
Melanoma

BOLETIM INFORMATIVO DO GBM - ANO III- No. 12
JANEIRO, FEVEREIRO E MARÇO 2001

Editorial

Dois grandes eventos ocorreram quase que simultaneamente no início de março, e nestes o melanoma cutâneo foi alvo de atenção, discussão e estudo por parte dos cientistas e profissionais de várias partes do mundo. O primeiro foi a Conferência Mundial de Melanoma, realizada em Veneza e contando com mais de 1.000 participantes, na qual vários sócios do GBM estiveram presentes e onde foram destacados dois trabalhos brasileiros: a apresentação do Protocolo Completo (GBM), o qual está sendo implantado via Web, e o pôster apresentado pelos colegas do Hospital do Câncer de SP sobre o projeto Genoma. O segundo evento foi o 59o Meeting da Academia Americana de Dermatologia, com mais de 12.000 participantes, realizado em Washington D.C., onde ocorreram vários Simpósios sobre nevos melanocíticos, fotoproteção, diagnóstico precoce, prevenção, pesquisa do linfonodo sentinela e vacinas.

Infelizmente, com exceção da Austrália, Canadá e Escócia, a incidência do melanoma cutâneo continua aumentando, sendo projetado para o ano de 2001, nos USA, 51.400 novos casos, com mais de 8.000 mortes e com custos diretos da ordem de 563 milhões de dólares. A projeção entre os americanos do risco de vir a ter melanoma cutâneo será de 1/50 em 2.010 (Rigel S.D. New York University). Quanto às vacinas, não existe nenhuma em escala comercial, somente em protocolos, alguns na fase três (Brystryn JC).

Com relação à IV Conferência Nacional de Melanoma, a ser realizada nos dias 24 e 25 de agosto em São Paulo, os convidados estrangeiros já confirmaram suas presenças e a mesma tem uma programação científica ampla e de alto nível.

Fernando Augusto de Almeida

Telomerase e Melanoma

Lucia Miiko Yojo de Carvalho

Setor de Tumores Cutâneos da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM.

Trabalho realizado em conjunto com a Disciplina de Genética

A telomerase é uma enzima ribonucleoprotéica complexa com atividade tipo transcriptase reversa e DNA polimerase, capaz de sintetizar a partir de uma matriz de RNA, o DNA telomérico na extremidade cromossômica. A atividade da telomerase não é uma constante na vida da célula. Na célula somática essa enzima torna-se inativa e os telômeros sofrem erosão a cada divisão celular, diminuindo o seu comprimento, podendo sofrer senescência ou apoptose. Nas células germinativas, essa enzima se mantém ativa devido à constante proliferação destas células. Acredita-se que a imortalização da célula seja uma etapa crucial no desenvolvimento de tumores malignos e que a atividade da telomerase possa estar relacionada a essa fase, pelo fato das células neoplásicas reativarem intensamente a atividade dessa enzima.

Taylor e colaboradores (1996) foram os primeiros a relatar a atividade da telomerase no melanoma; demonstraram a presença da atividade dessa enzima em 6 (86%) de sete melanomas cutâneos e referiram que lesões avançadas e metastáticas apresentavam valores da atividade 10 a 100 vezes maiores quando comparados às lesões iniciais, contrastando com os níveis extremamente baixos encontrados na pele protegida do sol. Outros autores demonstraram a presença da atividade da telomerase no melanoma, variando a porcentagem da mesma de 64% (Bosserhoff et al., 1997) a 90,3% (Glaessl et al., 1999). Alguns autores preocuparam-se com a relação entre essa ativação e o diagnóstico,

ou com o prognóstico, mas o seu uso como marcador tumoral ainda não está totalmente estabelecido. Já há autores testando agentes inibidores dessa enzima (Villa et al., 2000) como também para modelo de vacina, utilizando-a como alvo (Minev et al., 2000).

O trabalho desenvolvido na Disciplina de Cirurgia Plástica e na Disciplina de Genética da UNIFESP – EPM teve como objetivos determinar e avaliar a atividade da telomerase nos melanomas cutâneos primários, lesões melanocíticas benignas, pele adjacente ao tumor e pele normal; procurou também correlacionar a atividade dessa enzima com dados histopatológicos do melanoma cutâneo primário, tais como: tipo histopatológico, espessura de Breslow, nível de Clark, ulceração, satelitose, regressão, infiltrado linfocitário, índice mitótico, fase de crescimento, permeação vascular e neurotropismo. A atividade da telomerase foi estudada em quatro grupos diferentes: 30 amostras de melanoma cutâneo primário, 24 de pele adjacente ao tumor, 28 de lesão melanocítica benigna e 26 amostras de pele controle, utilizando o ensaio TRAP (Telomerase Repeat Amplification Protocol) com detecção por ELISA. A diferença, entre esses quatro grupos, foi estatisticamente significativa com $p < 0,001$ na análise com o teste de Kruskal-Wallis.

As comparações da atividade da telomerase entre os grupos de melanoma e pele adjacente ($p < 0,001$), melanoma e lesão melanocítica benigna ($p < 0,001$), melanoma e pele controle ($p < 0,001$), nevo e pele controle ($p = 0,001$), lesão melanocítica benigna e pele adjacente ($p = 0,003$) foram estatisticamente significante (teste de Mann-Whitney).

A atividade da telomerase apresentou valores crescentes a partir da pele controle para a pele adjacente, depois para a lesão melanocítica benigna e o melanoma primário. Esses dados, também observados por Bosserhoff et al. (1997); Glaessl et al. (1999); Ramirez et al. (1999); Rudolph et al. (2000), podem sugerir uma possível correlação com a progressão do tumor.

No subgrupo específico do melanoma, observamos correlação entre os valores da atividade da telomerase e ulceração ($p = 0,025$), permeação vascular ($p = 0,018$), e índice mitótico ($p = 0,029$), com significância estatística (teste de Mann-Whitney). Foi observada também uma maior expressão da atividade da enzima, de conformidade com o aumento da espessura de Breslow, do infiltrado linfocitário e presença de permeação vascular, sendo todos indicativos histopatológicos de pior prognóstico (teste de regressão linear múltipla). Estes dados sugerem uma tendência do aumento da atividade da telomerase associado a indicadores de pior prognóstico, porém, há necessidade de mais estudos, com maiores casuísticas e, principalmente, com maior tempo de seguimento dos pacientes, para que possamos obter dados consistentes a respeito do prognóstico.

Referências

BOSSERHOFF, A. K.; GLÄBL, A.; STOLZ, W.; BUETTNER, R. – Detection of telomerase activity in skin, melanocytic nevi, and melanoma by telomerase PCR ELISA. *Biochemica*, 3:16-8, 1997.

GLAESSL, A.; BOSSERHOFF, A. K.; BUETTNER, R.; HOHENLEUTNER, U.; LANDTHALER, M.; STOLZ, W. – Increase in telomerase activity during progression of melanocytic cells from melanocytic naevi to malignant melanomas. *Arch. Dermatol. Res.*, 291:81-7, 1999.

MINEV, B.; HIPPI, J.; FIRAT, H.; SCHMIDT, J. D.; LANGLADE-DEMOYEN, P.; ZANETTI, M. – Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(9): 4796-4801, 2000.

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

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

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

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

1996.

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

Ainda nesta edição:

Biologia Molecular e Celular dos Melanomas

Encarte da Conferência

Biologia Molecular e Celular dos Melanomas (parte I)

Auro del Giglio, Israel Bendit e Fernando A. Almeida

I – Introdução

Acredita-se que a evolução natural dos melanomas compreenda várias etapas. A partir de um melanócito normal, por ação da luz solar ou de outras alterações moleculares discutidas a seguir, produz-se um grau crescente de atipia celular que culmina com a formação de um melanoma in situ e que, por sua vez, poderá progredir para um melanoma invasivo. Este último poderá também ulteriormente se disseminar a outros órgãos (1). Esta evolução natural que se verifica na histologia, do ponto de vista molecular, se caracteriza por um grau crescente de instabilidade genética e de atividade proliferativa destes melanócitos, que compõem a lesão que progride pelas várias supracitadas etapas do processo carcinogênico. Além dessas alterações, são também fundamentais para que se processem integralmente as supramencionadas etapas da evolução natural desta neoplasia várias outras modificações. Estas novas alterações conferem às células malignas a capacidade de se desprenderem do seu sítio de origem para ingressar em camadas mais profundas da derme, tecidos subjacentes, vasos sanguíneos e linfáticos e, finalmente, outros órgãos. Esta disseminação dos melanócitos, que corresponde ao seu processo de metastatização, é também complexa do ponto de vista molecular e, assim como o processo de malignização (carcinogênese), pode se constituir, no futuro, em um alvo proficuo para abordagem do ponto de vista terapêutico.

Discutiremos a seguir as várias alterações moleculares que são conhecidas e que explicam, pelo menos em parte, o complexo processo de carcinogênese e metastatização dos melanomas. (fig.1)

II - Alterações moleculares importantes para o processo de carcinogênese dos melanomas

Um dos passos iniciais mais frutíferos no intuito de desvendar as alterações moleculares de um tumor é o seu estudo citogenético. Através do encontro de alterações citogenéticas não randômicas e suficientemente frequentes pode-se descobrir anormalidades em nível de genes específicos cujo resultado seja fundamental para alguma etapa envolvida no processo de carcinogênese ou da metastatização de uma dada neoplasia. Vários autores estudaram as alterações citogenéticas apresentadas pelos melanomas, e estas foram recentemente revisadas (1,2). (tabela 1)

A partir do estudo molecular aprofundado destas alterações citogenéticas, identificaram-se vários genes que se acredita serem importantes para o processo de carcinogênese e malignização dos melanomas (1,2).

Particularmente importante para o processo de carcinogênese dos melanomas é o gene localizado no braço curto do cromossoma 9 (9p21) presente em 46-73% dos casos de melanoma esporádico e 8 a 12% dos casos familiares desta neoplasia (1,2,3).

O gene CDKN2 ou p16, presente nesta região, contém mutações em muitas linhagens celulares oriundas de melanoma e em vários casos de melanoma metastático (1). O gene CDKN2 codifica uma proteína de peso molecular de 16 KDA (p16INK4) que tem localização nuclear e inibe as enzimas quinases dependentes de ciclinas CDK4 e CDK6. Estas proteínas normalmente fosforilam o gene do retinoblastoma desprendendo-se deste, em consequência de sua fosforilação, fatores de transcrição necessários para os

processos de síntese de DNA e divisão celular (1).

Quando p16INK4, ao invés de ciclinas, se liga às quinases CDK4 e CDK6, ocorre a inibição destas quinases. Em consequência da inibição da atividade destas enzimas, o gene de retinoblastoma não é fosforilado e o processo de divisão celular se paralisa entre as fases G1 e S do ciclo celular (4,5). (figura 2)

Alterações nas vias metabólicas da proteína p16INK4 podem ocorrer por mutação e metilação do gene CDKN2 ou, alternativamente, por alteração nos seus substratos CDK4 ou CDK6 e, finalmente, no gene de retinoblastoma (1).

Estas alterações aparentemente ocorrem em uma fase precoce do processo de carcinogênese e poderiam propiciar um aumento da taxa proliferativa dos melanócitos com um menor tempo para que os processos fisiológicos de reparo do DNA se efetuem. Desta maneira, estabelece-se um ambiente propício à progressiva instalação de instabilidade genética cada vez maior na neoplasia que, por sua vez, pode levar a alterações em outros genes críticos para a progressão tumoral. Outro gene, localizado em uma região próxima no cromossomo 9p - o p15INK4B - guarda homologia funcional e estrutural com o p16INK4. Mutações no p15INK4B já foram descritas em tumores de pacientes com melanoma (3).

Outros genes, localizados em regiões cromossômicas que são sede de alterações citogenéticas em pacientes com melanoma, foram também propostos como possíveis participantes no processo de carcinogênese dos melanomas, por exemplo: PITSLRE (1p36), Mn SOD (6q25), EGFR (7p12-13). Entretanto, não se sabe ao certo se tais genes participam realmente do processo de carcinogênese dos melanomas.

Em outras regiões cromossômicas envolvidas por perturbações citogenéticas (tabela 1) não se identificaram ainda genes candidatos a serem responsáveis por alguma etapa do processo de carcinogênese ou de metastatização. Prosseguem, portanto, várias linhas de investigações para responder estas dúvidas. Outros genes ainda como o p21, p53, p27, bc12, têm sido estudados nos melanomas. (Continua na próxima edição.)

Funções de proteínas que são importantes para a regulação do ciclo celular. Os genes p53 e retinoblastoma (Rb) codificam proteínas que interrompem a progressão do ciclo celular entre as fases G1 e S para permitir que o reparo do DNA possa ocorrer. Este ponto de parada de ciclo celular ("checkpoint") é controlado por enzimas quinases que se complexam a outras proteínas denominadas ciclinas. Em condições normais este complexo (CDK - ciclina) se complexa com o gene do retinoblastoma fosforilando-o e liberando dele (Rb) um fator transcricional (E2F) que, por sua vez, ativa genes importantes para a progressão do ciclo celular.

Calendário de Reuniões Científicas Mensais do GBM / 2001

SÃO PAULO - SP

Dia 03 de Abril Terça Feira

Novo Horário: das 12:00 às 13:00 h

Local: ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE MEDICINA

Av. Brig. Luis Antonio, 278 10º andar - Sala Bege

Coordenador: Dr. Francisco Macedo Paschoal

Dia 15 de maio

Casos da UNIFESP - EPM

Coordenador: Dr. Fernando Augusto de Almeida

Dia 05 de junho

Casos do Serviço de Dermatologia da UNISA - Sto. Amaro

Coordenador: Ana Cristina Fasanella e Reinaldo Tovo

Dia 07 de agosto

Casos do Hospital das Clínicas da Fac. de Medicina da USP

Coord.: José Antônio Sanches Jr. e Luiz Guilherme Castro

MACEIÓ - AL

12 de abril / 10 de maio / 07 de junho / 09 de agosto

Local: 20:00h (junto com as reuniões da SBD-Regional)

Coordenador: Alberto Eduardo Cox Cardoso (82) 223.4802

BELO HORIZONTE - MG

23 de abril / 28 de maio / 25 de junho / 30 de julho / 27 de agosto

Horário: 20:00h

Local: Auditório do Laboratório São Marcos

Coord.: José Carlos Ribeiro Resende Alves (31) 3335 1644

RIO DE JANEIRO - RJ

21 de junho (12º Encontro Estadual do GBM-RJ)

Horário: das 11:00 às 13:00 h

Local: Hosp. Universitário Gaffree-Guinle UniRio (Tijuca)

PORTO ALEGRE - RS

25 de abril

Horário: das 10:00h às 12:00h

Local: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Serviço de Dermatologia Auditório Prof. Mário Rigatto (FAMED-UFRGS)

Coordenador: Prof. Dr. Lúcio Bakos (51) 331 9322

31 de maio

Local: Ambulatório Dermatologia Sanitária

Rua João Pessoa, 1327

Coordenador: Dr. Renan Bonamigo (51) 226 5207

20 de junho

Local: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Serv. Dermatologia – Auditório Prof. Mário Rigatto (FAMED-UFRGS)

22 de agosto

Local: Hospital Santa Casa de Misericórdia

Serviço de Dermatologia – Posto G

Coordenador: Prof. Roberto Lopes Gervini

BLUMENAU - SC

18 de Abril / 09 de Maio / 06 de Junho / 04 de Julho / 08 de Agosto

Horário: 19:30 h

Local: Centro de Treinamento do Hosp. Santa Catarina

SANTOS e BAIXADA SANTISTA - SP

19 de abril / 24 de maio / 28 de junho / 26 de julho / 23 de agosto

Horário: 20:00h

Local: Associação dos Médicos de Santos

Coordenador: Jaques Alexandre de Mello (13) 232 6062