

Melanoma

BOLETIM INFORMATIVO DO GBM - ANO VII - No. 27 OUTUBRO NOVEMBRO E DEZEMBRO 2004

Editorial

É gratificante acompanhar os avanços do conhecimento na área médica, em especial em relação ao melanoma. Antes uma condição que acometia vários indivíduos, não oferecendo muitos recursos terapêuticos, e, hoje, abrindo a possibilidade de tratamento e, mais além, de prevenção. Nesta edição contamos com informações de ponta na seção de atualização e com dois artigos muito interessantes: um mostrando que a identificação de marcadores é importante para o desenvolvimento de novas terapias direcionadas a genes e proteínas com finalidade de bloquear a progressão do melanoma, e outro abordando uma linha de pesquisa da UNONEX sobre a resposta imune do hospedeiro contra o melanoma murino B16F10Nex2, tentando melhor compreendê-la para sua completa utilização em uma bioquimioterapia contra o melanoma.

Como estamos no fim do ano, aproveitamos para desejar que 2005 seja repleto de grandes conquistas em todas as áreas, da pessoal à medicina. Boas festas a todos!

Fernando A. Almeida

PESQUISA

Marcadores moleculares diagnósticos e prognósticos

Itamar Romano Garcia Ruiz

Detecção de células tumorais – análise do mRNA

A detecção de células tumorais em amostras de sangue, linfonodo sentinela (SLN) ou outros órgãos tem fundamental importância para o prognóstico e conduta de tratamento dos pacientes. Do ponto de vista da genética molecular, esta detecção pode ser feita a partir da análise do mRNA ou do DNA obtido da amostra tumoral. Os mRNA são convertidos em cDNA que é então usado para amplificação de seqüências marcadoras específicas. A expressão de quatro marcadores: tirosinase (TYR), antígeno de melanoma reconhecido por células T (MART1), proteína relacionada à tirosinase (TRP1, TRP2), a partir de RNA extraído de amostras de SLN parafinadas, está sumarizada na tabela abaixo (Kuo *et al.*, 2003).

Histologia/parafina	Expressão (mRNA) de marcadores por RT-PCR			
	TYR	MART1	TRP1	TRP2
SLN (+)	89%	92%	35%	43%
SLN (-)	40%	33%	5%	13%

Considerando no mínimo dois marcadores, foram reavaliados 25% SLN (-) como sendo positivos, sendo que 80% dos respectivos pacientes recidivaram. Os que expressaram nenhum, ou apenas um, marcador tiveram aumento significativo do *disease-free survival* e *overall survival* em relação aos que expressaram dois ou três marcadores. Pelo menos um marcador foi identificado em 95% dos SLN (+). A expressão dos genes SURVIVIN, BCL-2, BCL-X, BAX, ligados a apoptose, também foi analisada em SLN de pacientes portadores de MM. Foi observada correlação significativa entre a expressão de SURVIVIN e *outcome* dos pacientes em 52,9 meses (Gradilone *et al.*, 2003). Técnicas atuais como DNA *microarray* têm sido importantes no estudo de interações entre os genes e vias de sinalização, revelando que a maioria das alterações em MM inclui genes que codificam proteínas ligadas ao ciclo celular (Kim *et al.*, 2002). A identificação de marcadores é importante para o desenvolvimento de novas terapias direcionadas a genes e proteínas com finalidade de bloquear a progressão. Entretanto, a técnica de cDNA *microarray* é limitada, pois nem todos os genes expressos podem ser acessados. Por imuno-histoquímica também se tem demonstrado alterações de expressão em genes de controle do ciclo celular, tais como ciclina D1 (Alonso *et al.*,

2004). Achados de RNA de origem tumoral a partir de amostras de plasma ou soro sanguíneo têm suscitado muito interesse pela facilidade de sua obtenção. Através da expressão dos marcadores TYR, p97, e MelanA/MART1 a partir de leucócitos sanguíneos de 200 pacientes, foi demonstrada significativa associação entre as células de melanoma circulantes (CMC) e o estágio do MM (Palmieri et al., 2003). Entretanto, outras análises estatísticas indicam que a presença de CMC não seria fator prognóstico independentemente com respeito à sobrevida. Os autores discutem os problemas de sensibilidade e especificidade dos marcadores, concluindo que os marcadores estudados não são específicos para fenótipos mais agressivos. O estágio do MM está correlacionado significativamente com a expressão de TYR (+), mas não há correlação com outros marcadores prognósticos, nem com a sobrevida dos pacientes. Além disso, o número de SNL histologicamente positivos não está correlacionado com o resultado do PCR (Warr et al., 2003). A técnica RT-PCR pode dar falso-negativo se as CMC não estiverem expressando o marcador selecionado. Garbe et al. (2003) sugerem que a análise imuno-histoquímica de S-100B e MIA (*melanoma-inhibitory activity*) é superior ao RT-PCR de TYR/MART1 quanto à acurácia e sensibilidade, apesar daqueles marcadores não serem específicos. A expressão de melastatina (MLSN-1), proteína específica de melanócito, está inversamente correlacionada com as taxas de metástases. Em tumor primário, está correlacionada com aumento de *disease-free survival*. A expressão de MLSN-1, taxa de mitoses e espessura tumoral influenciam a *disease-free survival* independentemente. A diminuição da expressão de MLSN-1 em MM primário é fator prognóstico para metástases e é independente da espessura e outras variáveis. MLSN e espessura combinados podem permitir identificação de subgrupos de pacientes com alto ou baixo risco de desenvolver metástases (Duncan et al., 2001).

Análise estrutural do DNA

A detecção de células tumorais também pode ser feita pela análise estrutural do DNA da amostra, particularmente do DNA repetitivo. Seqüências repetitivas são marcos da organização da cromatina, regulação gênica e evolução do genoma. Padrões de seqüências repetitivas obtidas por PCR usando *primers* específicos e inespecíficos mostram alterações em muitos tipos e estágios tumorais, caracterizados por perda, ganho e aumento ou diminuição na intensidade de coloração de bandas pré-existentes. O mesmo padrão de LOH (perda de heterozigossidade) foi observado no DNA do plasma e tumor em 70% dos pacientes MM. A freqüência de LOH nos MM avançados foi maior que nos MM iniciais (Fujiwara et al., 1999). Foi feita análise de LOH em microssatélites no DNA de plasma ou soro durante resposta à bioquimioterapia, por período de 13 meses. Foi encontrado LOH (+) no soro de 29% pacientes, dos quais apenas 17% responderam à bioquimioterapia. Dentre os pacientes LOH (-) no soro, 72% responderam à bioquimioterapia. A presença de LOH (+) foi estatisticamente significativa e independentemente associada à progressão da doença (Taback et al., 2004). Rearranjos genômicos foram detectados por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) em 100 % de tumores sólidos de pele. CBC mostrou predominância de ganho de bandas, enquanto MM apresentou tendência a perda ou diminuição de sinal das bandas. Foram detectadas alterações no DNA repetitivo de todas as amostras de tumor examinadas. Estas mudanças podem resultar de rearranjos, aneuploidias e/ou polissomias cromossômicas. A técnica RAPD pode revelar seqüências desconhecidas associadas ao desenvolvimento e progressão tumoral (Ribeiro et al., 2004).



Resposta Imune no modelo murino

**Elaine Guadalupe Rodrigues, Ph.D. Unidade de Oncologia Experimental (UNONEX)
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)**

Histórico

A primeira evidência da existência de uma resposta imune protetora anti-tumoral foi a observação feita por William Coley, ainda no século XIX, da regressão espontânea de um tumor após infecção bacteriana. Já no século XX, estudos realizados com animais isogênicos sugeriram a existência de antígenos tumor-específicos. Porém, a ação protetora de uma resposta imune anti-tumoral foi desacreditada durante algum tempo, pois ensaios clínicos utilizando diferentes vacinas tumorais mostraram respostas muito aquém do esperado, e, além disso, tumores naturalmente induzidos em camundongos não induziam uma resposta protetora. Essas observações contribuíram com a noção de que tumores não são suficientemente diferentes de tecidos normais para ativar o sistema imune. Essa hipótese foi alterada em trabalho publicado em 1982, onde van Peel and Boon demonstraram que a ausência de imunogenicidade tumoral é proveniente da inabilidade do tumor em crescimento ativar o sistema imune, e não da ausência de antígenos tumor-específicos.

Visão atual

A visão atual sobre a resposta imune anti-tumoral engloba as seguintes hipóteses: (1) todas as formas de câncer devem ser susceptíveis à intervenção imunológica; (2) a teoria da imunovigilância foi ressuscitada, pois camundongos deficientes em um ou mais componentes do sistema imune inato ou adaptativo apresentam um ligeiro, mas estatisticamente significativo aumento na incidência de câncer; (3) tumores desenvolvendo-se em animais imunodeficientes são mais imunogênicos; (4) tumores que crescem em hospedeiros imunocompetentes são

selecionados a apresentarem imunogenicidade reduzida, gerando as variantes resistentes; e (5) o sistema imune pode reduzir, mas não eliminar o crescimento tumoral, explicando o paradoxo de crescimento de tumores em hospedeiros imunocompetentes.

Resposta imune do hospedeiro

Na UNONEX, uma de nossas linhas de pesquisa estuda a resposta imune do hospedeiro contra o melanoma murino B16F10Nex2, tentando melhor compreendê-la para sua completa utilização em uma bioquimioterapia contra o melanoma. O crescimento tumoral pode induzir o aparecimento de resposta imune constituída tanto por elementos da resposta imune inata, como por elementos da resposta imune específica, humoral e celular. Macrófagos, células natural killer (NK) e células NKT podem ser ativadas, e nessas condições apresentam atividade anti-tumoral. Em pacientes com tumores em desenvolvimento encontram-se linfócitos T CD4+, CD8+ e linfócitos B secretores de anticorpos, todos com especificidade anti-tumoral. Além disso, já foi demonstrada a importância das células dendríticas no desenvolvimento de uma resposta imune protetora anti-tumoral. Tanto o desenvolvimento como a ativação dessas células depende fundamentalmente da presença de interleucinas, sugerindo que a sua utilização na indução/estimulação de uma resposta imune anti-tumoral seja eficaz no combate ao crescimento do tumor. Várias interleucinas pró-inflamatórias já foram implicadas na indução de resposta protetora, sendo o interferon-gama (IFN- γ) um dos fatores mais estudados. Sua atividade sobre células do sistema imune responsáveis pela resposta anti-tumoral é inquestionável, todavia, a existência de uma citotoxicidade direta dessa interleucina sobre a célula tumoral, efeito observado em ensaios in vitro, ainda não havia sido comprovada in vivo. Em modelo desenvolvido na UNONEX, observou-se que o IFN- γ pode apresentar um efeito citotóxico direto sobre a célula de melanoma murino desenvolvendo-se in vivo. O modelo baseia-se na utilização de animais geneticamente modificados (knock-outs) nos quais não há a expressão do receptor de IFN- γ (GRKO); logo, as células do sistema imune desses animais não respondem à essa interleucina. Curiosamente, observou-se que estes animais eram capazes de evitar o crescimento do melanoma (figura 1), e esse efeito era devido a um aumento na produção de IFN- γ pelas células do sistema imune (macrófagos e esplenócitos) estimuladas muito provavelmente por produtos tumorais (figura 2). Esse aumento na produção da interleucina não pode ser regulado negativamente, uma vez que as células do animal não respondem à sua presença, assim como o aumento na sua concentração não apresenta efeitos tóxicos ao animal. O efeito citotóxico sobre a célula tumoral observado não foi devido ao aumento da expressão de moléculas de MHC classe I, uma vez que as células B16F10Nex2, crescendo in vivo, não expressam essa molécula na sua superfície, embora expresse-a quando estimulada in vitro com o IFN- γ (figura 3). Essa atividade citotóxica direta observada pelo aumento do IFN- γ nos animais GRKO foi abolida quando estes foram tratados com anticorpos neutralizantes dessa interleucina (figura 4). Em uma resposta imune, a produção de interleucinas pró-inflamatórias é regulada pela produção de interleucinas supressoras ou antiinflamatórias, produzidas por células regulatórias, principalmente linfócitos T regulatórios 1, que secretam IL-10 ou TGF- α e os recentemente identificados linfócitos T CD4+CD25+. Em nosso laboratório observamos que esplenócitos de camundongos C57Bl/6 resistentes ao desenvolvimento do melanoma murino B16F10Nex2, quando estimulados in vitro por produtos tumorais, secretam principalmente IFN- γ e IL-10, observando-se uma relação IFN- γ /IL-10 maior que 1. Ao contrário, animais onde o melanoma está se desenvolvendo, apresentam, nessas mesmas condições, uma relação entre as interleucinas menor que 1, sugerindo que a produção aumentada da interleucina anti-inflamatória IL-10 seja um dos fatores responsáveis pelo crescimento tumoral (figura 5). Confirmando esse resultado, animais geneticamente deficientes em IL-10 (IL-10KO) apresentaram uma sobrevida aumentada comparativamente aos controles selvagens, devido provavelmente a um aumento na produção da interleucina protetora (figura 6). Tendo em vista estes resultados, uma alternativa para otimização da resposta imune anti-melanoma seria a neutralização da IL-10 produzida em maior quantidade nos animais sensíveis à implantação tumoral. Para obter esse efeito, peptídeos referentes à porção extracelular do receptor de IL-10 foram sintetizados, e testados quanto à sua capacidade de neutralização da atividade da IL-10 em ensaios in vitro. Nossos resultados demonstraram que alguns desses peptídeos apresentam uma elevada capacidade de neutralização da IL-10 in vitro, e ensaios estão sendo realizados no sentido de determinarmos se esses peptídeos poderiam ser utilizados in vivo para a inibição do crescimento tumoral.

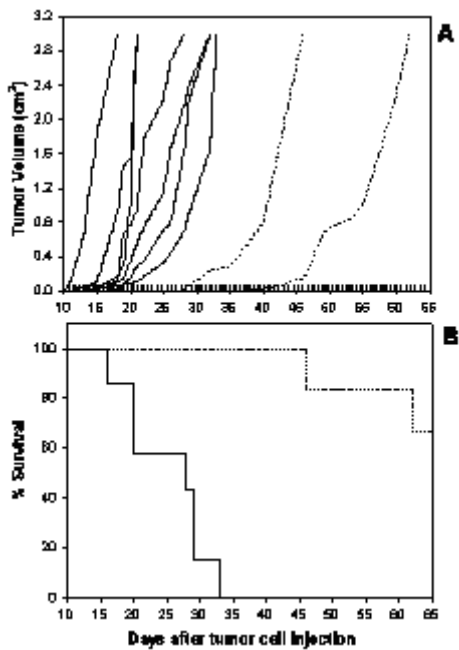


Figura 1: Animais geneticamente deficientes em receptor para IFN- γ (GRKO) apresentam resistênça frente ao melanoma murino B16F10-Nex2. (A) Desenvolvimento tumoral individual e (B) sobrevida de animais selvagens (WT, linhas cheias) e animais GRKO (linhas pontilhadas), grupos de 7 e 6 animais, respectivamente. Células tumorais foram implantadas subcutaneamente e o volume tumoral e a sobrevida dos animais foram quantificados a cada 2-3 dias.

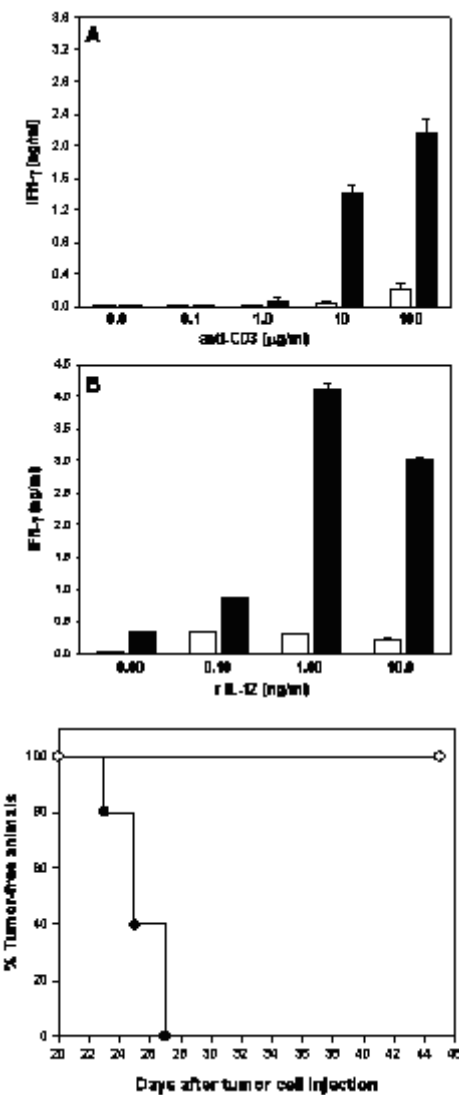


Figura 2: Produção de IFN- γ por (A) esplenócitos e (B) macrófagos peritoneais de animais WT (barras vazias) e GRKO (barras cheias), após estímulo ex-vivo com anti-CD3 e IL-12, respectivamente. Células de animais sem nenhum tratamento foram coletadas e estimuladas ex-vivo; IFN- γ foi quantificado no sobrenadante de cultura por ELISA.

Figura 3: Animais GRKO tratados com anticorpos anti-IFN- γ não são capazes de rejeitar células B16F10-Nex2. Animais GRKO tratados com anticorpos neutralizantes de IFN- γ intraperitonealmente (círculos cheios) não são mais capazes de inibir o desenvolvimento de células B16F10-Nex2 implantadas subcutaneamente. Círculos vazios, animais GRKO não tratados com os anticorpos e implantados com células tumorais, capazes de rejeitar o implante tumoral.

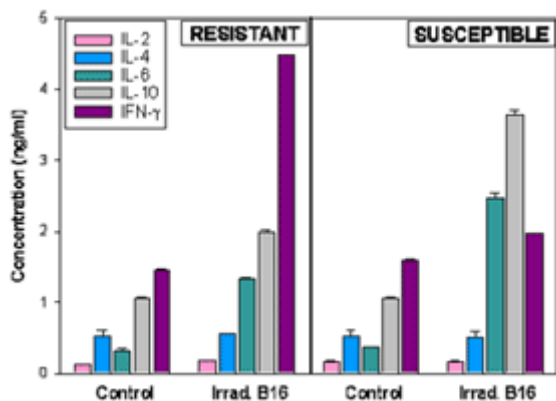


Figura 4: Esplenócitos de animais resistentes e sensíveis ao desenvolvimento tumoral de células B16F10-Nex2 implantadas subcutaneamente foram estimulados ex-vivo com produtos tumorais (Irrad B16) e as interleucinas produzidas foram quantificadas por ELISA no sobrenadante de cultura. Animais resistentes produzem uma quantidade maior de IFN- γ , enquanto animais sensíveis produzem uma quantidade maior de IL-10. Control, células não estimuladas.

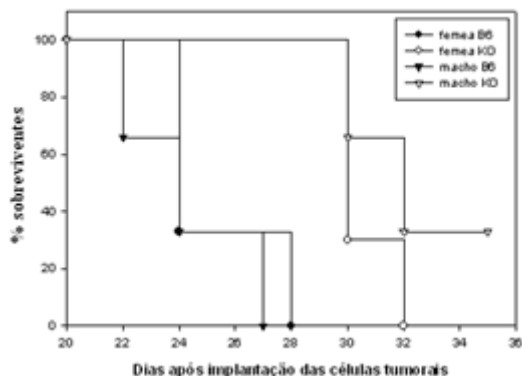


Figura 5: Animais deficientes em IL-10 são mais resistentes ao desenvolvimento de células B16F10-Nex2 implantadas subcutaneamente. Machos e fêmeas selvagens (B6, círculos e triângulos cheios) injetados com células tumorais apresentam uma sobrevivência menor quando comparados à animais machos e fêmeas geneticamente deficientes em IL-10 (KO, círculos e triângulos vazios)



Nevos melanocíticos congênitos e malignização

INTRODUÇÃO: Os nevos congênitos apresentam uma grande variação em tamanho, aparência macroscópica e histologia. Existe uma necessidade prática de subdividi-los por tamanho, em razão do efeito estético direto e problemas psicológicos resultantes, das opções de tratamento e, provavelmente, da chance de transformação maligna. Nesta revisão, os autores sintetizam a literatura existente sobre os subgrupos de nevos congênitos, com atenção especial ao nevo congênito gigante e seu risco de transformação maligna. **MATERIAL E MÉTODO:** Os autores conduziram a busca no banco de dados Medline entre 1966 e outubro de 2002. Foram incluídos somente os artigos em língua inglesa sobre nevos congênitos associados a melanoma. A pesquisa final incluiu os termos médicos (MeSH) relacionados a nevo congênito pequeno médio, grande ou gigante associados às palavras-chave classificação, histologia e melanoma. Realizou-se ainda uma referência-cruzada manual adicional. Foram excluídos os artigos que lidavam somente com abordagens de tratamento. **RESULTADOS:** Uma ampla variedade de critérios de subclassificação de nevos congênitos por tamanho foi proposta na literatura, o que dificulta uma comparação direta dos dados relatados. Foram identificados 35 artigos, nos quais não menos do que 7 definições diferentes foram empregadas para considerar o tamanho mínimo de nevos congênitos gigantes. Histologicamente, é difícil ou mesmo impossível saber se um nevo é congênito ou adquirido, principalmente quando a lesão é pequena, pois as diferenças não são absolutas. Os nevos congênitos gigantes apresentam um risco mais alto de malignização, mas a incidência relatada difere muito, estando entre 1% e 31%. Os índices de incidência para o melanoma advém de estudos retrospectivos e prospectivos, revisões e relatos de casos, comparados entre si utilizando-se diferentes definições. Ainda, os relatos referem-se a pacientes de diversas faixas etárias, protocolados em diversos centros de referência. **CONCLUSÃO:** Para a comparação de estudos realizados em diferentes centros de referência, é essencial que a subclassificação de tamanho do nevo congênito seja baseada em critérios padronizados e na aceitação geral. Os autores recomendam a definição do nevo congênito gigante como uma lesão com acometimento de 1% da superfície corporal na região da face e pescoço e 2% no restante do corpo. Com base em uma revisão da literatura mundial, os autores recomendam a excisão profilática de todo nevo congênito, com uma comunicação precisa com o paciente e familiares e tratamento oportunamente individualizado.

ZAAL, L.H.; MOOI, W.J.; SILLEVIS SMITT, J.H.; VAN DER HORST, C.M. Classification of congenital melanocytic naevi and malignant transformation: a review of the literature - **Br J Plast Surg**; 57(8): 707-19, 2004 (Dec).

Linfadenectomia completa no melanoma

Os argumentos apresentados por Thomas e Clark contra o uso da biópsia de linfonodo sentinela (LS) no melanoma maligno são os mesmos nos últimos 4 anos. Entretanto, existem hoje dados para testar a hipótese de que a linfadenectomia completa pode elevar o índice de metástases em trânsito. Foram identificados 10 estudos, incluindo o realizado pelos autores, que relatam padrões de recidiva separadamente, de acordo com o status de LS. Ao todo, foram observadas 701 recidivas em 4713 pacientes, das quais 94 constituíram metástases nodais, 201 metástases em trânsito ou recorrência local, e 406 metástases à distância, levando a índices absolutos de 2%, 4,3% e 8,8%, respectivamente. Em estudos de coortes não sujeitos à linfadenectomia seletiva os índices são de 7,8% para metástases nodais, 3,4% em trânsito e 4,4% distantes. Em outras palavras, a linfadenectomia seletiva reduz o índice absoluto de recidiva nodal principalmente às custas do aumento do índice de metástases à distância. É difícil atribuir a devida importância ao pequeno aumento do índice de doença em trânsito, considerando-se que os estudos de coortes submetidos à linfadenectomia seletiva normalmente excluem os pacientes no estágio 1A, enquanto o estudo de coorte histórico não foi seletivo. Como esperado, o índice total de recidiva entre os pacientes com LS positivo foi quase 3 vezes mais alta em comparação aos estudos de coortes com LS negativo (11,6% versus 31%), mas é interessante também comparar os padrões de recidiva de acordo com o status de LS. Entre os pacientes com LS negativo, 16% de todas as recidivas foram nodais, 53% à distância e 31% em trânsito. Entre os estudos de coortes com LS positivo, 8% foram nodais, 59% à distância e 33% em trânsito. Esta pequena diferença para a doença em trânsito não é significativa e não fortalece a hipótese de que a linfadenectomia completa eleve a probabilidade de doença em trânsito. Os autores também discordam da afirmação de que o tratamento adjunto com interferon não traz qualquer benefício de sobrevida. A meta-análise mencionada por Thomas e Clark revela uma melhora inequívoca e relacionada à dose da sobrevida livre de doença ($p < 0,0001$) e, limitando-se a análise aos estudos de alta dosagem, um benefício menos importante em sobrevida total ($p = 0,05$). O despreparo do NHS para financiar este tratamento deve-se muito mais à questão do custo do que à toxicidade.

RUSSELL-JONES, R.; HEALY, C.; POWELL, A.M.; ACLAND, K.; O'DOHERTY, M.; CALONJE, E. Completion lymphadenectomy may not increase in-transit disease in malignant melanoma - **BMJ**; 329:1288-c-1289-c, 2004.

EXPEDIENTE	Diretoria GBM	Comissão editorial
<p>Publicação trimestral do Grupo Brasileiro Multidisciplinar e Multicêntrico para Estudo de Melanoma – GBM e-mail: gbm@gbm.org.br www.gbm.org.br Jornalista Responsável: Maria Lúcia Mota. Mtb: 15.992 Editor chefe: Dr. Fernando A. Almeida Colaboradores desta edição: Itamar Romano Garcia Ruiz, Elaine Guadalupe Rodrigues</p>	<p>Presidente: Gilles Landman 1° Vice-Presidente: Marcus Maia 2° Vice-Presidente: Miguel Angelo R. Brandão Secretário: Mauro Yoshiaki Enokihara 1° Secretário: Gerson Junqueira Junior Tesoureiro: Rogério Izar Neves 1° Tesoureiro: Lucia M. Yojo de Carvalho Diretor Científico: Francisco A. Belfort Diretor de Informática: Eduard Rene Brechtbuhl</p>	<p>Ana Cristina A. Fasanella, Auro Del Giglio, Fernando A. de Almeida, Guilherme O. Almeida, Marcus Maia, Miriam N. Sotto, Renato S. de Oliveira Filho Coordenação editorial: Informedical Editora e Publicações Secretaria Executiva e Cartas: R. Joaquim Nabuco, 47 - sl 103 - cep 04621-000 São Paulo - SP - Tel (11) 5542.8216 Fax (11) 5543.1141 Tiragem: 10.500 exemplares</p>