

Fabiana Buffé

**Expressão do Hormônio do Crescimento
em Melanomas Uveais**

Orientadora: Prof^a Ligia M Barbosa Coutinho

Co-orientadora: Dra Zélia Maria Corrêa

Co-orientador: Dr Carlos Oswaldo Degrazia

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Patologia Geral e Experimental da Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para
obtenção do grau de Mestre

Porto Alegre

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Agradecimentos

À amiga e co-orientadora Dra Zélia M Corrêa, pela dedicação incansável a este projeto, pelos exemplos profissionais, por todos os ensinamentos na minha formação e pela amizade ao longo de muitos anos;

À prof^a Ligia e ao Dr Degrazia, por terem acreditado e realizado comigo este projeto.

Dedicatórias

Ao Filipe e à Bárbara, meus queridos amores, que doaram generosamente seu tempo para que eu pudesse realizar este trabalho;

Aos meus pais, que sempre incentivaram minha busca por novos conhecimentos.

SUMÁRIO	
RESUMO	V
INTRODUÇÃO	
Melanomas Uveais	1
Hormônio do Crescimento e seu Receptor	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
OBJETIVOS	
Objetivo Geral	28
Objetivos específicos	28
ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	29
ARTIGO CIENTÍFICO TRADUZIDO EM PORTUGUÊS	49
CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
PARECER DO CEP	70

LISTA DE ABREVIATURAS

GH – hormônio do crescimento

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro

GHR – receptor do hormônio do crescimento

IGF-1 – fator de crescimento semelhante a insulina-1

IGF 2 – fator de crescimento semelhante a insulina -2

JAK – 2 – Janus Kinase -2

STAT – transdutores de sinais e ativadores da transcrição

MAPK – proteína quinase ativadora de mitógenos

RE - retículo endoplasmático

TNF – fator de necrose tumoral

MAb – anticorpo monoclonal

6p – braço curto do cromossomo 6

8q – braço longo do cromossomo 8

1p – braço curto do cromossomo 1

FISH – hibridização fluorescente localizada

GEP – perfil de expressão gênica

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

COMS – Grupo de Estudo Colaborativo em Melanoma Ocular

RESUMO

Os melanomas de coróide são neoplasias malignas originadas nos melanócitos do neuroectoderma localizados na coróide, íris e corpo ciliar. Trata-se da neoplasia intra-ocular primária adquirida mais freqüente. Os fatores clínicos associados a pior prognóstico são o tamanho do tumor, a localização próxima ao corpo ciliar, idade do paciente no momento do diagnóstico e a extensão extra-escleral. Quanto às características histológicas dos melanomas uveais, esses tumores podem ser classificados em espinocelular B, epitelióide e misto (células espinocelulares B e epitelióides). Os tumores epitelióides têm maior grau de anaplasia e estão associados à pior sobrevida. Achados citogenéticos e de biologia molecular que estão relacionados ao prognóstico dos pacientes incluem a monossomia do cromossomo 3 e o perfil de expressão gênica classe II. Embora o tratamento desta neoplasia esteja bem estabelecido, as metástases são um assunto que preocupa os pesquisadores, pois a sobrevida média após a sua detecção é de sete meses. Deste modo, a busca por critérios que possam prever o surgimento das mesmas é constante.

O hormônio do crescimento (GH) é conhecido como regulador do crescimento celular. É um agente mitogênico para os elementos celulares e não somente está associado à proliferação celular como também à transformação total do fenótipo resultando em oncogênese, embora seu efeito na patogênese tumoral ainda não esteja completamente estabelecido. A presença do receptor do GH pode ser avaliada através do uso de anticorpos monoclonais. A avaliação da presença do receptor de GH é importante na medida em que seus análogos e antagonistas têm considerável benefício terapêutico no tratamento de diversas patologias e considerável potencial para o tratamento do câncer.

O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão do anticorpo anti-receptor GH nos melanócitos obtidos de pacientes com melanoma de coróide correlacionando com o tipo histológico, invasão escleral, infiltração linfocitária, presença de padrões vasculares complexos intra-tumorais, metástases e sobrevida, buscando sua associação como fator de pior prognóstico.

Foram examinados 43 casos, sendo os tumores classificados de acordo com o tipo celular em espinocelular B (15 casos), misto (15 casos), epitélíode (12 casos) e necrótico (1 caso). O tempo médio de seguimento dos pacientes foi de 37,5 meses e ao final do estudo, 72,1% dos pacientes estavam vivos. Metástases foram detectadas em 18 pacientes (41,9%). Com relação à expressão do GHR, 38 espécimens apresentaram imunorreatividade positiva ao anticorpo MAb 263; dentre estes, 19 exibiram forte impregnação enquanto outros 19 exibiram fraca impregnação. Quatro casos foram considerados negativos e um foi excluído devido à necrose extensa.

Através da análise univariada, a expressão do GHR não foi significativamente associada à sobrevida ($p=0,057$), apesar de haver uma tendência sugerindo que esta correlação possa estar associada à pior prognóstico.

Assim, conclui-se que há evidência da expressão do GHR na maioria dos melanomas de coróide estudados e este achado pode estar relacionado à pior prognóstico. Entretanto, estudos complementares serão necessários para aprofundar o conhecimento a respeito da hipótese aqui estudada.

INTRODUÇÃO

MELANOMAS UVEAIS

Os melanomas uveais são neoplasias malignas originadas nos melanócitos do neuroectoderma localizados na coróide, corpo ciliar e íris. Trata-se do tumor intra-ocular primário mais comum em indivíduos caucasianos, sendo mais freqüentemente localizado na coróide (McCartney ACE, 1995). A histologia dos melanomas uveais apresenta células melanocíticas anaplásicas com grau moderado ou alto de pleomorfismo, relação núcleo-citoplasma aumentada, um ou mais nucléolos proeminentes em cada célula e um alto potencial para disseminação sistêmica por via hematogênica.

Anatomicamente, o tumor na coróide localiza-se sob a retina, o que lhe confere uma forma lenticular biconvexa. No entanto, ao romper a membrana de Bruch e o epitélio pigmentar da retina, o que ocorre em 20% dos casos, o tumor assume uma forma semelhante a de um cogumelo, o que é considerado um achado característico, facilmente identificado através da ultrassonografia ocular.

Apresenta uma incidência que varia de 5,3 a 10,9 casos para cada milhão de indivíduos com idade acima de 55 anos (Singh AD e cols., 2003). Sua prevalência aumenta proporcionalmente à idade, sendo que o diagnóstico é estabelecido em torno dos 55-60 anos na maioria das séries.

O diagnóstico destas lesões continua a ser essencialmente clínico baseado no exame oftalmológico que inclui a biomicroscopia do segmento anterior e a oftalmoscopia binocular indireta associadas à ultrassonografia ocular (Modo A, ou B, ou ultra-som de alta resolução). Estes métodos juntos possuem

sensibilidade de até 99,7% no diagnóstico clínico de tumores considerados clássicos por alguns dos oftalmologistas mais experientes da América do Norte (COMS, 1998).

Ao exame de fundo de olho, os melanomas de coróide apresentam-se geralmente como lesões unilaterais, unifocais, elevadas, de coloração marrom escuro a dourado, comumente localizados posterior ao equador do globo ocular. Descolamento de retina adjacente ao tumor é um achado muito freqüente.

A maioria dos pacientes é assintomática. Entretanto, se presentes, as queixas mais comuns do paciente são baixa acuidade visual, defeitos no campo visual, flashes luminosos e moscas volantes (COMS, 1998).

Alguns fatores de risco externos e do próprio hospedeiro têm sido investigados mas seu envolvimento direto na patogênese dos melanomas uveais permanece inconclusiva. Dentre estes fatores, a raça parece ser a mais significativa. O melanoma uveal é 150 vezes mais comum na raça branca do que nos negros (Egan KM e cols., 1988; Singh AD e cols., 2003). A relação entre exposição solar e melanoma uveal, ao contrário do que ocorre na pele, é fraca e contraditória (Egan KM e cols., 1988, Singh AD e cols., 2004). Recentemente, em estudos de cultura de células de melanoma, Di Cesare e cols (2009) observaram aumento da proliferação celular naquelas expostas à luz azul quando comparadas ao grupo controle não exposto. Ainda, parece haver maior risco de desenvolvimento da doença em pacientes que apresentam a íris de coloração mais clara e que sofreram maior exposição à radiação ultravioleta (Schmidt-Pokrzywniak A e cols., 2008). A exposição à luz ultravioleta contínua relacionada ao trabalho também não mostrou evidências consistentes de risco

(Egan KM e cols., 1988; Singh AD e cols., 2004). A herança familiar não parece ser relevante neste tipo de tumor, embora existam casos ocorridos entre membros da mesma família (Kodjikian L e cols., 2003).

Existem inúmeras teorias especulativas acerca da transformação maligna de um nevo de coróide, cuja prevalência na população de adultos brancos é de 3-10% (exponencialmente superior ao melanoma de coróide). Alguns autores estimam que cerca de 2%, 9% e 13% dos nevos de coróide submetidos a acompanhamento clínico eventualmente apresentem crescimento significativo que se presume ser transformação maligna em 1, 5 e 10 anos, respectivamente (Shields CL e cols., 2009). Entretanto, em vários casos relatados, não existem evidências científicas de que houve uma verdadeira transformação tumoral ao invés de um diagnóstico indevido de nevo de coróide pela pequena dimensão tumoral (Augsburger JJ e cols., 2008).

Quanto às dimensões tumorais, os melanomas uveais são classificados em pequenos quando apresentam diâmetro < 10 mm e espessura < 3 mm; médios quando encontram-se entre 10-15mm de diâmetro e 3-5mm de espessura e grandes quando apresentam diâmetro >15mm e espessura > 5mm (McCartney ACE, 1995). O Estudo Colaborativo dos Melanomas Oculares (*Collaborative Ocular Melanoma Study: COMS*) definiu como grandes os tumores > 10mm de altura ou cujo diâmetro basal seja > 16 mm e altura \geq 2 mm; e como médios aqueles que tem entre 2,5mm e 10mm de altura e maior diâmetro basal \leq 16mm (COMS, 1998).

Tumores grandes apresentam com maior frequência extensão extra-ocular, invasão da retina, veias vorticosas e vasos emissários, além da ruptura da membrana de Bruch (COMS, 1998). A disseminação extra-escleral apresenta

correlação com aumento da mortalidade por confirmar as características de invasividade e crescimento tumor, independente da via de saída das células tumorais (Coupland SE e col., 2008).

Outros fatores relacionados ao prognóstico de sobrevida dos pacientes com melanoma de úvea incluem a localização da margem anterior do tumor relativa à ora serrata e equador, maior dimensão linear do tumor, idade do paciente, extensão extra-escleral e envolvimento do corpo ciliar (Augsburger JJ e cols., 1990). Apesar desses achados estarem associados a pior prognóstico de sobrevida, eles não são confiáveis o suficiente para basear qualquer predição acerca do surgimento de metástase nesses casos (Augsburger JJ e cols., 2007).

A primeira classificação baseada nas características histopatológicas dos melanomas uveais foi proposta por Callender no início do século passado (Callender GR, 1931). Após vários estudos e revisões desta classificação incluindo dados de sobrevida dos pacientes estudados, atualmente utiliza-se a classificação de Callender modificada que foi proposta por McLean (Mc Lean IW e cols., 1983). Esta classificação divide os tumores melanocíticos da úvea em nevo espinocelular A, melanoma espinocelular B, melanoma epitelióide, e melanoma misto (composto por células espinocelulares B e epitelióides).

As células espinocelulares A têm uma configuração celular alongada e pequena, formato de charuto com citoplasma geralmente escasso, núcleo alongado com uma dobra central, sem nucléolo evidente, alta coesividade intercelular e raras mitoses (COMS, 1998).

As células espinocelulares B (ou fusiformes) se apresentam alongadas ou arredondadas, dependendo do plano da secção, possuem núcleo grande e

núcleo evidente e excêntrico, citoplasma relativamente esparsos podendo formar arranjos fasciculados (figura 1). As mitoses são ocasionais (COMS, 1998).

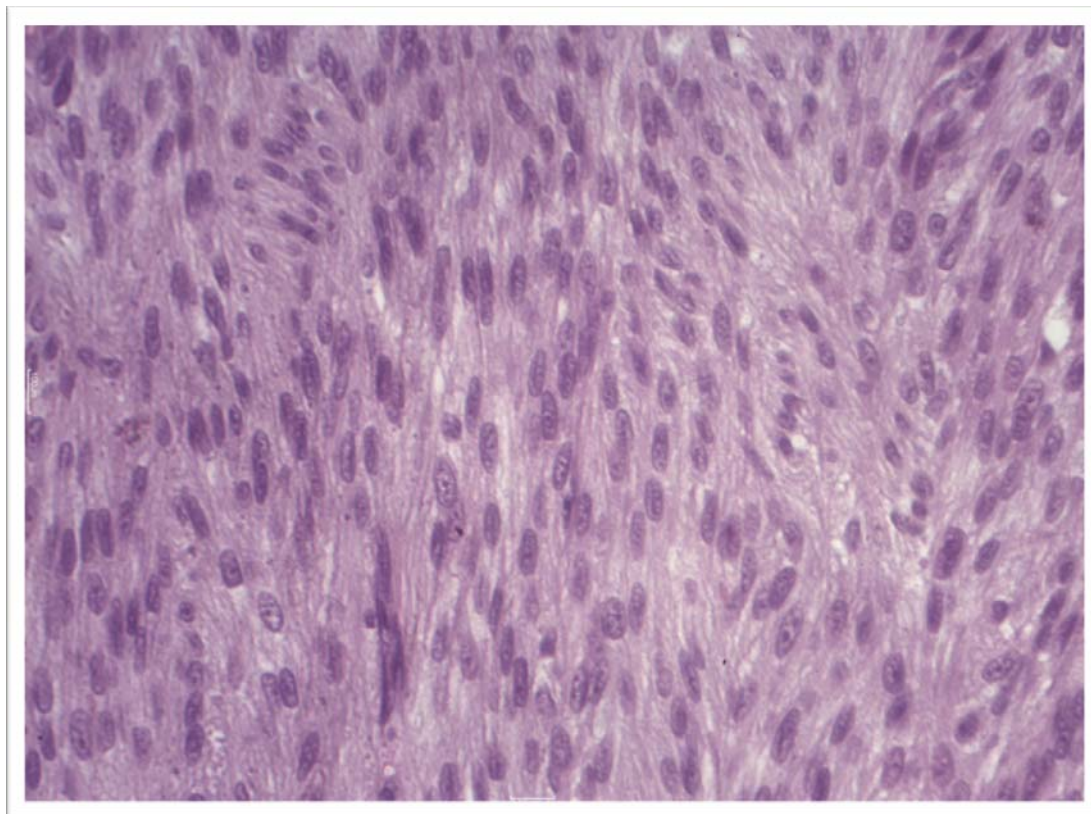


Figura 1. Tipo celular fusiforme. HE 40X.

Fonte: Dra Zélia M Correa, Universidade de Cincinnati, Cincinnati, OH, USA.

O tipo celular misto é caracterizado pela presença de células espinocelulares B e epitelióide desde que menos do que 50% do tumor seja composto por células do tipo epitelióide (COMS, 1998).

As células epitelióides caracterizam-se pelo tamanho grande comparado com os outros tipos celulares descritos anteriormente (figura 2). Essas células são arredondadas ou poligonais, apresentam pleomorfismo evidente, baixa coesividade entre as células, citoplasma abundante, relação núcleo/citoplasma

aumentada, núcleo e nucléolo grandes; estes, às vezes, múltiplos e geralmente centrais, além de várias figuras de mitose (COMS, 1998).

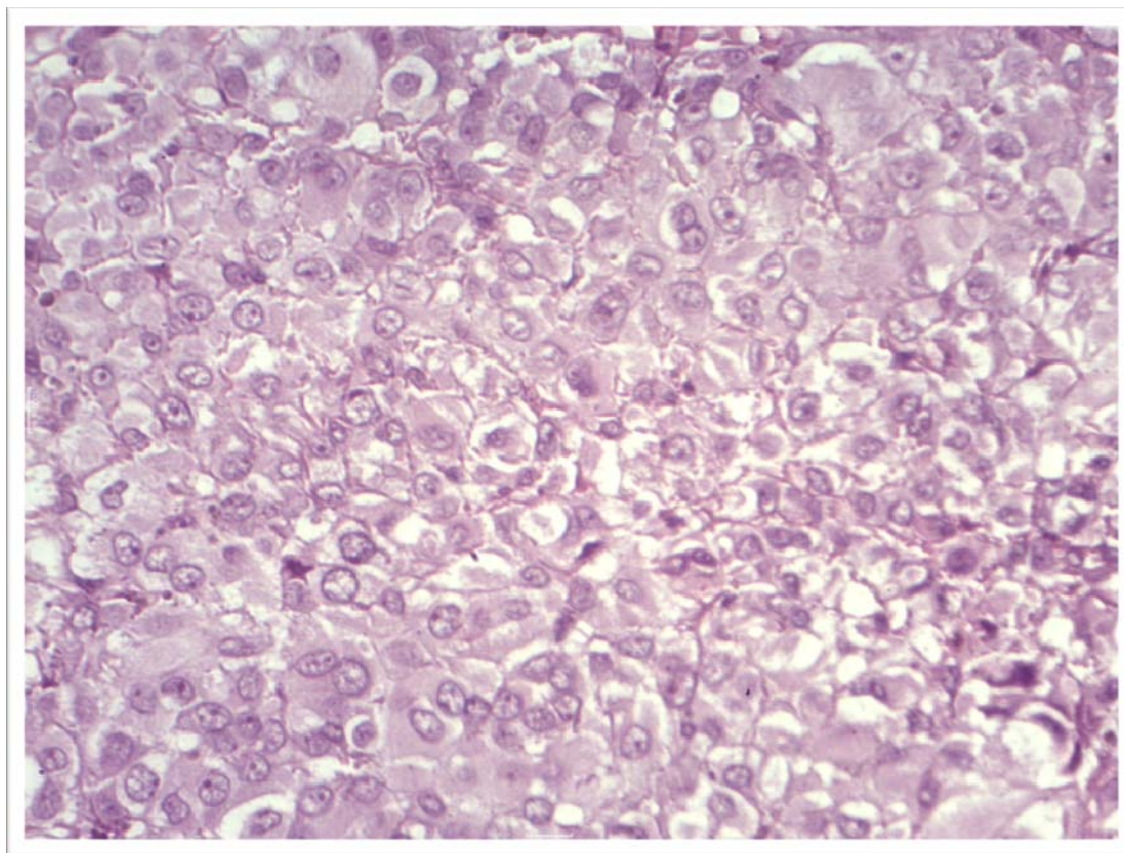


Figura 2. Tipo celular epitelióide. HE 40X.

Fonte: Dra Zélia M Correa, Universidade de Cincinnati, Cincinnati, OH, USA.

Estudos de sobrevivência mostraram que pacientes cujo tumor é formado por células do tipo espinocelular B exibem melhor prognóstico clínico do que aqueles cujo tumor é formado por células mistas ou predominantemente epitelióides (Iwamoto S e cols., 2002).

Vários parâmetros histopatológicos correlacionados com pior prognóstico foram documentados; dentre eles destacam-se a presença e número de figuras de mitoses, a presença de infiltração linfocitária, a presença de padrões vasculares complexos intra-tumorais, e extensão tumoral através da esclera (Singh AD e cols., 2005).

Entretanto, o tipo celular permanece como a característica histopatológica mais utilizada para prognóstico clínico dos pacientes (McLean IW, 1995), correlacionando-se fortemente com o tamanho do tumor, envolvimento do corpo ciliar e outros achados histomorfológicos (Augsburger JJ e cols., 2007).

Considerando que a tumorigênese geralmente é precedida por alterações cromossômicas, nos melanomas de coróide observam-se anormalidades que foram correlacionadas com seu potencial metastático tais como a perda de uma cópia do cromossomo 3 (monossomia do 3) e alterações no braço curto do cromossomo 6 (6p) e braço longo do cromossomo 8 (8q) (Kilic E e cols., 2006; Damato B e cols., 2007).

Alguns estudos retrospectivos de análises citogenéticas sugerem a existência de duas vias de evolução clonal nos melanomas uveais: uma inicia com a perda do cromossomo 3 seguida pelo ganho do 8q e a outra inicia com o ganho do 6p (Sisley K e cols., 1990; Höglund M e cols., 2004; Sandinha M e cols., 2005).

O maior desafio a respeito dos melanomas uveais é a quase ausência de melhora na sobrevida desses pacientes mesmo com tratamento local do tumor. Vários estudos têm demonstrado que a taxa de mortalidade relacionada à metástase em indivíduos com melanoma de coróide tem se mantido relativamente estável nos últimos 60 anos em cerca de 50% em 5 anos. A taxa de sobrevida é ainda pior naqueles cujo tumor exhibe monossomia do cromossomo 3 comparado àqueles cujo tumor não apresenta esta alteração (Prescher G e cols., 1996; Augsburger JJ e cols., 2007).

A perda do braço curto do cromossomo 1 (1p) foi observada em pacientes que desenvolveram metástases (Kilic E e cols., 2006) e perda simultânea de 1p e

de um dos cromossomos 3 foi associada à menor sobrevida (Kilic E e cols., 2005).

A monossomia do cromossomo 3 é tida como um dos eventos genéticos mais precoces nos melanomas uveais e por isso parece ser um marcador prognóstico de alta especificidade nestes tumores (Midená E e cols., 2008). Deleções parciais do cromossomo 3 também podem estar associadas a um aumento da mortalidade (Tschentscher F e cols., 2001). Deve-se ressaltar que há heterogeneidade no número de cópias cromossômicas entre uma célula e outra, o que pode influenciar a interpretação do teste que detecta a monossomia do 3 (hibridização fluorescente localizada – *Fluorescein In-Situ Hybridization*: FISH) apesar dessa heterogenicidade não modificar o prognóstico de sobrevida do paciente (Mensink HW e cols., 2009). Uma outra possível interpretação errônea pode ocorrer se o tumor apresentar di-isossomia do cromossomo 3, que se traduz na presença de 2 cópias monossômicas do cromossomo 3 nas células estudadas o que freqüentemente é interpretado como dissomia do cromossomo 3 (Landreville S e cols., 2008).

Reunindo dados de vários estudos, foi observado que cerca de 30-40% dos melanomas de tamanho médio (2,5-10mm de altura e \leq 16 mm de diâmetro) 50-60% dos melanomas grandes (>10 mm de altura e >16mm de diâmetro) e mais de 70% daqueles que praticamente preenchem a cavidade intra-ocular exibirão monossomia do cromossomo 3 e/ou perfil de expressão genético classe II que são preditores de metástase no futuro (Augsburger JJ e cols., 2007).

Mais recentemente, estudos acerca da biologia molecular dos melanomas uveais tem revelado que o perfil de expressão gênica (*Gene Expression Profile-*

GEP) das células tumorais é o teste mais robusto em determinar quais indivíduos teriam o potencial para desenvolver doença metastática e ir a óbito. O perfil de expressão gênico, avaliando 62 genes incluindo subgrupos significantivos nos cromossomos 3 e 8q, identificou duas classes de melanomas uveais que se correlacionam fortemente ao prognóstico de disseminação metastática e sobrevida destes pacientes. Pacientes com perfil descrito como classe I apresentam probabilidade muito baixa de desenvolver metástases e conseqüentemente tem boa sobrevida (Augsburger JJ e cols., 2007). Já aqueles que pertencem à classe II costumam desenvolver metástases hepáticas e têm um mau prognóstico de sobrevida (Onken M e cols., 2004).

Ainda, deve-se levar em consideração que o GEP é mais homogêneo mesmo quando amostras provenientes de diferentes regiões do tumor são testadas, o que torna essa classificação de risco individual significativamente mais fidedigna do que qualquer outra classificação baseada em achados clínicos ou histopatológicos (Augsburger JJ e cols., 2007). Finalmente, o GEP pode ser o primeiro passo para testar novas terapias alvo para prevenir a ocorrência de metástase (Harbour JW, 2009).

Interessantemente, células circulantes são detectadas no sangue periférico da maioria dos pacientes com melanoma no momento do diagnóstico, mas não se equivalem à doença metastática, pois muitos pacientes que apresentam estas células não desenvolvem metástase (Fernandes BF e cols., 2007; Augsburger JJ e cols., 2007).

O tratamento dos melanomas uveais depende do tamanho do tumor, extensão, localização, presença de invasão escleral e extensão extra-ocular, acuidade

visual e estado de saúde do paciente, além da detecção de metástases sistêmicas. A disponibilidade técnica e habilidade diagnóstica bem como terapêutica do oftalmologista que conduz o tratamento também são fatores decisivos na cura local do tumor primário .

Atualmente, as opções terapêuticas para os melanomas uveais têm evoluído e são bastante eficazes. O objetivo é preservar o globo ocular e a função visual sempre que possível. A terapia conservadora utilizando a braquiterapia é preferida em detrimento aos tratamentos cirúrgicos que consistem na ressecção em bloco do tumor ou remoção completa do globo ocular contendo o tumor (enucleação). Várias publicações têm mostrado que a braquiterapia com Iodo 125 é tão eficaz quanto a enucleação em tratar o tumor localmente e a sobrevida relacionada à estes tratamentos também é a mesma. Sendo assim, sempre que possível prefere-se a braquiterapia pela possibilidade de preservação do globo ocular (COMS, 2006).

Laserterapia através de termoterapia transpupilar é uma opção de tratamento, mas vem perdendo espaço como terapia única no tratamento dos melanomas de coróide devido à taxa de recorrência (Win PH e cols, 2006); entretanto, seu papel como tratamento adjuvante à braquiterapia pode ser considerado promissor (Harbour JW e cols, 2003).

A quimioterapia não é efetiva para o tratamento dos melanomas uveais confinados ao globo ocular.

Metástases do melanoma uveal têm sido descritas em vários órgãos, mas apresentam uma predileção pelo fígado (89%), seguido dos pulmões (29%), ossos (17%) pele e tecido subcutâneo(12%) e linfonodos (11%), segundo COMS (COMS, 2005). Essa disseminação do tumor ocorre via hematogênica

e é responsável pela alta mortalidade observada em indivíduos com melanomas uveais. A sobrevida estimada para tais pacientes é cerca de 6 a 12 meses após a detecção da metástase, com tempo médio de sobrevida de 7 meses (Gamel JW e cols., 1993; COMS, 2005) e o tratamento das metástases geralmente se mostra ineficaz nestes casos (Albert DM e cols., 1992).

A razão pelo qual há predileção hepática não está estabelecida; no entanto, acredita-se que fatores locais hepáticos promovam o crescimento, disseminação e progressão desta neoplasia (Economou MA e cols., 2005). As metástases hepáticas vêm sendo tratadas através de quimioembolização ou imunoembolização com fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos. Estudos com número limitado de casos sugerem que pacientes que receberam altas doses de imunoembolização tiveram sobrevida maior quando comparados àqueles que receberam quimioembolização (Yamamoto e cols., 2009). Entretanto, não existem estudos que comprovem a verdadeira efetividade do tratamento das metástases sistêmicas dos melanomas uveais (Augsburger JJ e cols., 2009).

A ressecção das metástases também é uma opção terapêutica que parece estender a sobrevida dos pacientes não submetidos à hepatectomia (Frenkel S e cols., 2009).

Apesar da busca incessante de alternativas terapêuticas para os melanomas metastáticos, uma meta-análise publicada em 2008 revela que apesar dos diversos tratamentos terem o potencial de aumentar a sobrevida de certos subgrupos de pacientes com doença metastática, o impacto destes tratamentos disponíveis ainda não é significativo para a melhora da sobrevida em geral deste grupo de pacientes (Augsburger JJ e cols., 2008).

O potencial metastático dos melanomas de coróide tem sido um estímulo importante para as intensas pesquisas visando melhorar o atendimento ao paciente que apresenta este tipo de tumor. A mortalidade associada às metástases confirmadas por exame histopatológico, em pacientes com melanoma de coróide após tratamento com braquiterapia ou enucleação é de 10% e 11%, respectivamente, em 5 anos e 18% e 17%, respectivamente, em 10 anos. Idade avançada e a dimensão linear basal aumentada do tumor foram os preditores primários do óbito por metástases e também dos óbitos por todas as causas (COMS, 2006).

Entretanto, estudos nos Estados Unidos (Singh AD e cols., 2003) e Suécia (Bergman L e cols., 2003) indicam que a taxa de mortalidade por doença metastática, apesar dos novos tratamentos, tem se mostrado inalterada nos últimos 25 anos, ficando em torno de 50% mesmo que apenas 2% dos pacientes apresentem metástases clinicamente detectáveis no momento do diagnóstico (Midea E e cols, 2008).

O fato de ser o fígado o local preferencial para as metástases levanta a hipótese de que fatores relacionados a este órgão (como por exemplo o IGF-1) sejam importantes para o crescimento e progressão desta malignidade (van den Eijden M e cols., 2007).

A participação do GH no desenvolvimento dos melanomas de coróide atuando diretamente no crescimento do tumor primário ou através da indução do IGF-1 e conseqüente associação com o surgimento de metástases é um assunto que merece estudo.

A busca por novos marcadores é relevante pela possibilidade de serem descobertas novas modalidades terapêuticas. A identificação do paciente que

apresenta fatores associados a pior prognóstico é fundamental à medida em que podemos realizar o acompanhamento rigoroso e, idealmente no futuro, tratarmos precocemente de maneira a evitar a progressão da doença com o surgimento de metástases.

O HORMÔNIO DO CRESCIMENTO E SEU RECEPTOR

O hormônio do crescimento (GH) é uma proteína composta por 198 aminoácidos produzida pelos somatotrófos da hipófise anterior, cuja função é ser o maior regulador pós-natal do crescimento e maturação celular (Martinelli Jr e cols., 2008).

O GH é um agente mitogênico para elementos celulares estromais como fibroblastos, adipócitos, macrófagos e células endoteliais (Merchav S e cols.,1998) que modula a síntese de múltiplos RNAm nos tecidos, exercendo um papel fundamental no controle do metabolismo, promoção do crescimento balanceado e diferenciação da expressão celular (Lincoln DT e cols.,1998; Lincoln DT e cols.,1999).

Alem disso, o GH exerce seu papel também em tecidos tumorais, visto que níveis elevados de GH plasmáticos têm sido documentados em várias neoplasias (Andrew GS, 1983) e seu efeito definitivo na gênese tumoral tem sido amplamente estudado.

As diversas ações fisiológicas do GH nos tecidos alvo são mediadas por sua ligação ao seu receptor (GHR) no nível celular e envolvem uma cascata de fosforilação que resulta na modulação de várias vias sinalizadoras (Brooks AJ e cols., 2008). Uma das hipóteses acerca desta ação mitogênica do GH é que a mesma seja mediada pelo fator de crescimento simulador da insulina-1

circulante (*insuline-like growth-factor*: IGF-1), produzido no fígado em resposta à liberação do GH sintetizado na hipófise (Stracke H e cols.,1984). Esta dependência se confirma através da observação de que pacientes com deficiência completa de GH apresentam níveis muito baixos de IGF-1 (Merchav S e cols.,1988). Entretanto, algumas evidências a partir de estudos em animais e humanos revelam que IGF-1 também pode ser sintetizado localmente e independentemente da ação do GH. Portanto, a função exercida pelo GH e IGF-1 em tecidos tumorais não seria dependente da regulação hipofisária, o que poderia explicar o potencial do GH em agir como um regulador da expressão das funções celulares além de promover a proliferação celular através do IGF-1 (Hynes MA e cols., 1987; Murphy L e cols., 1987).

Os fatores de crescimento simuladores da insulina (IGF-1 e IGF-2) são peptídeos produzidos na maioria dos órgãos e tecidos do organismo. A secreção desses fatores de crescimento ocorre à medida que são produzidos e não ocorre armazenamento. Entretanto, sabe-se que a maior parte dos IGF circulantes são provenientes do fígado (Sjogren K e cols., 1999, Yakar S e cols., 2002). Exercem suas ações mediante interação com os respectivos receptores (IGFR-1 e 2), mas a maioria delas é mediada por IGFR-1, não sendo ainda claro o papel fisiológico do receptor 2 (Martinelly Jr e cols., 2008).

Até recentemente, acreditava-se que o GH fosse secretado somente pela hipófise. No entanto, nos últimos anos vem sendo conhecida a produção de GH fora da hipófise em células neuronais, embrionárias, pulmonares, da imunidade e de algumas neoplasias (Mukhina S e cols; 2004). Devido ao seu funcionamento peculiar, o sistema autócrino de produção do GH pode estar relacionado à transformação maligna e metástases em tumores (Mukhina S e

cols., 2004; Zhu T e cols., 2005). In vivo, torna-se difícil avaliar a atuação do GH endócrino e autócrino separadamente pois sua ação é simultânea e em graus variados e diferentes tipos de tecido. Em estudo experimental conduzido para avaliar a função do GH e GHR autócrinos expressados na mesma célula observou-se que o GH autócrino liga-se ao receptor imediatamente após sua síntese no retículo endoplasmático (van den Eijnden MJ e cols, 2007). Tal fato facilita a sua maturação. Só então o complexo GH-GHR migra à superfície celular, onde o GH endógeno/extra-celular disponível não consegue se ligar ao GHR na célula pois esse receptor já se encontra ocupado. Em contraste, na regulação endógena das células normais (não neoplásicas) somente o GH extracelular é capaz de se ligar e ativar o GHR na membrana plasmática.

A produção autócrina do GH induzindo transformação celular pelo mecanismo GHR dependente também foi demonstrada em células epiteliais mamárias (Waters ET e cols., 2004, Mukhina e cols., 2006). Tal achado demonstra uma correlação positiva entre o GH e doença proliferativa mamária e sugere que o aumento da sensibilidade do GHR nuclear levaria a célula à proliferação e potencial transformação neoplásica.

A ação direta do GH a nível molecular foi constatada devido à presença do GHR em células tumorais em proliferação e em células bem diferenciadas (Lincoln DT e cols., 1998). Isso sugere que a resposta local do GH depende da presença do receptor apropriado (GHR) e que o GH seja necessário não somente para a diferenciação de células progenitoras mas para expansão clonal, diferenciação e manutenção celular.

O receptor GH é uma proteína transmembrana composta por 620 aminoácidos (Bazan JF, 1990), membro da família dos receptores hematopoiéticos ou

citoquinas (classe 1) que não contém um domínio tirosina-quinase na sua região citoplásmica. O receptor GH classe 2 é da família do interferon e compartilha as mesmas características estruturais e vias de transdução dos receptores classe 1. Ambas as classes de receptores estão associadas à ativação de fatores de transcrição que promovem a ativação da expressão de genes reguladores, principalmente pela via sinalizadora chamada “JAK-2 (Janus Kinase 2) - STAT (transdutor de sinal e ativador de transcrição) (Gofin V, 1996). A transmissão do sinal ocorre mediante a ativação e a fosforilação da enzima JAK2 e de resíduos do domínio intracelular do receptor do GH (Argetsinger LS, Carter-Su C, 1996) Isto resulta no engajamento de diversas proteínas de sinalização intra-celular, incluindo os STAT e componentes da via chamada proteína quinase ativadora de mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase: MAPK) (Kofoed EM e cols., 2003).

O GH liga-se ao domínio extracelular do GHR em sua porção terminal *N* que consiste em duas alças de fibronectina tipo III β conectadas causando uma mudança conformacional neste local e a rotação do domínio intracelular dos receptores (Gent J e cols, 2002). Através desta rotação, moléculas associadas à JAK-2 aproximam-se e fosforilam-se entre si e fosforilam também o receptor, iniciando a cascata de transdução da sinalização (Gent J e cols., 2002; Brown RJ e cols., 2005; Waters MJ e cols., 2006). Esta cascata inclui vias como a JAK-STAT, a MAPK e fosfatidil inositol-3 quinase (Herrington J e cols., 2001).

Apesar dos vários estudos acerca dos mecanismos pelos quais a ligação do GH promove ativação do seu receptor (GHR), ainda não se conhece todas as interações entre esse hormônio e seu receptor. Sabe-se que essa interação (GH-GHR) é mediada por dois sítios de ligação assimétricos (1 e 2) no GH.

Supõe-se que o GH promova a dimerização seqüencial dos monômeros do GHR, ligando-se fortemente ao sítio 1 e em seguida promovendo uma ligação mais fraca no sítio 2 (Cunningham BC e cols., 1991). A resposta à ligação do GH e seu receptor ocorre rapidamente na forma da fosforilação do GHR que é detectada em poucos minutos (Yang N e cols, 2008).

O GHR é glicosilado no complexo de Golgi após sua síntese e dimerização no retículo endoplasmático (RE). Em seguida esse receptor volta à superfície celular onde pode seguir uma das três rotas: 1- o GHR pode unir-se ao GH se este estiver disponível ou, 2- o GHR pode ser clivado por metaloproteinases chamadas fatores de necrose tumoral (*TNF α -converter*) (Wang X e cols., 2002) ou, 3- o GHR pode ser internalizado, sendo degradado pelo sistema lisossomal (van Kerkhof P e cols., 2001).

Devido a sua ligação à membrana plasmática, acreditava-se que a ação do GH estaria limitada a este local. Entretanto, evidências de sua localização intracelular (Lobie PE e cols., 1994), especificamente no núcleo de células em estado proliferativo e em certas neoplasias como linfomas B, carcinoma de mama e melanoma de pele revelou o potencial para outros efeitos do GH (Conway-Campbell BL e cols., 2007). Um estudo com modelo animal e células *in vitro* e *in vivo* demonstrou a correlação entre a presença do GHR nuclear e proliferação celular, resultando em oncogênese (Conway-Campbell BL e cols., 2007). Os autores sugerem ainda que o período de duração do GHR nuclear (cerca de 1 hora) que costuma coincidir com a iniciação do ciclo celular poderia ser alterado resultando em transformação celular maligna (neoplasia).

A localização do receptor no núcleo poderia ser um mecanismo de direcionamento da proliferação, que é uma etapa fundamental na tumorigênese

(Brooks A e cols, 2007). Corroborando essa teoria, um estudo de Perry JK e cols. (2006) em modelo animal evidenciou provável papel do GH na oncogênese ao administrar antagonista do receptor do GH em ratos que causou inibição do carcinoma mamário. Adicionalmente, alterações neoplásicas induzidas pelo GH têm sido descritas em vários órgãos, incluindo carcinoma adrenal, tumor de mama, linfossarcoma pulmonar e tumores sólidos ovarianos (van den Eijnden MJ e cols., 2007).

Devido à importância da localização celular do GHR descrita anteriormente, varias técnicas de imunohistoquímica foram desenvolvidas com esse objetivo. Vários anticorpos monoclonais dirigidos contra a porção extracelular do receptor podem ser utilizados para localizar o GHR. Dentre os anticorpos anti-receptores GH conhecidos, o MAb 263 mostrou imunorreatividade em células teciduais normais e tumorais de humanos e a presença do receptor foi localizada tanto no citoplasma como no núcleo nestas células (Lincoln DT e cols., 1999).

GH e GHR em melanomas cutâneos

A expressão do GHR nos tecidos derivados do ectoderma, inclusive nos melanócitos da pele, foi demonstrada por Lincoln DT e cols. (1998). Em ordem crescente de expressão, a pele normal apresenta menor expressão de GHR que nos nevos, e nestes a expressão foi menor que nos melanomas. Tal achado sugere que a expressão do receptor varia em função da rapidez de replicação celular, o que é um indício de agressividade tumoral. A imunoexpressão do GHR nas células do melanoma cutâneo foi observada principalmente no citoplasma (Lincoln DT e cols., 1999), o que sugere que este

receptor esteja associado à proliferação celular e também à transformação do fenótipo tumoral (Conway-Campbell BL e cols., 2007). Essa expressão do GHR em melanomas cutâneos em humanos pode ser um indicador de que o GH esteja envolvido no direcionamento da proliferação celular mediada pelo IGF-1, já que a proporção de células positivas para o IGF-1 mostrou-se comparável à expressão do GHR (All-Ericson e cols., 2002).

GH e GHR em melanomas uveais

A presença do GHR foi documentada nas células ganglionares e bipolares da retina (Lincoln DT e cols., 1998). Entretanto não existem relatos acerca de expressão deste receptor em melanócitos da coróide.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albert DM, Niffenegger AS, Willson JKV. Treatment of metastatic uveal melanoma: review and recommendations. *Surv Ophthalmol.* 1992;36:429-438.

All-Ericsson C, Girnita L, Seregard S, Bartolazzi A, Jaeger MJ, Larsson O. Insulin-like growth factor-1 receptor in uveal melanoma: a predictor for metastatic disease and a potential therapeutic target. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;(43)1:1-8.

Andrew GS. Growth hormone and malignancy. *J Clin Pathol.* 1983;36:935-937.

Argetsinger LS, Carter-Su C. Growth hormone signaling mechanisms: involvement of the tyrosine kinase JAK2. *Horm Res.* 1996;45(1):22-4.

Augsburger JJ, Gamel JW. Clinical prognostic factors in patients with posterior uvea malignant melanoma. *Cancer* 1990 Oct 1;66(7):1596-600.

Augsburger JJ, Corrêa ZM, Trichopoulos N. An alternative hypothesis for observed mortality rates due to metastasis after treatment of choroidal melanomas of different sizes. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2007;105:54-59; discussion 59-60. Review.

Augsburger JJ, Corrêa ZM, Trichopoulos N, Shaikh A. Size overlap between benign melanocytic choroidal nevi and choroidal malignant melanomas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 Jul;49(7):2823-8.

Augsburger JJ, Corrêa ZM, Shaikh AH. Quality of evidence about effectiveness of treatments for metastatic uveal melanoma. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2008;106:128-35; discussion 135-7.

Augsburger JJ, Corrêa ZM, Shaikh AH. Effectiveness of treatment for metastatic uveal melanoma. *Am J Ophthalmol.* 2009;148:119-127.

Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:6934-6938.

Bergman L, Seregard S, Nilsson B, Lundell G, Ringborg U, Ragnarsson-Olding R. Uveal melanoma survival in Sweden 1960 to 1998. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(8):3282-3287.

Brooks AJ, Wooh JW, Tunny KA, Waters MJ. Growth hormone receptor: mechanism of action. *Intern J Biochem and Cell Biol.* 2008;40(10):1984-9. Epub 2007 Jul 25. Review.

Brown RJ, Adams JJ, Pelekanos RA, Wan Y, McKinstry WJ, Palethorpe K, et al. Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12:814-821.

Callender GR. Malignant melanotic tumors of the eye: a study of histologic types in 111 cases. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1931;36:131-142.

Collaborative Ocular Melanoma Study Group. Histopathologic characteristics of uveal melanomas in eyes enucleated from the Collaborative Ocular Melanoma Study. COMS report no. 6. 1998. Jun;125(6):745-766.

Collaborative Ocular Melanoma Study Group. Development of metastatic disease after enrollment in the COMS trials for treatment of choroidal melanoma. *Ach Ophthalmol.* 2005;123:1639-1643.

Collaborative Ocular Melanoma Study Group. The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma. *Ach Ophthalmol.* 2006;124:1684-1693.

Conway-Campbell BL, Wooh JW, Brooks AJ, Gordon D, Brown RJ, Lichanska AM et al. Nuclear targeting of the growth hormone receptor results in dysregulation of cell proliferation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(33):13331-13336.

Coupland SE, Campbell I, Damato B. Routes of extraocular extension of uveal melanoma: risk factors and influence on survival probability. *Ophthalmology.* 2008;115(10):1778-1785.

Cunningham BC, Ultsch M, De Vos AM, Mulkerrin MG, Clauser KR, Wells JA. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science*. 1991;254:821–825.

Damato B, Duke C, Coupland SE, Hiscott P, Smith PA, Campbell I, et al. Cytogenetics of uveal melanoma. A 7-year clinical experience. *Ophthalmol*. 2007;114:1925-1931.

Di Cesare S, Maloney S, Fernandes Bf, Martins C, Marshall JC, Anteck E, et al. The effect of blue light exposure in an ocular melanoma animal model. *J Exp Clin Cancer Res*. 2009 Apr 7;28:48.

Economou MA, All-Ericsson C, Bykov V, Girnita L, Bartolazzi A, Larsson O, Seregard S. Receptors for the liver synthesized growth factors IGF-1 and HGF/SF in uveal melanoma: intercorrelation and prognostic implications. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;(46)12:4372-5.

Egan KM, Seddon JM, Glynn RJ, Gragoudas ES, Albert DM. Epidemiologic aspects fo uveal melanoma. *Surv Ophthalmol*. 1988;32(4):239-251.

Fernandes BF, Anteck E, dos Passos G, Burnier MN Jr. Detection of circulating malignant cells in patients with uveal melanoma. *Arq Bras Oftalmol*. 2007 Jul-Aug;70(4):593-8.

Frenkel S, Nir I, Hendler K, Lotem M, Eid a, Jurim O, Pe´er J. Long-term survival of uveal melanoma patients after surgery for liver metastasis. *Br J Ophthalmol*. 2009; 93(8):1042-1046.

Gamel JW, McLean IW, McCurdy JB. Biologic distinctions between cure and time to death in 2892 patients with intraocular melanoma. *Cancer*. 1993;119:786–791.

Gent J, Kerkhof P, Roza M, Bu G, Strous GJ. Ligand-independent growth hormone receptor dimerization occurs in the endolasmic reticulum and is required for ubiquitin system-dependent endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:9858-9863.

Goffin V. Signal transduction of prolactin and cytokine receptors. In: Calvo F, Crepin M, Magdelenat H (eds). Breast cancer. Advances in biology and therapeutics. John Libbey Eurotext, London, England. 1996:131-137.

Harbour JW, Meredith TA, Thompson PA, Gordon ME. Transpupillary thermotherapy versus plaque radioteraphy for suspected choroidal melanomas. *Ophthalmol*. 2003;110(11):2207-2214.

Harbour JW. Molecular prognostic testing and individualized patient care in uveal melanoma. *AM J Ophthalmol*. 2009 Oct 1. [Epub ahead of print]

Herrington J, Carter-Su C. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 2001;12:252-257.

Höglund M, Gisselsson D, Hansen GB, White VA, Sall T, Mitelman F, Horsman D. Dissecting karyotypic patterns in malignant melanomas: Temporal clustering of losses and gains in melanoma karyotypic evolution. *Int J Cancer*. 2004;108:57-65.

Hynes MA, Van Wyk JJ, Brooks PJ, DErcole AJ, Lund PK. Growth hormone dependence of somatomedin C-IGF-I and IGF-II mRNA. *Mol Endocrinol*. 1987;1:233-242.

Iwamoto S, Burrows RC, Kalina RE, George D, Boehm M, Bothwell MA, et al. Immunophenotypic differences between uveal and cutaneous melanomas. *Arch Ophthalmol*. 2002;120:466-470.

Kilic E, Naus NC, van Gils W, et al. Concurrent loss of chromosome arm 1p and chromosome 3 predicts a decreased disease-free survival in uvea melanoma patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:2253-2257.

Kilic E, van Gils W, Lodder E, Beverloo HB, van Til ME, Mooy CM, et al. Clinical and cytogenetics analysis in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:3703-3707.

Kodjikian L, Nguyen K, Lumbroso L, Gauthier-Villars M, Chauvel P, Plauchu H, et al. Familial uveal melanoma: report on two families and a review of the literature. *Acta Ophthalmol Scand*. 2003 Aug;81(4):389-95.

Kofoed EM, Hwa V, Little B, Woods KA, Buckway CK, Tsubaki J, et al. Growth hormone insensitivity associated with a STAT5b mutation. *N Engl J Med*. 2003;349:1139-47.

Landreville S, Agapova OA, Harbour JW. Emerging insights into the molecular pathogenesis of uveal melanoma. *Future Oncol*. 2008;4(5):629-36.

Lincoln DT, Sinowatz F, Temmin-Baker L, Baker HI, Kolle S, Waters MJ. Growth hormone receptor expression in the nucleus and cytoplasm of normal and neoplastic cells. *Histochem Cell Biol*. 1998;109:141-159.

Lincoln DT, Sinowatz F, Kolle S, Takahashi H, Parsons P, Waters M. Up-regulation of growth hormone receptor immunoreactivity in human melanoma. *Anticancer Research*. 1999;19:1919-1932.

Lobie PE, Mertani H, Morel G, Morales-Bustos O, Norstedt G, Waters MJ. Receptor-mediated nuclear translocation of growth hormone. *J Biol Chem*. 1994 Aug 19;269(33):21330-9.

Martinelli Jr CE, Custódio RJ, Aguiar-Oliveira MH. Fisiologia do Eixo GH-Sistema IGF. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008;52(5): 717-725.

McCartney ACE. Pathology of ocular melanomas. *British Medical Bulletin*. 1995;51(3):678-693.

McLean IW, Foster WD, Zimmerman LE, Gamel JW. Modification of Callender's classification of uveal melanoma at the Armed forces Institute of Pathology. *Am J Ophthalmol*. 1983;96:502-509.

McLean IW. Prognostic features of uveal melanoma. *Ophthalmol Clin North Am*. 1995;8:143-153.

Mensink HW, Vaarwater J, Kiliç E, Naus NC, Mooy N, Luyten G et al. Chromosome 3 intratumor heterogeneity in uveal melanoma. 2009 Feb;50(2):500-4. Epub 2008 Sep 29.

Merchav S, Tatarsky I, Hochberg Z. Enhancement of erythropoiesis in vitro by human growth hormone is mediated by insulin-like growth factor I. *Br J Haematol*. 1998 Nov;70(3):267-271.

Midena E, Bonaldi L, Parrozzani R, Radin PP, Boccassini B, Vujosevic S. In vivo monosomy 3 detection of posterior uveal melanoma: 3-year follow-up. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008;246:609–614.

Mukhina S, Mertani HC, Lee KO, Gluckman PD, Lobie PE. From the cover: phenotypic conversion of human mammary carcinoma cells by autocrine human growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Oct 19;101(42):15166-15171.

Mukhina S, Liu D, Guo K, Raccurt M, Borges-Bendris S, Mertani HC, Lobie PE. Autocrine growth hormone prevents lacogenic differentiation of mouse mammary epithelial cells. *Endocrinology*. 2006;147:1819-1829.

Murphy L, Bell GI, Friesen HG. Growth hormone stimulates sequential induction of c-myc and insulin-like growth factor I in vivo. *Endocrinology*. 1987;120:1806-1812.

Onken M, Worley L, Ehlers J, Arbour JW. Genes expression profiling reveals two molecular classes and predict metastatic death. *Cancer Res*. 2004;64:7205–7209.

Perry JK, Esmerald BS, Mertani HC, Lobie PE. The oncogenic potential of growth hormone. *Growth hormone IGF Res*. 2006 Oct-Dec;16(5-6):277-289.

Prescher G, Bornfeld N, Hirche H, Horsthemke B, Jökel KH, Becher R. Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma. *Lancet*. 1996;347:1222-1225.

Sandinha M, Farquharson M, McKay I, Roberts F. Monosomy 3 predicts death but not time to death in choroidal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:1497–1501.

Schmidt-Pokrzywniak A, Jökel KH, Bornfeld N, Sauerwein W, Stang A. Positive interaction between light iris color and ultraviolet radiation in relation to the risk of uvea melanoma: a case-control study. *Ophthalmology*. 2009 Feb;116(2):340-8. Epub 2008 Dec 16.

Shields CL, Furuta M, Berman EL, Zahler JD, Hoberman DM, Dinh DH, et al. Choroidal nevus transformation into melanoma: analysis of 2514 consecutive cases. *Arch Ophthalmol*. 2009 Aug;127(8):981-7.

Singh AD, Topham A. Incidence of uveal melanoma in the United States:1973-1997. *Ophthalmology*. 2003;110(5):956-961.

Singh AD, Rennie IG, Seregard S, Giblin M, McKenzie. Sunlight exposure and pathogenesis of uveal melanoma. *Surv Ophthalmol*. 2004;49(4):419-428.

Singh AD, Bergman L, Seregard S. Uveal melanoma: epidemiologic aspects. *Ophthalmol Clin N Am*. 2005;18:75-84.

Sisley K, Rennie IG, Cottam DW, Potter AM, Potter CW, Rees RC. Cytogenetic findings in six posterior uveal melanomas: involvement of chromosomes 3, 6 and 8. *Genes Chromosomes Cancer*. 1990;2:205–209.

Sjogren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V, et al. Liver-derived insulin-like growth factor I(IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:7088-92.

Stracke H, Schulz A, Moeller D, Rossol S, Schatz H. Effect of growth hormone on osteoblasts and demonstration of somatomedina-CIGF-I in bone organ culture. *Acta Endocrinol*. 1984;107:16-24.

Tschentscher F, Prescher g, Horsman DE et al. Partial deletion of the long and short arm of chromosome 3 point to two tumor supressor genes in uveal melanoma. *Cancer Res*. 2001;61:3439-3442.

van den Eijnden MJ, Strous GJ. Autocrine growth hormone: effects on growth hormone receptor trafficking and signaling. *Mol Endocrinol*. 2007;21(11):2832-2846.

van Kerkhof P, Sachse M, Klumperman J, Strous GJ. Growth hormone receptor ubiquitination coincides with recruitment of clathrin-coated membrane domains. *J Biol Chem*. 2001;276:3778-3784.

Wang X, He K, Gerhart M, Huang Y, Jiang J, Paxton RJ, Yang S, Lu C, et al. Metalloprotease-mediated GH receptor proteolysis and GHBP shedding: determination of extracellular domain stem region cleavage site. *J Biol Chem*. 2002;277: 50510-50519.

Waters MJ, Conway-Campbell BL. The oncogenic potential of autocrine human growth hormone in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101: 14992-14993.

Waters MJ, Hoang HN, Fairlie DP, Pelekanos RA, Brown RJ. New insights into growth hormone action. *J Mol Endocrinol*. 2006;36:1-7.

Win PH, Robertson DM, Buettner H, McCannel CA, Bennett SR. Extended follow-up of small melanocytic choroidal tumors treated with transpupillary thermotherapy. *Arch Ophthalmol*. 2006;124(4):503-506.

Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, et al. Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest*. 2002;110:771-81.

Yamamoto A, Chervoneva I, Sullivan KL, Eschelmann DJ, Gonsalves CF, Mastrangelo MJ, et al. High-dose immunoembolization: survival benefit in patients with hepatic metastases from uveal melanoma. *Radiology*. 2009; 252(1):290-298.

Yang N, Langenheim JF, Wang X, Jiang J, Chen WY, Frank SJ. Activation of Growth Hormone Receptors by Growth Hormone and Growth Hormone Antagonist Dimers: Insights into Receptor Triggering. *Mol Endocr*. 2008;22(4):978-988.

Zhu T, Starling-Emerald B, Zhang X, Lee KO, Gluckman PD, Mertani HC, Lobie PE. Oncogenic transformation of human mammary epithelial cells by autocrine human growth hormone. *Cancer Research*. 2005;65:317-324.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a expressão de GHR em espécimens de melanomas uveais fixados em parafina.

Objetivos específicos

Correlacionar a expressão de GHR em espécimens de melanomas uveais com o tipo celular tumoral, presença de fatores histopatológicos de pior prognóstico como invasão escleral, presença de infiltração linfocitária e padrões vasculares intra-tumorais complexos. Adicionalmente, buscar a correlação entre a expressão do GHR, a sobrevida dos pacientes e a ocorrência de metástases.

ARTIGO REDIGIDO EM INGLÊS

The Expression of Growth Hormone Receptors in Uveal Melanoma

Fabiana Buffe, MD¹, Zélia Maria Corrêa, MD PhD², Ligia Maria Barbosa
Coutinho, MD PhD¹, and Carlos Oswaldo Degrazia, MD¹

¹Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto
Alegre, RS, Brazil

² University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, OH, USA

Conflict of Interests: None

Funding – Dr. Buffe is partly funded by the Post-Graduation Program, Universidade Federal de Ciências da Saúde, Porto Alegre, RS, Brazil. Dr. Corrêa is partly funded by an unrestricted Grant to the Department of Ophthalmology from Research to Prevent Blindness, Inc., New York, NY, (James Augsburger, M.D., Chairman); and Quest for Vision Fund of the University of Cincinnati, Cincinnati, OH.

Corresponding Author:

Zélia M. Corrêa

Department of Ophthalmology- University of Cincinnati

260 Stetson Street, Suite 5300 P.O. Box 670527 Cincinnati, OH 45267-
0527

Phone: (513) 558-0815 Fax: (513) 558-3108 Email: correazm@uc.edu

Abstract

Purpose: To report the expression of growth hormone receptors (GHR) in uveal melanoma specimens.

Methods: Retrospective review of paraffin embedded specimens of patients with uveal melanoma treated by enucleation at 2 institutions between 1999 and 2006. Specimens were stained initially with H&E to confirm the histopathologic diagnosis, cell type, and features such as vascular patterns, retinal and scleral invasion, and extra-ocular extension. Additional information regarding patient age, duration of follow-up, and detection of metastasis were computed. Non-stained sections were tested with immunohistochemical stain MAb 263 (Affinity BioReagents, Golden, CO, USA) to determine the presence of GHR in tumor cells. All microslides (H&E and immuno) were reviewed by 2 independent blinded investigators and graded by each as positive or negative for MAb 263. Discrepant results were discussed and outside review was used to resolve discordant cases.

Results: Forty-three paraffin embedded specimens were studied. Tumors were classified according to cell type into spindle B (n=15), mixed (n=15), epithelioid (n=12) and necrotic (n=1) cell types. The mean follow-up was 37.5 months. Through available follow-up, 72.1% of the patients were alive. Metastasis were detected in 18 patients (41.9%). Scleral and retinal invasion were observed in 44.2% and 51.2% of cases, respectively. Extraocular extension was identified in 18.6%. Thirty-eight of the 43 specimens (88.3%) exhibited positive immunoreactivity to Mab 263; among these, 19 were categorized as weakly positive, and the other 19 were categorized as strongly positive. Four cases were considered negative and one was excluded because extensive necrosis precluded a reliable reading. By univariate analysis, GHR expression was not

significantly associated with survival ($p=0.057$), although there is a trend suggesting that tumors with positive immunoexpression might be associated with poorer prognosis.

Conclusion: Growth hormone receptors were expressed by the majority of uveal melanoma specimens evaluated in this study. MAb 236 positivity may be prognostic of poor survival in uveal melanoma patients.

Keywords: Eye, Melanoma, Growth Hormone, Growth Hormone Receptor, Uvea, Choroidal Melanoma.

Introduction

During the recent years, efforts have been made to determine the metastatic cascade of uveal melanomas. The fact that these tumors have not shown a significant improvement in survival regardless of advances in diagnosis and local treatment has puzzled many researchers. Several clinical and histopathologic features of primary uveal melanomas have been associated with metastatic death, including increased patient age, increased tumor diameter and thickness, ciliary body involvement, epithelioid cytology, extraocular extension, extravascular matrix patterns, and lymphocytic infiltration^{1,2,3,4} all of which seem to have a limited ability to predict metastasis in an individual patients.⁵

It is known that GH exerts numerous biological functions in all organic systems, either directly or mediated by the insulin growth factors (IGF). The role of GH in the development of diverse types of malignancies has been widely discussed, and the presence of GH receptor (GHR) in a great variety of neoplastic cells, such as in cutaneous melanoma tumor and mammary tumor has been reported.^{6,7}

The expression of GHR in cutaneous melanomas has been reported^{6,7} suggesting that these cells are directly responsive to GH and that this hormone may stimulate local production of IGF-1. Subsequently, IGF-1 binds to the IGF receptor (IGF-1 R) that has shown to be crucial for tumor transformation, maintenance of malignant phenotype, and promotion of cell growth and prevention of apoptosis.⁸ A recent study of a limited number of primary uveal melanomas demonstrated a correlation between IGF-1 R that is mainly produced in the liver and melanoma-specific mortality.^{8,9}

Although it has been suggested that this correlation may indicate a potential pathway for uveal melanoma spread to the liver, the presence of GHR in uveal melanomas has not been reported until the date of preparation of this manuscript. The present study was designed to clarify the presence of GHR in paraffin embedded uveal melanoma specimens by testing the immunohistochemical expression of a mouse monoclonal antibody (MAb 263) that is directed against the hormone binding site of the extracellular portion of the receptor. The secondary aim is to verify a possible correlation between the expression of GHR and presence of metastasis, extraocular extension, tumor cell type, largest tumor dimension, and patient survival.

Methods

This study protocol was approved by the Human Ethics Committee of the first author's affiliating institution (an equivalent to Institutional Review Board - IRB), and the IRB of the University of Cincinnati, Ohio, USA.

The authors retrospectively reviewed the data of all patients with a diagnosis of primary uveal melanoma treated in two collaborating institutions between 1999 and 2007. Inclusion criteria were diagnosis of primary uveal melanoma, enucleation as form of treatment, histopathological confirmation of clinical diagnosis of melanoma, sufficient data available regarding clinical tumor features, and at least 24 months of follow-up.

The enucleated globes had been fixed in 10% neutral buffered formalin and paraffin embedded. Paraffin sections were in average 5 μm thick. Sections were subsequently deparaffinized in xylenes, rehydrated through a series of alcohols to water and stained with hematoxylin-eosin (HE), dehydrated through alcohols and xylenes, and cover slipped before being examined in light microscope.

The H&E stained microslides were evaluated by 2 independent blinded pathology trained physicians (ZMC and COD) to confirm the histopathological diagnosis of primary uveal melanoma and classified according to cell type in spindle cell type, mixed cell type, and epithelioid.

The immunohistochemistry was performed in the sections through dewaxing, rehydrating and rinsing in 0.1 M phosphate buffer with 0.9% sodium chloride (PBS). For antigen retrieval, sections were incubated in 0.01 M sodium citrate (pH=6) at 92°C for 30 minutes, then cooled to room temperature for 20 minutes. This was followed by blocking endogenous peroxidase activity with metanol 95 ml plus H₂O₂ 5 ml, 2 times, 10 minutes each. Inhibition of inespecific proteins were done with Bovin Serum Albumin (BSA), 1%, during 30 minutes. Then, the

incubation of primary antibody (Mouse monoclonal antibody MAb 263, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA) in a concentration of 1:250 was performed overnight at 4°C. Secondary and tertiary antibodies were incubated during 30 minutes in room temperature.

As negative control the same tissue was used and incubated with the same antibodies, except the primary one, which was substituted by BSA 1%. As positive control, normal hypophysis tissue was chosen.

The antigen-antibody binding was marked with diaminobenzidin chromogen (DAB). The counter coloration was performed with Harris hematoxylin.

The slides were dehydrated and covered with synthetic resin (Entellan).

The distribution and intensity of specific immunostaining for the GHR was graded in a blinded fashion by 2 independent pathology trained observers using a semi-quantitative scale: negative (no staining), weak/moderate (low intensity diffuse staining and/or up to 40% of the tumor presenting strong immunostaining) and strong (high intensity staining of more than 40% tumor cells). Discrepancies in grading were resolved by a joint review, and an outside observer evaluated persistently discordant cases.

A data collection protocol approved by the Ethics Committee was used to review clinical charts, and avoid patient identification. Pertinent information included epidemiological data such as age, sex, race, previous treatment, life status, and melanoma-related metastasis; clinical data such as visual acuity, tumor dimension, location; histopathological data such as cell type, retinal and/or scleral invasion, presence of vascular mimicry patterns, lymphocytic infiltration, and necrosis; and the immune expression of GHR.

Statistical analysis was performed using the SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 17.0 software version for Windows™, Chicago, IL, USA.

Numerical variables were evaluated by means of averages and pattern deviation, and were compared among the interest groups with Student's *t*-test for independent samples. Categorical variables were evaluated by means of absolute and relative frequencies, and contingency tables. When necessary, χ^2 test was used to assess statistical significance. Cumulative probabilities were calculated by Kaplan Meier survival curves. To compare survival outcomes associated to different variable, χ^2 and log-rank tests were used. To minimize confusing factors and evaluate risk factors related to survival, a Cox proportional regression analysis was performed. The criteria to include variables were that they would present a $p < 0.2$ in a multivariate analysis. To avoid confusion of risk factors, Hazards-ratios and confidence interval of 95% were used. The statistical significance level was established to be 5% ($p \leq 0,05$).

Results

Forty-three paraffin embedded specimens of 43 patients were included in this study. Thirty-nine patients had no other form of treatment prior to enucleation (90.7%). Four patients had been submitted to laser treatment before the enucleation. The majority of patients had tumors limited to the choroid (83.7%). Patients had a mean follow-up of 37.5 months. Through available follow-up, 72.1% of the patients were alive. Metastasis was detected in 18 patients (41.9%).

The figure 1 reveals a Kaplan-Meier curve evaluating the cumulative probability of uveal melanoma metastasis specific survival in the studied series.

Tumors were classified according to cell type into spindle B (n=15), mixed (n=15), epithelioid (n=12) and necrotic (n=1) cell types. The presence of scleral and retinal invasion was observed in 44.2% and 51.2% of cases, respectively. Extraocular extension was identified in 18.6%. Thirty-seven tumors (86.0%) exhibited vasculogenic mimicry patterns, and 36 tumors (83.7%) presented lymphocytic infiltration. Thirty-eight of the 43 specimens (88.3%) exhibited positive immunoreactivity to Mab 263; among these, 19 were categorized as weakly positive, and the other 19 were categorized as strongly positive. Four cases were considered negative and one was excluded because extensive necrosis precluded a reliable reading.

The table 1 (Table 1) represents the survival according to expression of GHR, tumor cell type, extraocular extension, presence of metastases and large tumor diameter. By univariate analysis, GHR expression was not significantly associated with survival ($p=0.058$), although there is a trend suggesting that tumors with positive immunoexpression might be associated with poorer prognosis.

Figure 2 reveals a Kaplan-Meier curve evaluating the cumulative probability of survival by dichotomous GHR expression (bold line represents patients with a strong expression of GHR, thinner line represents patients with mild or negative expression of GHR).

There was no statistically significant correlation between the expression of GHR and tumor cell type ($p = 0.82$), largest tumor dimension ($p = 0.19$), invasion of adjacent structures ($p = 0.33$), and detection of metastasis ($p = 0.24$).

Applying Cox regression only the presence of metastasis was significantly correlated with survival ($p=0.007$) (Table 2).

Discussion

The expression of GHR is related to various biological functions in various systems acting directly in the cell or mediated by the IGF-1⁶ promoting cell growth and differentiation, controlling metabolism and acting as a mitogen in various cell types.

In some tumor tissue, it is known that both GH and the expression of its receptor is abnormal. The increased concentration of GH has been reported in bone tumors, multiple myeloma, breast cancer, B-cell lymphoma and melanoma. Neoplastic cells in the lung are known to have more IGF-1 than the normal tissue¹⁰. The GH pathway works as a signaling pathway to promote growth and protect cells from apoptosis¹¹, both of them essential to the development and aggressiveness of cancer.

The GH receptor (GHR) has not been directly correlated to oncogenesis although it shares some protooncogenetic features¹⁰. It has also been demonstrated that the nuclear localization of the receptor is associated to its autocrine production, which may play a role in carcinogenesis.^{12,13}

Lincoln⁷ has demonstrated the presence of GHR in cutaneous melanoma cells and compared its expression to normal skin cells and concluding that the proportion and the intensity of immunoexpression of GHR was far more substantial in the melanoma cells suggesting their higher responsiveness to GH.

To the authors knowledge, there are no publications regarding the expression of GRH in uveal melanoma cells or in normal uveal cells. In this study, the expression of GHR in uveal melanoma specimens suggests that these cells are responsive to GH and it may play a role in the tumorigenesis of uveal

melanoma. This finding may be useful in the research of new adjuvant therapies since uveal melanomas do not respond well to conventional pharmacotherapy (including chemotherapy).

Still in the topic of survival, the survival curve using the Cox regression model and dicotomizing GHR expression in negative or positive (grouping weak and strong expression) (figure 2), it is possible to observe that tumors that expressed GHR had a worse survival. Although this finding was not statistically significant, it revealed a tendency that perhaps could be confirmed in a larger group of patients ($p=0,058$). The rarity of this tumor (uveal melanoma), considered in oncology to be an “orphan tumor” due to its low prevalence explains how hard it is to collect a significant number of cases for a statistical analysis of significance. Furthermore, although the correlation between the GHR expression (dicotomized) and the occurrence of metastasis was not statistically significant ($p=0,24$) and the difference in these curves not being as significant as seen using other testing methods such as gene expression profile¹⁴, this finding suggests that the presence of these receptors may be once again related to the role played by GH in tumor progression and even in the metastatic cascade of this tumor.

Other variables studied in this group of patients were cell type, tumor dimension, age of patient, retinal invasion, extra-ocular extension, lymphocytic infiltration, and the presence of complex vascular patterns. Such isolated findings were determinant of worse survival similar to what has been published in the literature.^{15,16,17}

Tumor size based on the largest linear tumor dimension (LTD) being this measurement the basal diameter or thickness of the studied tumor did not

present a statistically significant correlation with GHR expression although there was a clear tendency that could be proven significant if the sample size was larger ($p=0.08$).

Although both cell type (epithelioid) and GHR expression are related to worse survival, this correlation was not statistically significant for the different cell types ($p=0,82$).

The other variables had similar statistical behavior and were not significant.

Conclusion

In conclusion, the majority of uveal melanoma specimens evaluated in this study expressed GHR. MAb 236 positivity may be prognostic of poor survival in uveal melanoma patients. The size of this sample could be implicated in the insufficient statistical correlation between the GHR expression and survival, and further studies are necessary.

There was no statistically significant correlation between the expression of GHR and tumor cell type, largest tumor dimension, presence of metastasis and invasion of adjacent structures.

References

1. McLean IW, Foster WD, Zimmerman LE. Prognostic factors in small malignant melanomas of choroid and ciliary body. *Arch Ophthalmol* 1977;95:48-58.
2. Shamma HF, Blodi FC. Prognostic factors in choroidal and ciliary body melanomas. *Arch Ophthalmol* 1977;95:63-9.
3. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999;155:739-52.
4. de la Cruz PO, Jr., Specht CS, McLean IW. Lymphocytic infiltration in uveal malignant melanoma. *Cancer* 1990;65:112-5.
5. Chang SH, Worley LA, Onken MD, Harbour JW. Prognostic biomarkers in uveal melanoma: evidence for a stem cell-like phenotype associated with metastasis. *Melanoma Res* 2008;18:191-200.
6. Ginarte M, García-Caballero T, Fernández-Redondo V, Beiras A, Toribio J. Expression of growth hormone receptor in benign and malignant cutaneous proliferative entities. *J Cutan Pathol* 2000 Jul;27(6):276-82.
7. Lincoln DT, Sinowatz F, Kölle S, Takahashi H, Parsons P, Waters M. Up-regulation of growth hormone receptor immunoreactivity in human melanoma. *Anticancer Res* 1999 May-Jun;19(3A):1919-31.
8. Economou MA, All-Ericsson C, Bykov V, Girnita L, Bartolazzi A, Larsson O, Seregard S. Receptors for the liver synthesized growth factors IGF-1 and HGF/SF in uveal melanoma: intercorrelation and prognostic implications. *Acta Ophthalmol* 2008 Nov;86 Thesis 4:20-5.
9. All-Ericsson C, Girnita L, Seregard S, Bartolazzi A, Jager MJ, Larsson O. Insulin-like Growth Factor-1 receptor in uveal melanoma: a predictor for metastatic disease and a potential therapeutic target. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;(43)1:1-8.
10. Lincoln DT, Sinowatz F, Temmim-Baker L, Baker HI, Kölle S, Waters MJ. Growth hormone receptor expression in the nucleus and cytoplasm of normal and neoplastic cells. *Histochem Cell Biol* 1998;109(2):141-59.
11. van den Eijnden MJ, Strous GJ. Autocrine growth hormone: effects on growth hormone receptor trafficking and signaling. *Mol Endocrinol*. 2007;21(11):2832-2846.
12. Brooks AJ, Wooh JW, Tunny KA, Waters MJ. Growth hormone receptor: mechanism of action. *Intern J Biochem and Cell Biol*. 2008;40(10):1984-9. Epub 2007 Jul 25. Review.
13. Conway-Campbell BL, Wooh JW, Brooks AJ, Gordon D, Brown RJ, Lichanska AM et al. Nuclear targeting of the growth hormone receptor results in dysregulation of cell proliferation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(33):13331-13336.
14. Onken M, Worley L, Ehlers J, Harbour JW. Genes expression profiling reveals two molecular classes and predict metastatic death. *Cancer Res*. 2004;64:7205-7209.
15. McLean IW, Saraiva VS, Burnier MN Jr. Pathological and prognostic features of uveal melanomas. *Can J Ophthalmol* 2004;39(4):343-50

16. Damato B, Duke C, Coupland SE, Hiscott P, Smith PA, Campbell I, et al. Cytogenetics of uveal melanoma. A 7-year clinical experience. *Ophthalmol.* 2007;114:1925-1931.
17. Collaborative Ocular Melanoma Study Group. Histopathologic characteristics of uveal melanomas in eyes enucleated from the Collaborative Ocular Melanoma Study. COMS report no. 6. 1998. *Jun*;125(6):745-766.

Anexos

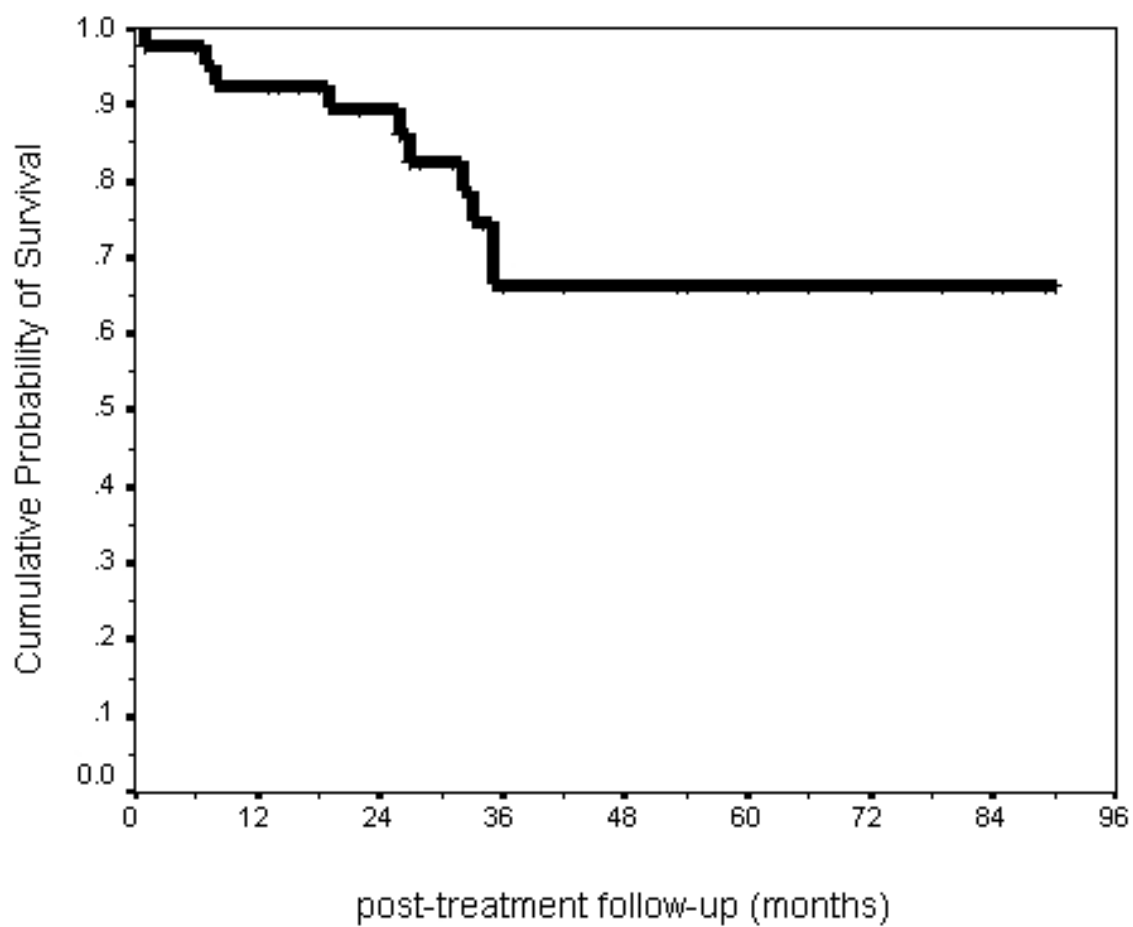


Figure 1. Survival curve of patients post-treatment.

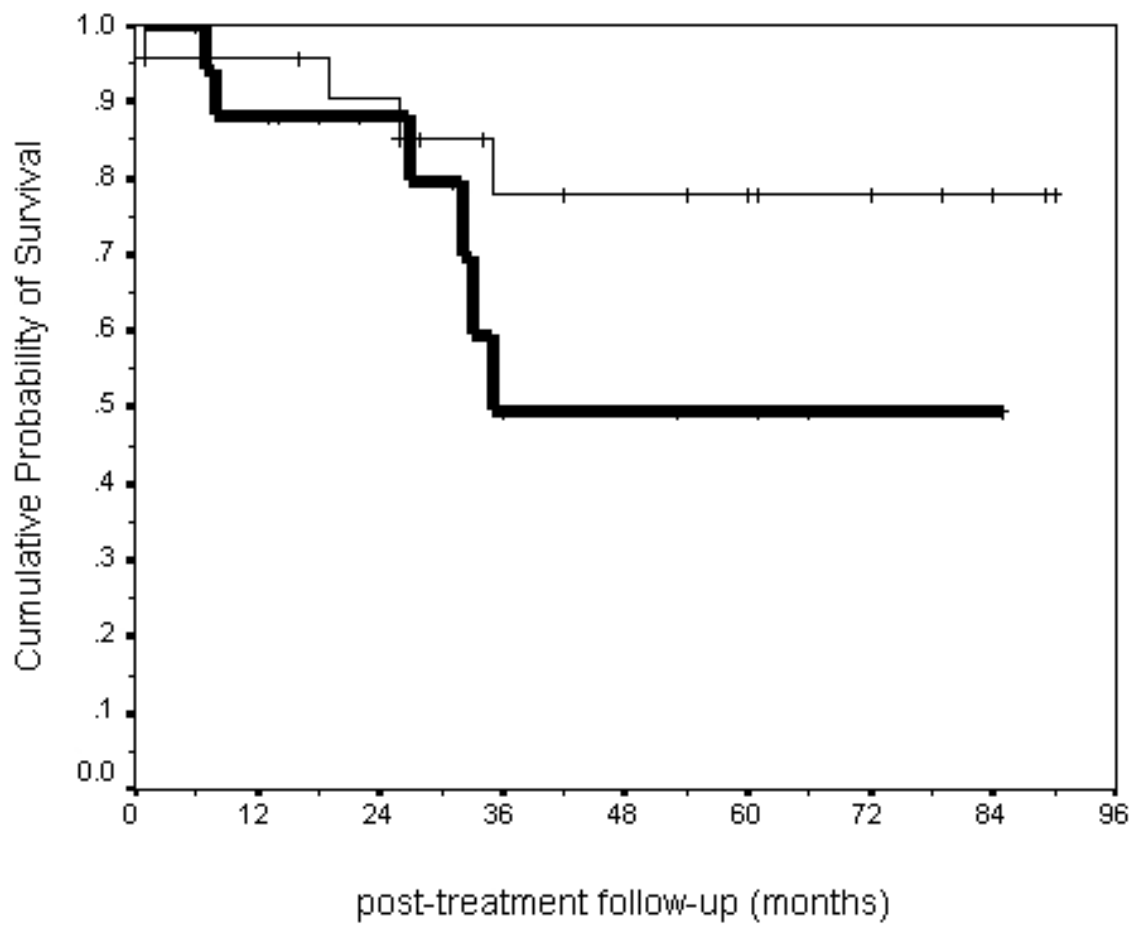


Figure 2. Cumulative probability of survival according to GHR expression. Bold line represents strong GHR immunoexpression and thinner line represents negative/weak expression.

Table 1 – Survival of the patients, with confidence interval of 95%, according to risk factors (Kaplan-Meier).

GHR expression (n=43)	Variáveis			
	No patients (Porcentagem)	CI 95%	HR (IC 95%)	p
Negative/weak	(75,1)	62,0 – 88,2	1,00	0,058
Strong	(49,7)	33,1 – 66,4	3,02 (0,91 – 10,1)	
Cell type				
Spindle B	(77,3)	61,2 – 93,3	1,00	0,106
Epitelioid/mixed	(57,2)	42,6 – 71,9	3,26 (0,71 – 14,9)	
Extraocular extension				
Present	(53,8)	27,7 – 79,8	1,81 (0,54 – 6,04)	0,327
Absent	(67,8)	55,1 – 80,6	1,00	
Metastases				
Present	(39,0)	25,1 – 52,9	8,55 (1,86 – 39,3)	0,001
Absent	(82,5)	72,7 – 92,4	1,00	
LTD (mm)				
Small	(77,9)	62,9 – 92,9	1,00	0,260
Medium	(63,2)	42,5 – 83,8	2,66 (0,49 – 14,6)	
Large	(51,9)	30,7 – 73,2	3,99 (0,80 – 19,8)	

CI 95%: confidence interval; HR: Hazard Ratio; LTD: large tumor diameter

Table 2 –Cox regression to evaluate factors associated with mortality.

GHR expression	Adjusted HR (CI 95%)	p
Negative/weak	1,00	0,188
Strong	2,40 (0,65 – 8,87)	
Cell type		
Spindle B	1,00	0,362
Epitelioid/mixed	2,08 (0,43 – 10,1)	
Metastases		
Present	8,53 (1,78 – 40,8)	0,007
Absent	1,00	
LTD (mm)		
Small	1,00	
Medium	4,19 (0,73 – 24,1)	0,109
Large	4,49 (0,88 – 22,8)	0,070

HR: Hazard Ratio adjusted to the sample, LTD: Large tumor diameter.

ARTIGO TRADUZIDO EM PORTUGUÊS

Expressão do Hormônio do Crescimento em Melanomas Uveais

Fabiana Buffe, MD¹, Zélia Maria Corrêa, MD PhD², Lúgia Maria Barbosa
Coutinho, MD PhD¹, and Carlos Oswaldo Degrazia, MD¹

¹Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto
Alegre, RS, Brazil

² University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, OH, USA

Conflito de interesse: nenhum

Fontes financiadoras – Dr Buffe é parcialmente financiada pelo Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal de Ciências da Saúde, Porto Alegre, RS, Brazil. Dr Correa é parcialmente financiada por um Grant to the Department of Ophthalmology from Research to Prevent Blindness, Inc., New York, NY, (James Augsburger, M.D., Chairman); and Quest for Vision Fund of the University of Cincinnati, Cincinnati, OH.

Endereço para correspondência:

Zélia M. Corrêa

Departamento de Oftalmologia- Universidade de Cincinnati

260 Stetson Street, Suite 5300 P.O. Box 670527 Cincinnati, OH 45267-
0527

Fone: (513)558-0815 Fax(513)558-3108

Email:correazm@uc.edu

Resumo

Objetivo: Avaliar a expressão dos receptores do hormônio do crescimento (GHR) em melanomas uveais.

Métodos: estudo retrospectivo de material obtido a partir de blocos de parafina de pacientes com melanoma uveal tratados cirurgicamente através de enucleação, entre o período de 1999 e 2006 em duas instituições. Inicialmente, as lâminas foram coradas com HE para confirmação do diagnóstico histopatológico, tipo celular e características como padrão vascular, presença de invasão retiniana ou escleral e extensão extra-ocular. Informações clínicas dos pacientes como idade, tempo de seguimento e presença de metástases foram obtidos a partir de análise de prontuários. Análise imuno-histoquímica foi realizada com o anticorpo MAb 263 (Affinity BioReagents, Golden, CO, USA) para avaliar a presença do GHR nas células tumorais. Todos os casos foram revisados por dois patologistas independentes e graduados como negativo, positivo fraco e positivo forte. Resultados discrepantes foram discutidos e um revisor externo foi chamado para resolver os casos discordantes.

Resultados: foram estudados quarenta e três espécimens tumorais. Os tumores foram classificados de acordo com o tipo celular em espinocelular B (n=15), mistos (n=15), epitelióide (n=12) e necrótico (n=1). O tempo médio de seguimento foi de 37,5 meses e 72,1% dos pacientes encontram-se vivos. Metástases foram detectadas em 18 pacientes (41,9%). Invasão retiniana e escleral foi observada em 44,2% e 51,2% dos casos, respectivamente. Extensão extra-ocular foi identificada em 18,6% dos casos. Trinta e oito dos 43 pacientes exibiram imunorreatividade positiva para o MAb 263; dentre estes 19 foram categorizados como fracamente positivos e 19 como fortemente positivos. Quatro casos foram considerados negativos e um foi excluído devido

à necrose extensa. Através de análise univariada, a expressão do GHR não foi significativamente associada com a sobrevida ($p=0,057$), apesar de se observar uma tendência que sugere que a imunoexpressão positiva possa estar associada a pior prognóstico.

Conclusão: Receptores do hormônio do crescimento foram observados na maioria dos casos de melanoma uveal avaliados neste estudo. A positividade em relação ao MAb 263 pode ser um fator de prognóstico desfavorável nestes pacientes.

Palavras-chave: melanoma, receptor do hormônio do crescimento, úvea, melanoma de coróide.

Introdução

Nos últimos anos, esforços vêm sendo realizados no sentido de determinar a cascata metastática dos melanomas uveais. A observação de que estes tumores não têm demonstrado melhor sobrevida apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento tem preocupado os pesquisadores. Muitas características clínicas e histopatológicas dos melanomas uveais primários incluindo idade avançada, aumento da espessura e diâmetro da lesão, envolvimento do corpo ciliar, tipo celular epitelióide, extensão extra-ocular, presença de padrões vasculares complexos e infiltração linfocitária têm sido associadas ao óbito por metástases.^{1,2,3,4} No entanto, todas têm capacidade limitada em predizer a ocorrência de metástases em cada paciente.⁵

Sabe-se que o hormônio do crescimento (GH) exerce várias funções biológicas em diversos sistemas, atuando diretamente ou através dos fatores de crescimento simuladores de insulina (IGF). O papel do GH no desenvolvimento de malignidades tem sido amplamente discutido e a presença do receptor do GH (GHR) tem sido demonstrada em diversas neoplasias como tumores cutâneos e de mama.^{6,7}

A expressão de GHR em melanomas de pele já foi relatada^{6,7} sugerindo que estas células são responsivas do GH e que este hormônio pode estimular a produção local de IGF-1. Subsequentemente, o IGF-1 se ligaria ao seu receptor (IGF-1R), etapa que se mostrou crucial na transformação tumoral, manutenção do fenótipo maligno, promoção do crescimento celular e prevenção da apoptose.⁸ Estudos recentes em um número limitado de pacientes com melanoma de coróide demonstram correlação entre IGF-1R e aumento da mortalidade específica por melanoma.^{8,9}

A presença do GHR em melanomas uveais não foi relatada até então, apesar da hipótese de que possa estar participando de uma possível via de disseminação do tumor até o fígado mereça ser estudada. Este estudo foi desenhado para determinar a presença do GHR em melanomas uveais armazenados em blocos de parafina através de teste imuno-histoquímico utilizando o anticorpo monoclonal MAb 263 dirigido contra a porção extracelular do receptor. O objetivo secundário é avaliar se há correlação entre a expressão do receptor do GH e o tipo celular, dimensão do tumor, presença de metástases, extensão extra-ocular e sobrevida.

Métodos

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFCSPA e pelo IRB (Institutional Review Board) da Universidade de Cincinnati, Ohio, USA.

Os autores analisaram retrospectivamente os dados dos pacientes com o diagnóstico de melanoma uveal primário tratados nas duas instituições colaboradoras entre 1999 e 2006. Os critérios de inclusão foram o diagnóstico de melanoma uveal primário submetido à enucleação como tratamento principal, com diagnóstico histopatológico confirmado de melanoma e que apresentavam dados clínicos suficientes registrados em prontuário. O tempo mínimo de seguimento exigido foi de 24 meses.

Os globos oculares enucleados foram fixados em formalina tamponada a 10% e embebidos em parafina. As lâminas foram confeccionadas com cortes de 5 µm de espessura que, após terem sido desparafinizados em xilenos, foram reidratados em uma série de soluções alcoólicas até água. Subsequentemente, foram coradas com hematoxilina-eosina (HE), desidratadas em uma sequência de alcoóis e xilenos, cobertos com lamínula e submetidos à avaliação em microscópio de luz. Todos os casos foram avaliados por dois patologistas independentes (ZMC e COD) com treinamento em patologia ocular para confirmar o diagnóstico histológico dos espécimens de melanoma uveal, classificando-os em espinocelular B, misto ou epitelióide.

A imuno-histoquímica foi realizada através da desparafinização dos cortes, reidratação e lavagem em solução de fosfato tamponado a 0.1M com cloreto de sódio 0,9% (PBS).

Para recuperação do antígeno, os cortes foram incubados em solução de citrato de sódio 0,01M (pH =6) a 92°C por 30 minutos; após, foram resfriadas à temperatura ambiente por 20 minutos. Seguiu-se com o bloqueio da peroxidase

endógena com metanol 95ml + H₂O₂ 5ml. O bloqueio das proteínas inespecíficas foi realizado com Albumina Bovina Fração V (BSA) a 1% por 30 minutos. A partir de então, a incubação do anticorpo primário (anticorpo monoclonal MAb263, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA), em diluição de 1:250, foi realizada durante uma noite em geladeira a 4°C. A incubação com os anticorpos secundário e terciário foi realizada à temperatura ambiente por 30 minutos. Como controle negativo foi utilizado o mesmo tecido, incubado com os mesmos anticorpos, exceto o anticorpo primário que foi substituído por BSA a 1%. Como controle positivo foi utilizada hipófise normal.

A ligação do antígeno-anticorpo foi visibilizada com o cromógeno diaminobenzeno (DAB). A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris e as lâminas foram desidratadas e montadas com resina sintética (Entellan).

A distribuição e intensidade da impregnação do anticorpo no GHR foi graduada por dois patologistas independentes, cegos, usando uma escala semi-quantitativa em que os casos foram classificados como negativos quando não havia impregnação pelo anticorpo; positivos fracos quando havia impregnação de até 40% das células e positivos forte quando mais de 40% das células sofriam impregnação. Discrepâncias nesta graduação foram resolvidas por um observador externo.

Um protocolo de coleta de dados clínicos dos pacientes a partir da revisão de prontuários foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa. Informações como idade, sexo, raça, tratamento prévio, sobrevida, presença de metástases, acuidade visual, localização e dimensão tumoral foram obtidos.

Dados histopatológicos relacionados ao tipo celular tumoral, invasão escleral ou retiniana, extensão extra-escleral, presença de padrões vasculares

complexos, infiltração linfocitária e imunoexpressão do GHR foram obtidos pelos pesquisadores no estudo das lâminas.

Análise estatística foi realizada utilizando-se o software SPSS (Pacote Estatístico para Ciências Sociais) versão 17.0 para WindowsTM, Chicago, IL, USA. Variáveis numéricas foram analisadas e descritas através da média e desvio-padrão e comparadas entre os grupos de interesse através do teste t de Student para amostras independentes. Variáveis categóricas foram avaliadas através da freqüências absolutas e relativas e tabelas de contingência. Quando necessário, o teste do χ^2 foi utilizado para avaliar significado estatístico. Probabilidades cumulativas foram calculadas pelo método de Kaplan Méier em curvas de sobrevida. Para calcular a associação entre a sobrevida associada à diferentes variáveis os teste de χ^2 e log-rank foram utilizados. Para minimizar os viéses de confusão e avaliar os fatores relacionados à sobrevida a regressão proporcional de Cox foi aplicada. O critério para incluir variáveis foi o de que apresentassem $p < 0,2$ na análise multivariada.

Para evitar fatores de confusão, intervalos de confiança de 95% e Hazards-ratio foram usados. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p \leq 0,05$).

Resultados

Quarenta e três espécimens de 43 pacientes foram incluídos no estudo. Trinta e nove pacientes não apresentavam tratamento prévio à enucleação (90,7%) e quatro pacientes haviam sido submetidos a tratamento prévio do tumor com laser. A maioria dos pacientes apresentava tumor limitado à coróide (83,7%). Os pacientes tinham um tempo médio de seguimento de 37,5 meses. Na conclusão do estudo, 72,1% encontravam-se vivos. Metástases foram detectadas em 18 pacientes (41,9%).

O gráfico (figura 1) revela através da curva de Kaplan Meier a probabilidade cumulativa de sobrevida relacionada às metástases por melanoma de coróide. Os tumores foram classificados de acordo com o tipo celular em espinocelular B em 15 casos, misto em 15 casos, epitelióide em 12 e um caso apresentou-se extensamente necrótico inviabilizando a análise histológica.

A presença de invasão escleral ou retiniana foi vista em 44,2% e 51,2% dos casos, respectivamente. Extensão extra-ocular foi identificada em 18,6% dos pacientes. Trinta e sete tumores (86%) exibiam padrões vasculares complexos e 36 tumores (83,7%) apresentavam infiltração linfocitária.

Trinta e oito dos 43 espécimens (88,3%) exibiram imunorreatividade positiva ao MAb 263; dentre estes, 19 foram classificados como positivos fracos e 19 como positivos fortes. Quatro casos foram considerados negativos e um foi excluído devido à necrose extensa que impediu a leitura confiável da lâmina.

A Tabela 1 (tabela 1) ilustra a sobrevida dos pacientes com relação à expressão do GHR, tipo celular, extensão extra-ocular, presença de metástase e maior diâmetro tumoral.

Através de análise univariada, a expressão do GHR não se correlacionou significativamente à sobrevida ($p=0,058$), apesar de se observar uma tendência

que sugere que a imunoeexpressão positiva possa estar relacionada a pior prognóstico.

A figura 2 representa a curva de Kaplan Méier estimando a curva de sobrevida relacionada à expressão dicotomizada do GHR (a linha tênue representa pacientes com expressão fraca ou negativa e a linha espessa representa o grupo de pacientes que foi classificado como fortemente positivo).

Não houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão do GHR e o tipo celular do tumor ($p=0,82$), maior dimensão tumoral ($p=0,19$), invasão de estruturas adjacentes ($p=0,33$) e detecção de metástases ($p=0,24$).

Aplicando-se a regressão de Cox, conclui-se que somente a presença ou ausência de metástase foi a variável estatisticamente significativa na associação com óbito, com $p=0,007$ (Tabela 2).

Discussão

A expressão do GHR está associada a inúmeras funções biológicas em vários sistemas atuando diretamente na célula ou, quando mediado pelo IGF-1⁶, promovendo crescimento e diferenciação celular, controlando metabolismo e atuando como mitógeno para diversos tipos celulares.

Em alguns tecidos tumorais, sabe-se que tanto o GH como a expressão de seu receptor estão alterados. Aumento da concentração de GH foi relatada em tumores ósseos, mieloma múltiplo, carcinoma mamário, linfomas B e melanoma; células neoplásicas pulmonares contêm mais IGF-1 do que o tecido normal¹⁰. Para células tumorais, rotas sinalizadoras como por exemplo a do GH promovem crescimento celular e proteção contra apoptose¹¹, ambos essenciais no desenvolvimento agressivo observado nas neoplasias.

O receptor do GH ainda não foi diretamente correlacionado à oncogênese, apesar de compartilhar algumas características com proto-oncogenes¹⁰. Também já foi demonstrado que a localização nuclear do receptor associada à produção autócrina de GH sejam características que influenciam na carcinogênese.^{12,13}

Em melanomas cutâneos, Lincoln e cols⁷ demonstraram a presença do receptor do GH comparando sua expressão com células cutâneas normais obtendo a informação de que a proporção de células e intensidade da imunoexpressão do GHR foi maior em células de melanoma, sugerindo que estas células sejam responsivas ao GH. Este, por sua vez, tendo atividade proliferativa em diferentes tecidos, poderia desempenhar algum papel no desenvolvimento da neoplasia .

Ao conhecimento dos autores, não há dados na literatura acerca da expressão do GRH em células tumorais de melanomas uveais, tampouco em células uveais normais. Neste estudo, observou-se que há expressão do GHR em espécimens de melanoma uveal sugerindo que estas células sejam responsivas ao GH e postula-se que este possa desempenhar um papel na patogênese tumoral dos melanomas uveais. Este achado pode ser útil quando se pesquisa possíveis terapias adjuvantes uma vez que o melanoma uveal não responde bem ao uso de fármacos (incluindo quimioterápicos).

Ainda considerando a sobrevida, a curva de sobrevida usando o modelo de regressão de Cox e dicotomizando a expressão do GHR em negativo ou expressão fraca versus expressão forte (figura 2), observou-se que os tumores cuja expressão de GHR foi considerada forte, tiveram uma pior sobrevida. Esse achado, apesar de não ser estatisticamente significativo, certamente revelou uma tendência que deve ser considerada ($p=0,058$) sob a perspectiva do pequeno tamanho da amostra que limita os achados estatísticos descritos. O fato da raridade desse tumor (melanoma uveal), considerado pela oncologia como um “tumor órfão” devido a sua baixa prevalência, explica a dificuldade encontrada em arrecadar uma casuística mais expressiva. Na seqüência, apesar da correlação entre a expressão do GHR dicotomizada e a ocorrência de metástases não ter sido estatisticamente significativa ($p=0,24$) e a diferença entre essas curvas não ser tão expressivo quanto ao observado com outros testes (por exemplo: perfil de expressão gênica)¹⁴, esse achado sugere que a presença de tais receptores pode estar relacionada com o papel do GH na progressão tumoral e mesmo na capacidade metastática do tumor.

Outras variáveis estudadas nesse grupo de pacientes foram o tipo celular tumoral, dimensão tumoral, idade do paciente, invasão retiniana, extensão extra-ocular, infiltração linfocitária e presença de padrões vasculares intra-tumorais complexos. Tais achados isolados foram determinantes de melhor ou pior sobrevida semelhante ao que está documentado na literatura.^{15,16,17}

O tamanho tumoral determinado pela medida de maior dimensão linear tumoral (LTD) seja esta espessura ou diâmetro dos tumores estudados, também não apresentou uma correlação estatisticamente significativa com a expressão do GHR apesar de ter sido observada uma tendência que possivelmente poderia se tornar estatisticamente significativa se a amostra fosse maior ($p=0.082$).

Apesar de ambas as características tipo celular epitelioide e expressão do GHR estarem relacionados com pior sobrevida, não foi possível observar uma diferença significativa de expressão do GHR entre os diferentes tipos celulares ($p=0,82$).

As demais variáveis apresentaram comportamento estatístico semelhante e não apresentaram correlação estatística.

Conclusão

A expressão do GHR foi detectada na maioria dos tumores avaliados neste estudo. A positividade para o anticorpo MAb 263 pode ser um marcador de pior prognóstico em relação à sobrevida destes pacientes. Mesmo não tendo sido estatisticamente significativa esta correlação, o presente estudo incita a investigação deste achado em uma amostra maior de pacientes. O fato de haver uma tendência a esta associação sugere que o GHR pode ser mais uma ferramenta importante na avaliação dos pacientes quanto à evolução da doença.

Em relação ao tipo celular do tumor, dimensão tumoral, presença de metástases e invasão de estruturas adjacentes não houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão do GHR e estas variáveis.

Referências bibliográficas

1. McLean IW, Foster WD, Zimmerman LE. Prognostic factors in small malignant melanomas of choroid and ciliary body. *Arch Ophthalmol* 1977;95:48-58.
2. Shammas HF, Blodi FC. Prognostic factors in choroidal and ciliary body melanomas. *Arch Ophthalmol* 1977;95:63-9.
3. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999;155:739-52.
4. de la Cruz PO, Jr., Specht CS, McLean IW. Lymphocytic infiltration in uveal malignant melanoma. *Cancer* 1990;65:112-5.
5. Chang SH, Worley LA, Onken MD, Harbour JW. Prognostic biomarkers in uveal melanoma: evidence for a stem cell-like phenotype associated with metastasis. *Melanoma Res* 2008;18:191-200.
6. Ginarte M, García-Caballero T, Fernández-Redondo V, Beiras A, Toribio J. Expression of growth hormone receptor in benign and malignant cutaneous proliferative entities. *J Cutan Pathol* 2000 Jul;27(6):276-82.
7. Lincoln DT, Sinowatz F, Kölle S, Takahashi H, Parsons P, Waters M. Up-regulation of growth hormone receptor immunoreactivity in human melanoma. *Anticancer Res* 1999 May-Jun;19(3A):1919-31.
8. Economou MA, All-Ericsson C, Bykov V, Girnita L, Bartolazzi A, Larsson O, Seregard S. Receptors for the liver synthesized growth factors IGF-1 and HGF/SF in uveal melanoma: intercorrelation and prognostic implications. *Acta Ophthalmol* 2008 Nov;86 Thesis 4:20-5.
9. All-Ericsson C, Girnita L, Seregard S, Bartolazzi A, Jager MJ, Larsson O. Insulin-like Growth Factor-1 receptor in uveal melanoma: a predictor for metastatic disease and a potential therapeutic target. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;(43)1:1-8.
10. Lincoln DT, Sinowatz F, Temmim-Baker L, Baker HI, Kölle S, Waters MJ. Growth hormone receptor expression in the nucleus and cytoplasm of normal and neoplastic cells. *Histochem Cell Biol* 1998;109(2):141-59.
11. van den Eijnden MJ, Strous GJ. Autocrine growth hormone: effects on growth hormone receptor trafficking and signaling. *Mol Endocrinol*. 2007;21(11):2832-2846.
12. Brooks AJ, Wooh JW, Tunny KA, Waters MJ. Growth hormone receptor: mechanism of action. *Intern J Biochem and Cell Biol*. 2008;40(10):1984-9. Epub 2007 Jul 25. Review.
13. Conway-Campbell BL, Wooh JW, Brooks AJ, Gordon D, Brown RJ, Lichanska AM et al. Nuclear targeting of the growth hormone receptor results in dysregulation of cell proliferation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(33):13331-13336.
14. Onken M, Worley L, Ehlers J, Harbour JW. Genes expression profiling reveals two molecular classes and predict metastatic death. *Cancer Res*. 2004;64:7205-7209.
15. McLean IW, Saraiva VS, Burnier MN Jr. Pathological and prognostic features of uveal melanomas. *Can J Ophthalmol* 2004;39(4):343-50

16. Damato B, Duke C, Coupland SE, Hiscott P, Smith PA, Campbell I, et al. Cytogenetics of uveal melanoma. A 7-year clinical experience. *Ophthalmol.* 2007;114:1925-1931.
17. Collaborative Ocular Melanoma Study Group. Histopathologic characteristics of uveal melanomas in eyes enucleated from the Collaborative Ocular Melanoma Study. COMS report no. 6. 1998. *Jun*;125(6):745-766.

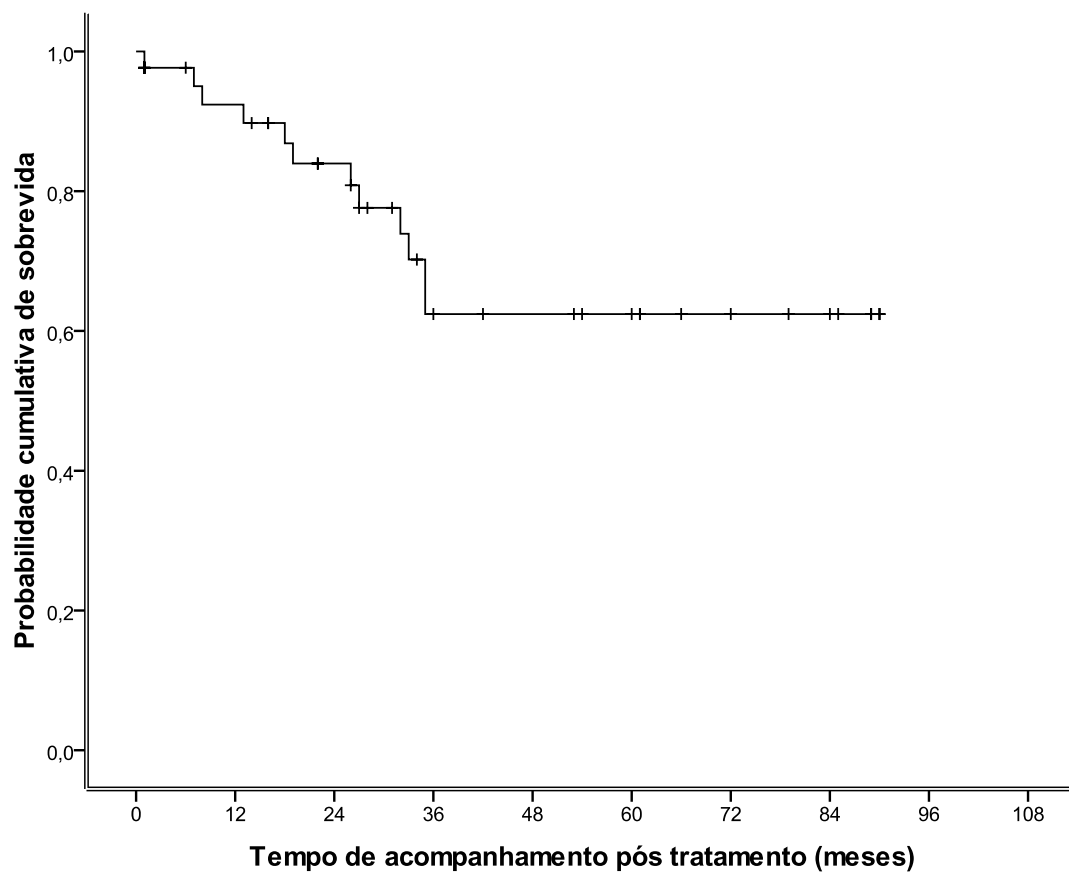


Figura 1 – Curva de sobrevivida dos pacientes estudados.

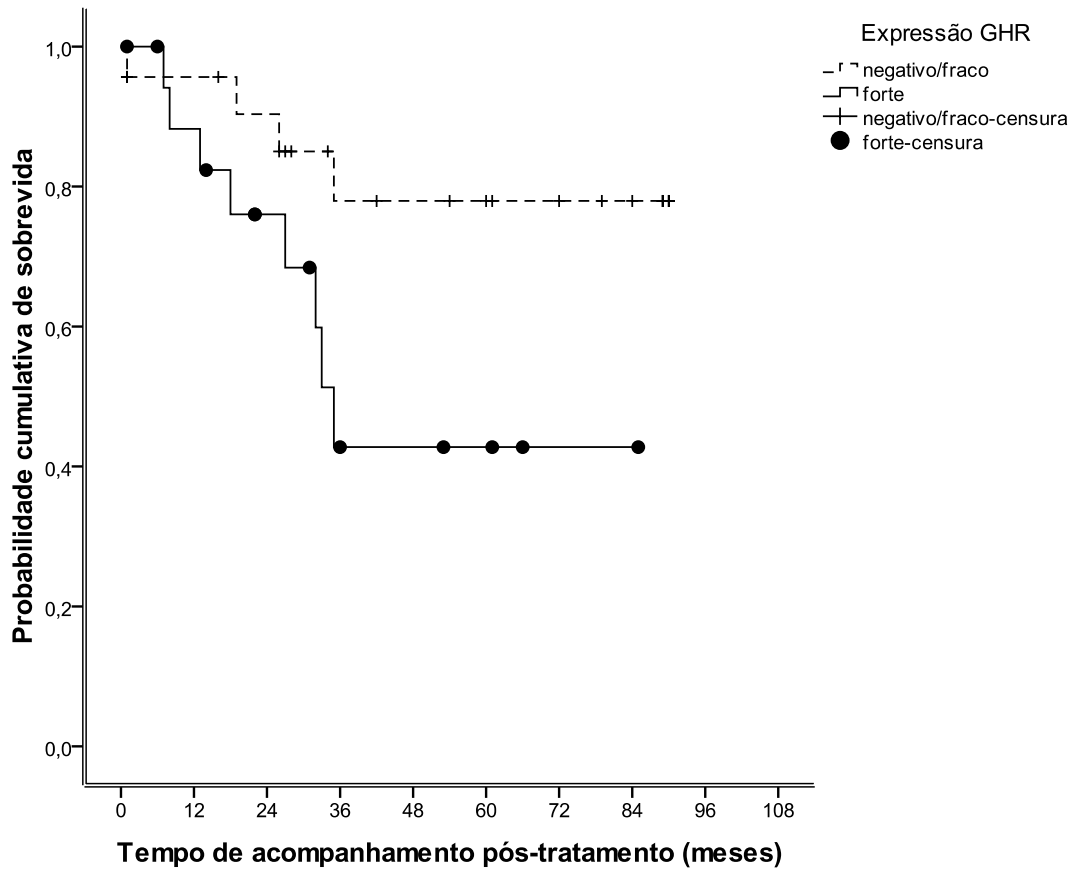


Figura 2 – Curva de probabilidade cumulativa de sobrevida segundo a expressão GHR.

Tabela 1 – Tempo de sobrevida, com intervalo de 95% de confiança, na amostra total e por fatores de risco através do método de Kaplan-Meier.

Expressão GHR (n=43)	Variáveis			
	Nº pacientes (Porcentagem)	IC 95%	HR (IC 95%)	p
Negativo/fraco	(75,1)	62,0 – 88,2	1,00	0,058
Forte	(49,7)	33,1 – 66,4	3,02 (0,91 – 10,1)	
Tipo de célula				
Fusiforme	(77,3)	61,2 – 93,3	1,00	0,106
Epitelióide/misto	(57,2)	42,6 – 71,9	3,26 (0,71 - 14,9)	
Extensão extra-ocular				
Presente	(53,8)	27,7 – 79,8	1,81 (0,54 – 6,04)	0,327
Ausente	(67,8)	55,1 – 80,6	1,00	
Metástase				
Presente	(39,0)	25,1 – 52,9	8,55 (1,86 – 39,3)	0,001
Ausente	(82,5)	72,7 – 92,4	1,00	
LTD (mm)				
Pequenos	(77,9)	62,9 – 92,9	1,00	0,260
Médios	(63,2)	42,5 – 83,8	2,66 (0,49 – 14,6)	
Grandes	(51,9)	30,7 – 73,2	3,99 (0,80 – 19,8)	

Legenda: IC 95% intervalo de confiança; HR Hazard Ratio; LTD maior diâmetro tumoral

Tabela 2 – Regressão de Cox para avaliar fatores associados com o óbito

Expressão GHR	HR ajustado (IC 95%)	p
Negativo/fraco	1,00	0,188
Forte	2,40 (0,65 – 8,87)	
Tipo de célula		
Fusifforme	1,00	0,362
Epitelióide/misto	2,08 (0,43 – 10,1)	
Metástases		
Presente	8,53 (1,78 – 40,8)	0,007
Ausente	1,00	
LTD (mm)		
Pequenos	1,00	
Médios	4,19 (0,73 – 24,1)	0,109
Grandes	4,49 (0,88 – 22,8)	0,070

Legendas: HR- razão de chances ajustado para a amostra; LTD- maior diâmetro tumoral

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A expressão positiva do GHR em espécimens de melanoma uveal está relacionada com pior prognóstico de sobrevida nesse grupo de pacientes e pode ser mais um dado no entendimento do processo metastático desses tumores. Uma maior amostra de pacientes seria necessária para corroborar esses achados e correlacionar a presença do GHR com outras variáveis clínicas preditivas de pior prognóstico e sobrevida.

A expressão de GHR não mostrou correlação estatisticamente significativa com as variáveis: tipo celular tumoral, dimensão tumoral, idade do paciente, invasão retiniana, extensão extra-ocular, infiltração linfocitária e presença de padrões vasculares intra-tumorais complexos.

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Expressão do Receptor do Hormônio do Crescimento em Melanomas de Coróide

Pesquisador Responsável Ligia Maria Barbosa Coutinho

Data da Versão 07/04/2008

Cadastro 371/08

Data do Parecer 11/03/2010

Grupo e Área Temática Classificação utilizada pela CONEP

Objetivos do Projeto

Avaliar a presença do receptor do hormônio do crescimento em melanomas da coróide, associando ao tipo histológico e tamanho do tumor.

Sumário do Projeto

O presente estudo visa avaliar a presença do receptor do hormônio do crescimento em melanomas da coróide, associando ao tipo histológico e tamanho do tumor de pacientes que frequentaram o serviço de oftalmologia da Santa Casa e se submeteram ao processo de enucleação no período de 2001 a 2007. O estudo será feito a partir de blocos de parafina e pela técnica de imunohistoquímica.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Sim
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação
Serviço de oftalmologia da Santa Casa e Laboratório de patologia da Santa Casa.

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
-----------	-----------

Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total Local
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção eqüitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Crítérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Não apresentada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - qualitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Comentário
Adequação às Normas e Diretrizes	Não

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos
 Quanto ao termo de Consentimento, deve-se acrescentar o telefone de contato do pesquisador. Ver modelo em:
http://www.ufcspa.edu.br/pesquisa/cep/pesq_hum_material.php

Cronograma	Comentário
Data de início prevista	
Data de término prevista	
Orçamento	Adequado
Fonte de financiamento externa	Não

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento

Referências Bibliográficas	Adequadas

Comentários sobre as Referências Bibliográficas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

*Adequar o TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) com o telefone de contato (do pesquisador e do CEP).

*Em reunião do Comitê de ética do dia 11/03 foi aprovado a inclusão da pesquisadora Zélia Maria da Silva Corrêa e foi autorizado o uso do banco de dados do Serviço de Oncologia da Universidade de Cincinnati, conforme declaração em anexo do próprio hospital.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)