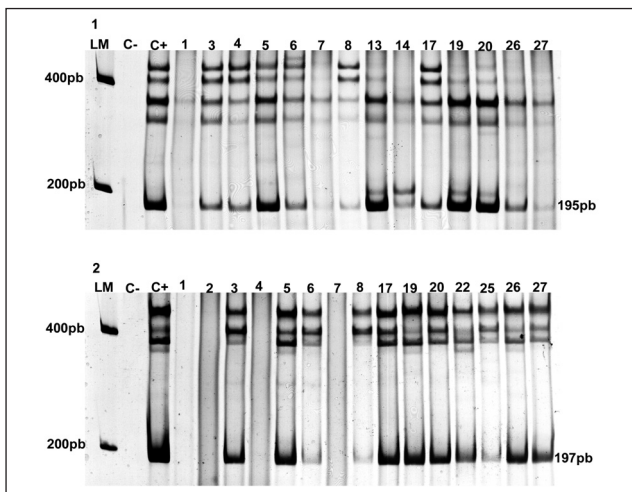
de alteração do gene p16 à análise molecular. Dos quatro casos de melanoma cutâneo com ausência de expressão de p16, dois apresentaram indício de alteração à análise molecular (casos 14 e 16).

**DISCUSSÃO**

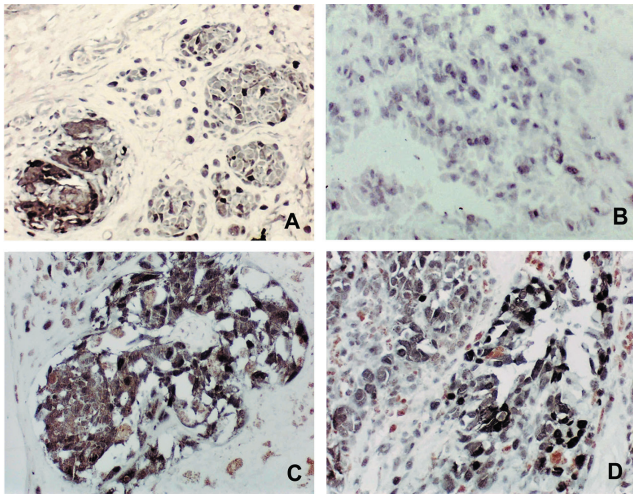
A análise molecular de p16 revelou que parte dos tumores analisados (71,42% dos melanomas mucosos e 58,6% dos cutâneos) apresentou indícios de alteração nos exons 1, 2 e 3 (ver Quadro 1). O exon 2 foi o que mais freqüentemente apresentou indício de alteração, tanto nos tumores cutâneos quanto nos tumores mucosos.

Cinco em sete (71,42%) melanomas mucosos estudados revelaram padrão sugestivo de alteração para o exon 2 (p16C), sendo quatro casos com padrão 6, e um com padrão 7. Um caso também apresentou indício de alteração para o exon 1 (p16G – padrão 13).

Os melanomas mucosos são muito raros e representam somente 0,5% das neoplasias da cavidade oral. As séries de melanomas orais, recentemente descritas, apresentam números pequenos de casos.<sup>5,6</sup> Quanto ao estudo genético de p16 nesse tipo de melanoma, há somente o trabalho de Chang et al.,<sup>20</sup> que realizaram o estudo genético de p16 numa linhagem de melanoma obtida de um único caso de melanoma primário de palato. Observaram ausência de transcrição de p16, pela análise mediante a técnica de RT-PCR, na linhagem celular obtida a partir do tumor primário. Os resultados obtidos da casuística aqui apresentada mostram que a freqüência de indícios de alteração na análise genética de p16, pela metodologia empregada, é alta (71,42%). Esse dado



**FIGURA 3:** Análise molecular do gene p16 pela técnica de PCR/SSCP com iniciadores do exon 3: 1) p16B – padrão 2 (semelhante ao controle): casos 3, 4, 5, 7, 8, 17, 26, 27; padrão 3 (sugestivo de alteração): caso 6; padrão 4 (sugestivo de alteração): casos 13, 14, 19, 20. 2) p16A – padrão 1 (semelhante ao controle): casos 3, 5, 6, 8, 17, 19, 20, 22, 25, 26, 27. LM: Low Mass; Pb: Pares de bases; C: controle (hiperplasia fibrosa inflamatória); C-: controle negativo



**FIGURA 4:** Demonstração de expressão da proteína p16 por técnica imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti p16. **A** – Nevo nevocelular (controle positivo). Núcleos imunomarcados em negro e leve marcação citoplasmática. **B** – Melanoma oral (caso 30). Imunomarcação nuclear de melanócitos neoplásicos. **C** – Melanoma cutâneo delgado (caso 32). Núcleos de melanócitos atípicos imunomarcados em negro. **D** – Melanoma cutâneo com espessura superior a 1mm (caso 12). Imunomarcação nuclear em negro e pigmento melânico citoplasmático castanho

sugere a participação de possíveis alterações do gene p16 na patogenia do melanoma esporádico de mucosa oral.

Um dos sete espécimes de melanoma oral (caso 36) não apresentou amplificação para as seqüências analisadas. Talvez isso se deva ao fato de que foi utilizado material recuperado de espécimes submetidos às técnicas histológicas de rotina (fixado em formol e embebido em parafina) com a possibilidade de alguma interferência durante o processamento.

Entre os 29 melanomas cutâneos foram observados 14 casos com indicio de alteração para o exon 2 (p16C), sendo 12 casos com padrão 6, e dois com padrão 7. Cinco em 29 casos de melanoma cutâneo exibiram indícios de alteração para o exon 3 (p16B), um com padrão 3 e quatro com padrão 4. Indícios de alteração para o exon 1 foram observados em 10/29 casos de melanomas cutâneos (cinco casos com padrão 12; três, com padrão 13; e dois, com padrão 14).

Quando se correlaciona o encontro de indicio de alteração com o tipo histológico e microestadiamento dos melanomas cutâneos, verifica-se que quatro casos de lentigo maligno melanoma de até 1mm de espessura apresentaram indicio de alteração (dois casos para o exon 2 e 1; um caso para o exon 3 e 1; e um caso para o exon 2). O único caso de lentigo maligno melanoma com mais de 1mm de espessura não apresentou indicio de alteração à análise genética de p16. Dois casos de melanoma maligno de tipo extensivo superficial de até 1mm de espessura apresentaram indicio de alteração com os exons 3, 2 e 1, assim como dois casos do mesmo

tipo histológico com mais de 1mm de espessura. Neste último grupo, um caso apresentou indicio de alteração de p16 com o exon 2. O grupo de melanoma de tipo acral lentiginoso apresentou indicio de alteração à análise com o exon 2 e 1; sendo que um caso de até 1mm de espessura apresentou indicio de alteração para o exon 2 e exon 1 e, um somente para o exon 1. Cinco casos acrais lentiginosos, com espessura superior a 1mm, apresentaram indicio de alteração: quatro para o exon 2, e um para o exon 1.

Em resumo, a análise genética de p16 nos melanomas cutâneos revelou indicio de alteração em quatro de seis (66%) casos de lentigo maligno melanoma de até 1mm de espessura; três de cinco (60%) casos de melanoma maligno de tipo extensivo superficial de até 1mm de espessura; três de seis (50%) casos de melanoma maligno de tipo extensivo superficial superior a 1mm de espessura; dois de quatro (50%) melanomas acrais lentiginosos de até 1mm de espessura e cinco de sete (71,4%) melanomas acrais lentiginosos de espessura superior a 1mm. A freqüência de encontro de indícios de alteração de p16 na totalidade dos casos de melanoma cutâneo estudados foi de 58,6% (17 de 29 casos).

Considerando-se a totalidade dos casos de melanoma estudados (n=36) verifica-se também a maior freqüência de indicio de alteração do exon 2 de p16 (19 de 36 casos, freqüência de 52,77%), seguida pelo exon 1 (11 de 36 casos, freqüência de 30,55%) e exon 3 (cinco de 36 casos, freqüência de 13,88%). Lamperska et al.<sup>21</sup> relatam que a maioria das mutações de p16 descritas no melanoma maligno é do exon 2.

A presente casuística é representada por melanomas malignos esporádicos, isto é, sem história de melanoma maligno familiar. O gene p16 é considerado o gene de susceptibilidade ao melanoma devido a sua freqüente inativação nos melanomas malignos familiares.<sup>7</sup> Entretanto, a perda parcial ou incompleta de expressão de p16 é também verificada nos melanomas esporádicos.<sup>9</sup> Outros autores, entretanto, referem que mutação do gene CDKN2A é pouco freqüente no melanoma maligno esporádico.<sup>22-24</sup>

Neste estudo não houve correlação entre as freqüências de indicio de alteração de p16 com a espessura das lesões cutâneas. Os melanomas de até 1mm de espessura dos diferentes tipos histológicos apresentaram freqüência de indícios de alteração de 60% (nove de 15 casos), e nos de espessura superior a 1mm esta foi de 50% (sete de 14 casos). Cachia et al.<sup>11</sup> não observaram anomalias à análise de p16 pela técnica de PCR-SSCP ao comparar dois grupos de melanoma maligno primário (19 casos com espessura de até 0,75mm a 20 casos com espessura superior a 3mm). Concluíram que a mutação de p16 é rara tanto nos melanomas delgados como nos espessos. Esses autores realizaram microdissecção do tecido por téc-

nica semelhante à aqui empregada. Ressaltam que a possibilidade de contaminação do material assim obtido, por tecido normal adjacente ao tumor, é inferior a 25% para os tumores delgados e inferior a 10% para os tumores mais espessos.

Optou-se por comparar melanomas de até 1mm e de espessura superior a 1mm, uma vez que essa medida do microestadiamento é considerada linha de corte para a conduta terapêutica, no que diz respeito às margens de segurança e pesquisa de linfonodo sentinela.<sup>25</sup>

A expressão de p16 observada com a técnica imuno-histoquímica demonstrou padrão de marcação nuclear e citoplasmática no controle positivo (nevo nevocelular). Esse padrão de expressão é relacionado com a proteína p16 selvagem.<sup>18</sup> Entretanto, não se considerou a positividade citoplasmática para a análise semiquantitativa dos casos estudados. A expressão de p16 foi observada somente em um caso de melanoma oral (caso 30). Ao contrário, Tanaka et al.<sup>19</sup> verificaram expressão tecidual de p16 em sete de 13 casos de melanoma oral.

Nos melanomas cutâneos não foram encontradas diferenças na expressão de proteína p16 entre os casos delgados (10 de 13 ou 76,9%) e os melanomas espessos (sete de oito ou 87,5%). Esses resultados estão de acordo com os de Ghiorzo et al.,<sup>18</sup> que também não encontraram diferença de expressão de p16 ao comparar melanomas *in situ*, melanomas primários invasivos e metastáticos.

Observou-se em alguns casos de melanoma cutâneo imunomarcagem citoplasmática, além da nuclear, pelo p16, semelhante aos achados de Radhi<sup>26</sup> e Mihic-Probst et al.<sup>17</sup> Em células normais ocorre expressão de p16 tanto nuclear como citoplasmática. A expressão somente nuclear estaria relacionada com provável mutação alélica do gene p16.<sup>18</sup>

Ao se compararem os resultados da expressão, ou ausência de expressão, de p16 com os indícios de alteração observados pela análise molecular, nos mesmos tumores, observa-se expressão de proteína p16

concomitante com evidências de alteração na análise molecular do gene p16 em 12 casos (um mucoso e 11 cutâneos). Por outro lado, verifica-se a ausência de expressão de proteína p16 em seis casos que apresentaram indício de alteração do gene p16 pela análise molecular (quatro mucosos e dois cutâneos). Seis casos com expressão de proteína p16 não apresentaram indícios de alteração do gene p16 à análise molecular.

A literatura refere que a perda de expressão do gene p16 é freqüente em neoplasias cutâneas malignas.<sup>27</sup> A falta de expressão de p16 seria evidência de mutação ou deleção do gene p16.<sup>28</sup> A perda da expressão de p16 é mais freqüentemente observada em melanomas mais espessos e nas metástases.<sup>29,30</sup> Nesta casuística verificou-se que, nos tumores mais espessos, a expressão de p16 foi observada em sete de oito casos, sendo que em quatro deles concomitante com indícios de alteração do gene p16 à análise molecular.

## CONCLUSÃO

A freqüência de indícios de alteração na análise genética de p16 nos melanomas de mucosa oral foi de 71,4%. Nos melanomas cutâneos estudados foi de 58,6%. Pode-se sugerir a participação de alterações do gene p16 na patogenia do melanoma esporádico de mucosa oral. Não houve relação de sugestão de alteração de p16 com o nível de invasão dos melanomas cutâneos de diferentes subtipos histológicos. A expressão tecidual de p16 também não se correlacionou com a espessura das lesões. Foi observada em 10 de 13 (76,9%) casos de melanoma cutâneo de espessura até 1mm e em sete de oito (87,5%) casos de espessura superior a 1mm. □

## AGRADECIMENTO

Apoios: FAPESP - Processos 02/08881-1 e 03/09703-2; CNPq - Processo 504726/2003-0 e CAPES. Projeto de Pós-Doutorado, processo USP 3174104 (Sousa FB).

## REFERÊNCIAS

1. Sampaio SAP, Rivitti EA. Melanoma maligno. In: Sampaio SAP, Rivitti EA, editors. Dermatologia. São Paulo: Artes Médicas; 2000. p.878-86.
2. Riegel DS, Friedman RJ, Kopf AW. The incidence of malignant melanoma in the United States: issues as we approach the 21st century. *J Am Acad Dermatol.* 1996; 34:839-47.
3. Hicks MJ, Flaitz CM. Oral mucosal melanoma: epidemiology and pathobiology. *Oral Oncol.* 2000;36: 152-69.
4. Carpenter WM, Rudd M. Focal, flat pigmentations of

- the oral mucosa: a clinical approach to the differential diagnosis. *J Calif Dent Assoc.* 2000;12:949-54.
5. Garzino-Demo P, Fasolis M, Maggiore GMLT, Pagano M, Berrone S. Oral mucosal melanoma: a series of case reports. *J Craniomaxillofac Surg.* 2004;32:251-7.
6. Buchner A, Merrell PW, Carpenter WM. Relative frequency of solitary melanocytic lesions of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2004;33:550-7.
7. Kamb A, Gruis NA, Weacer-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, et al. A cell regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science.* 1994;



- 264:436-40.
8. Pollock OM, Trent JM. The genetics of cutaneous melanoma. *Clin Lab Med.* 2000;20:667-90.
  9. Funk JO, Schiller PI, Barrett MT, Wong DJ, Kind P, Sander CA. p16INK4a expression is frequently decreased and associated with 9p21 loss of heterozygosity in sporadic melanoma. *J Cutan Pathol.* 1998;25:291-6.
  10. Soong R, Jacopetta BJ. A rapid and nonisotopic method for the screening and sequencing of p53 gene mutations in formalin- fixed, paraffin- embedded tumors. *Mod Pathol.* 1997;10:252-8.
  11. Cachia AR, Indsto JO, Mc Laren KM, Mann GJ, Arends MJ. CDKN2A mutation and delation status in thin and thick primary melanoma. *Clin Cancer Res.* 2000; 6:3511-5.
  12. Isola J, De Vries S, Chu L, Ghasvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequence copy number comparative genomic hybridization in archival paraffin embedded tumor samples. *Am J Pathol.* 1994;145:1301-8.
  13. Rivero ER, Neves AC, Silva-Valenzuela MG, Sousa SO, Nunes FD. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract.* 2006;202:523-9.
  14. Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, Moir DT, Morton CC, Seidman CE, editors. *Current protocols in human genetics.* New York: John Wiley & Sons; 1994. p.898.
  15. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J, editors. *Molecular cloning, a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1982. p. 545.
  16. Bassan BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Methods Enzymol.* 1991;1558:501-27.
  17. Mihic-Probst D, Saremaslani P, Komminoth P, Heitz PU. Immunostaining for the tumour suppressor gene p16 product is a useful marker to differentiate melanoma metastasis from lymph-node nevus. *Virchows Arch.* 2003;443:745-51.
  18. Ghiorzo P, Villaggio B, Sementa AR, Hansson J, Platz A, Nicolás G, et al. Expression and localization of mutant p16 proteins in melanocytic lesions from familial melanoma patients. *Hum Pathol.* 2004;35:25-33.
  19. Tanaka N, Odajima T, Mimura M, Ogi K, Dehari H, Kimijima Y, et al. Expression of Rb, pRb2/p130, p53 and p16 proteins in malignant melanoma of oral mucosa. *Oral Oncol.* 2001;37:308-14.
  20. Chang KW, Lin SC, Chao SY, Kwan PC, Chin CP, Wang YK. Establishment and characterization of an oral melanoma cell line. *Oral Oncol.* 2001;37:301-7.
  21. Lamperska K, Karezewska A, Kwiatkowska E, Mackiewicz A. Analysis of mutations in the p16/CDKN2A gene in sporadic and familial melanoma in the Polish population. *Acta Biochim Pol.* 2002;49:369-76.
  22. Wagner SN, Wagner C, Briedigkeit L, Goos M. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res.* 1995;55:2713-8.
  23. Healy E, Sikkink S, Rees JL. Infrequent mutation of p16INK4 in sporadic melanoma. *J Invest Dermatol.* 1996;107:318-21.
  24. Ruiz A, Puig S, Lynch M, Castel T, Estivill X. Retention of the CDKN2A locus and low frequency of point mutations in primary and metastatic cutaneous malignant melanoma. *Int J Cancer.* 1998;76:312-6.
  25. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2001;19:3635-48.
  26. Radhi JM. Malignant melanoma arising from nevi, p53, p16 and Bcl-2: expression in benign versus malignant components. *J Cut Med Surg.* 1999;3:293-7.
  27. Chang TG, Wang J, Chen LW, Hsu CY, Chang HW, Chen JS, et al. Loss of expression of the p16 gene is frequent in malignant skin tumors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;230:85-8.
  28. Piccinin S, Doglioni C, Maestro R, Vukosavljevic T, Gasparotto D, D' Orazi C. p16/CDKN2 and CDK4 gene mutations in sporadic melanoma development and progression. *Int J Cancer.* 1997;74:26-30.
  29. Talve L, Sauroia I, Collan Y, Punnonen K, Ekfors T. Loss of expression of the p16INK4/CDKN2 gene in cutaneous malignant melanoma correlates with tumor cell proliferation and invasive stage. *Int J Cancer.* 1997;74:255-9.
  30. Morita R, Fujimoto A, Hatta N, Takehara K, Takata M. Comparison of genetic profiles between primary melanomas and their metastases reveals genetic alterations and clonal evolution during progression. *J Invest Dermatol.* 1998;111:919-24.

---

**ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:**

*Mírian N. Sotto*

*Alameda Itu, 1299 - apto. 61*

*01421-001 - São Paulo – SP*

*Tel: (11) 3088-4894 / Fax: (11) 3088-5604*

*E-mail: mnsotto@usp.br*

*Como citar este artigo:* Hsieh R, Sousa FB, Firmiano A, Nunes FD, Magalhães MHCG, Sotto MN. Estudo genético do gene p16 pela técnica de PCR-SSCP e expressão de proteína p16 em melanomas de mucosa oral e melanomas cutâneos. *An Bras Dermatol.* 2006;81(5):433-41.