

ANÁLISES DOS NÍVEIS SOLÚVEIS DE PD-1 E PD-L1 NO MELANOMA CUTÂNEO

ANALYSIS OF THE SOLUBLE LEVELS OF PD-1 AND PD-L1 IN CUTANEOUS MELANOMA

Vitória Ferreira David Melquíades^{1,3}; Maria Eduarda Borges Kerstenetzky^{1,3}; Amanda Forte Mendes Tejo Salgado^{1,3}; Vinícius Rafael Agostinho Gomes^{1,3}; Kleber das Neves Jatahy^{1,2}; Marina Cadena da Matta, PhD^{1,2}; Rogerio Luiz dos Santos^{1,4}; Leuridan Cavalcante Torres, PhD^{1,2,4}.

¹ Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP)

² Laboratório de Pesquisa Translacional Prof CA Hart, IMIP,

³ Faculdade Pernambucana de Saúde (FPS)

⁴ Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP)

Reconhecimento de apoio ao estudo: CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, através do Programa Iniciação Científica do IMIP referente ao processo seletivo do Edital PIBITI/2018.

Autor correspondente: Vitória Ferreira David Melquíades

Telefone pessoal: (81) 99990-2150

E-mail: vitoriaa.ferreira@hotmail.com

Os autores negam quaisquer conflitos de interesse no desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

Objetivo: analisar os níveis solúveis de *programmed death receptor-1* (sPD-1) e do ligante de PD1 (PDL1) em pacientes com melanoma cutâneo. **Métodos:** Entre 2018 e 2019, foi realizado um corte transversal, exploratório e translacional no Hospital de câncer de Pernambuco (HCP) e no Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP). Foram avaliados 51 pacientes maiores de 18 anos com diagnóstico confirmado de melanoma cutâneo. Como grupo controle foram incluídos 15 indivíduos saudáveis (> 18 anos) e sem história familiar de câncer de pele. A concentração sérica de sPD1 e sPDL1 (pg/mL) foi determinada por ensaio imunoenzimático. Teste não paramétrico de Mann-Whitney foram utilizados para comparação entre dois grupos. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. As análises foram realizadas no programa Graphpad v7.0. **Resultados:** A média de idade dos pacientes foi de 57,6 anos ($\pm 14,3$). A maioria dos pacientes foi de cor branca (72,5%) e do sexo feminino (62,7%). Foram 43,2% dos pacientes que apresentaram índice de Breslow > 2 mm. A maioria dos pacientes apresentou metástase linfonodal (51%) e estádios III-IV (52,9%). Nas análises dos níveis solúveis de sPD-1 e sPD-L1 foi observado que os pacientes apresentaram níveis diminuídos quando comparado aos controles ($p=0,02$ e $p=0,003$ respectivamente). Os pacientes com os estádios I e II apresentavam níveis diminuídos de sPD-1 e sPD-L1 quando comparados aos pacientes com estadio III e IV ($p=0,004$ e $p=0,005$, respectivamente). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de sPD-1 e sPD-L1 entre os grupos de pacientes LN+ e LN-; e espessura de Breslow ≤ 2 mm ou > 2 mm. **Conclusão:** Com base nos resultados encontrados, conclui-se que formas solúveis das moléculas sPD-1 e sPD-L1 são elevadas em pacientes com doença avançada. Essas moléculas podem ser consideradas possíveis biomarcadores de prognóstico no melanoma cutâneo. Novos estudos que avaliem as formas solúveis de sPD-1 e sPD-L1 no câncer são necessários, bem como a expressão dessas moléculas na membrana de células do sistema imune e nas células tumorais, uma vez que existem grandes possibilidades de tratamentos, já que existem drogas que bloqueiam essas moléculas em uso no Brasil.

Palavras-chave: câncer, melanoma, sPD-1, sPD-L1, imunidade.

ABSTRACT

Objective: To analyze the soluble levels of programmed death receptor-1 sPD-1 and PD1 ligand (PDL1) in cutaneous melanoma patients. **Methods:** Between 2018 and 2019, a cross-sectional, exploratory and translational study was performed at the Pernambuco Cancer Hospital (HCP) and at the Professor Fernando Figueira Institute of Integral Medicine (IMIP) Translational Research Laboratory. Fifty-one patients older than 18 years with a confirmed diagnosis of cutaneous melanoma were evaluated. The control group included 15 healthy individuals (> 18 years) with no family history of skin cancer. Serum concentration of sPD1 and sPDL1 (pg / mL) was determined by enzyme immunoassay. Nonparametric Mann-Whitney test were used for comparison between two groups. Values of $p < 0.05$ were considered significant. Analyzes were performed using Graphpad v7.0 software. **Results:** Fifty-one patients with cutaneous melanoma with a mean age of 57.6 years (± 14.3) were evaluated. Most patients were white (72.5%) and female (62.7%). Regarding the location of the primary lesion, there was a predominance of melanomas in the lower limbs (54.9%), followed by melanomas located in the trunk (31.4%) and upper limbs (13.7%). There were 43.2% of patients with Breslow index > 2 mm, 58.8% with ulcerated lesions, 70.5% with mitotic index ≥ 1 mitosis / mm². Most patients had lymph node metastasis (51%) in stages III-IV (52.9%). In the analysis of soluble levels of sPD-1 and sPD-L1, it was observed that patients had decreased levels when compared to controls ($p = 0.02$ and $p = 0.003$ respectively). Patients with stages I and II had decreased levels of sPD-1. 1 and sPD-L1 when compared to patients with stage III and IV ($p = 0.004$ and $p = 0.005$, respectively). No significant differences in sPD-1 and sPD-L1 levels were observed between the LN + and LN -; and Breslow thickness ≤ 2 mm or > 2 mm. **Conclusion:** Based on the results found, it can be concluded that soluble forms of sPD-1 and sPD-L1 molecules are elevated in patients with advanced disease. These molecules can be considered possible prognostic biomarkers in cutaneous melanoma. Further studies evaluating the soluble forms of sPD-1 and sPD-L1 in cancer are needed, as well as the expression of these molecules in the immune cell membrane and tumor cells, as there are great possibilities for treatment, as there are many possibilities for treatment. drugs that block these molecules in use in Brazil.

Keywords: cancer, melanoma, sPD1, sPD-L1, immunity.

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias melanocíticas variam de lesões benignas, denominadas nevus (naevus) melanocíticos, para malignas, denominadas melanomas^{1,2}. O melanoma cutâneo é uma das formas mais agressivas de câncer de pele e uma das principais causas de mortalidade por câncer devido ao elevado risco de metástases³.

Os melanócitos representam uma população celular minoritária dentro da epiderme basilar. Sua principal função é fornecer um pigmento, chamado de melanina, aos queratinócitos^{1,2,3}. A melanina é uma macromolécula complexa que dispersa e absorve a radiação ultravioleta (UV) solar, e os queratinócitos da epiderme a utilizam para proteger seu núcleo dos danos ao DNA induzidos pela radiação UV⁴. A radiação UV é o principal fator de risco ambiental para o desenvolvimento do melanoma cutâneo^{5,6}.

O melanoma cutâneo é frequentemente associado a uma lesão pigmentada de bordos irregulares, contudo, essas características podem não estar presentes nas lesões precoces. Para essas lesões, a suspeita do diagnóstico pode ser decorrente de modificação de lesões pigmentadas existentes ou do aparecimento de novas lesões. A biópsia de uma lesão suspeita é necessária para o diagnóstico e estadiamento. A melhor forma de realizar a biópsia é através da exérese de toda lesão com uma margem de no máximo 3 mm⁷. A profundidade do melanoma medida em milímetros é o principal fator prognóstico da doença e é obtido através da análise histopatológica da lesão. Descrita por Breslow em 1970, divide os melanomas em finos (com espessura menor do que 2 mm), melanomas de espessura intermediária (entre 2 e 4 mm) e espessos (acima de 4 mm).

O potencial metastático da lesão é proporcional a sua espessura na pele. Outros fatores prognósticos importantes são ulceração e presença de linfonodos comprometidos pelo tumor⁸. Os linfonodos regionais são foco frequente de doença metastática em pacientes com melanoma. A incidência de metástases linfonodais varia de 12 a 60%, dependendo do estadio da doença⁹. Em 2017, MOON et al., mostraram que os melanomas podem surgir de células-tronco melanocíticas (MCSC). Em modelo animal, esses autores demonstraram que a quiescência das MCSC atua como um supressor de tumor, e identificaram os fatores ambientais e moleculares necessários para as etapas iniciais da formação do melanoma. Especificamente, os melanomas originam-se de MCSC competentes após estimulação por UVB, o que induz a ativação e translocação de MCSC através de um processo dependente de inflamação¹⁰.

A inflamação desempenha um papel importante na interação entre as respostas imunes inata e adaptativa, sendo fundamental para proteção contra tumores. Nos estágios iniciais da formação do melanoma, a inflamação induzida pela radiação UV está associada ao aumento do fluxo sanguíneo, permeabilidade vascular e danos às estruturas subcelulares resultantes da produção de espécies reativas de oxigênio. A influência de fatores ambientais como a radiação UV podem induzir os melanócitos e queratinócitos a produzir mediadores inflamatórios que levam ao desenvolvimento de melanoma devido as suas características imunossupressoras e, eventualmente, de crescimento, invasão e metástase¹⁰.

O sistema imune é dividido em imunidade inata e adaptativa. A imunidade adaptativa é composta principalmente por linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ e linfócitos B, que desempenham um papel fundamental na defesa do organismo contra antígenos estranhos. Para ativação dos linfócitos T, a interação entre os receptores na membrana desses linfócitos e os antígenos apresentados no contexto de molécula de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I ou II. Nessa etapa da ativação da resposta imune, também ocorrem as interações de moléculas co-estimuladoras CD28, expressas nas células T, com as moléculas B7-1 (CD80) ou B7-2 (CD86), presentes na superfície da APC. O balanço entre as moléculas co-estimuladoras e co-inibidoras, também chamado de *checkpoint* imune é fundamental para a regulação da resposta imune¹¹. Uma das vias inibitórias mais bem estudadas é a PD1-PDL1. Durante a última década, vários membros co-receptores inibidores foram relacionados com o fenômeno de "exaustão" da célula T, incluindo *Programmed death 1* (PD1) e CTLA-4. Também chamado de "esgotamento" das células T, termo atribuído a redução gradual das funções celulares que ocorre nos linfócitos TCD8+ citotóxico em condições de exposição crônica ao antígeno¹².

A molécula PD1 é um membro da família dos receptores CD28 e atenua as respostas imunes por regular negativamente a proliferação e a atividade funcional de células T. A expressão de PD1 nas células T ativadas, especialmente nas Treg, aumenta a sua função supressora da resposta imune. O efeito inibitório de PD1 sobre a ativação de T linfócitos é mediada pela interação com os *Programmed death ligand 1 e 2* (PD-L1 e PD-L2). Especialmente a interação PD1/PD-L1 modula negativamente a resposta imune pela diminuição da produção de citocinas; e induz anergia dos linfócitos T e a apoptose celular. A sinalização do PD1 conduz o ciclo celular à parada em G0/G1, mas não aumenta a morte celular¹³.

O PD-L1, também chamado B7-H1, é uma proteína transmembrana tipo 1 de 40kDa, codificada pelo gene *CD274*, presente em células apresentadoras de antígenos, como monócitos/macrófagos, células B, DCs, assim como células tumorais, como mecanismo de escape imunológico. A taxa de expressão de PD-L1 na superfície de células tumorais está associada com progressão tumoral e pior prognóstico, como também a presença de células T PD1+ no infiltrado tumoral¹⁴.

As moléculas de PD1 e do seu ligante (PD-L1) se apresentam como receptores na superfície do citoplasma e na forma solúvel no plasma (sPD1 e sPD-L1). As moléculas livres de sPD1 e sPD-L1 podem ser liberados através da clivagem proteolítica desses receptores da membrana. Além disso, o sPD-L1 mantém sua atividade biológica e é capaz de se ligar ao receptor PD1 presente na membrana dos leucócitos, especialmente nos linfócitos T, ativando a via PD1/PD-L1¹⁵.

No carcinoma renal de células claras, altos níveis de sPD-L1 no pré-operatório estão associados aos tumores de maior tamanho, estágio tumoral e grau histológico mais avançados e necrose grave, aumentando em 41% o risco de morte. Os níveis elevados de sPD-L1 estão associados com uma pior sobrevida global, características clinicopatológicas e resposta ao tratamento de diferentes tipos de tumores sólidos, levando ao aumento de ensaios clínicos envolvendo o bloqueio dessa via¹⁴.

A taxa de expressão de PD-L1 na superfície de células tumorais está associada com progressão tumoral e pior prognóstico como também a presença de células T PD1+ no infiltrado tumoral. Por isso, os receptores PD1 tem sido apresentados como um novo alvo para a imunoterapia de tumores malignos. A taxa de resposta ao tratamento com anticorpos monoclonais anti-PD-L1 e anti-PD1 variou de 6 a 28% em pacientes com melanoma, carcinoma de células renais e câncer de pulmão não pequenas células^{14,16,17}.

A via PD1-PDL1 é amplamente estudada e seu papel em doenças autoimunes, infecções e câncer, sendo estabelecidas inúmeras terapias para bloqueio dessa ligação, como os anticorpos monoclonais. No entanto, é importante destacar que as formas solúveis do PD-1 e do PD-L1 permanecem um desafio, uma vez que sua origem e função são distintas daquelas moléculas presentes na membrana das células. O significado clínico da expressão de PD-1 e PD-L1 em suas formas solúveis ainda não é bem esclarecido¹⁸. Uma vez que na literatura ainda não tem um consenso estabelecido sobre os mecanismos envolvidos da forma solúvel PD1 e PDL1, decidiu-se avaliar os níveis solúveis de sPD-1 e sPD-L1 nos pacientes com melanoma cutâneo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Desenho e participantes do estudo

Este é um estudo transversal realizado no período julho de 2018 a agosto de 2019 no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Translacional Prof. Fernando Figueira (IMIP). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HCP sob n°. CAAE 40008514.0.0000.5205, seguindo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento livre esclarecido (TCLE).

Os critérios de inclusão foram pacientes com confirmação diagnóstica de melanoma cutâneo; idade acima de 18 anos; pacientes tratados no Serviço de Cirurgia Oncológica do HCP; pacientes com condições de avaliar a sua participação no estudo; pacientes que concordaram em participar do estudo, e que assinaram o TCLE. Os critérios de exclusão foram pacientes com diagnóstico prévio de outras doenças oncológicas; pacientes com segundo tumor primário sincrônico; pacientes submetidos previamente a tratamentos oncológicos.

2.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

O grupo de estudo foi composto por 51 pacientes com diagnóstico histológico de melanoma cutâneo com idade acima de 18 anos, de ambos os sexos. Os pacientes apresentavam-se em diferentes estadios da doença.

O grupo controle foi composto por 15 indivíduos saudáveis com idade acima de 18 anos, acompanhantes de pacientes e funcionários do HCP, sem diagnóstico e histórico familiar de câncer.

2.3 Ensaio imunoenzimático

Foram coletados 4 mL de sangue venoso dos participantes em tubo plástico sem anticoagulante (seco) e o soro foi separado por meio de centrifugação a 300 xg por 5 min

à temperatura de 4 °C. Os níveis solúveis de PD1 e PD-L1 (sPD-L1) foram detectados nas amostras de soro, sendo realizadas as dosagens pela técnica imunoenzimática (ELISA – do inglês *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), utilizando os kits comerciais *Human PD-1 DuoSet* e *PD-L1/B7-H1 DuoSet* (R&D Systems, Minneapolis, MN). As detecções de sPD-1 e sPDL1 foram realizadas conforme protocolos disponibilizados pelo fabricante (R&D Systems). A leitura da absorbância foi realizada utilizando a leitora de placas Human Reader HS (Human, Wiesbaden, Germany). A leitura das absorbâncias foi realizada em um comprimento de onda de 450 nm. As concentrações foram expressas em pg/mL.

2.3 Análises estatísticas

A estatística descritiva das variáveis categóricas foi representada em frequências absolutas e relativas, enquanto as variáveis contínuas foram apresentadas como medidas de tendência central (média/Desvio Padrão ou mediana e interquartil (25-75%). Para as variáveis quantitativas, foi inicialmente aplicado o teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. As variáveis quantitativas deste estudo foram apresentadas em valores de mediana e intervalo interquartil (IQR: 25%-75%). Teste não paramétrico de Mann-Whitney foram utilizados para comparação entre dois grupos. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$. As análises foram realizadas no programa Graphpad v7.0.

3 RESULTADOS

3.1 Descrição das características clínicas dos pacientes

Foram avaliados 51 pacientes com melanoma cutâneo com uma média de idade de 57,6 anos ($\pm 14,3$). A maioria dos pacientes foi de cor branca (72,5%) e do sexo feminino (62,7%). Quanto à localização da lesão primária, houve uma predominância de melanomas nos membros inferiores (54,9%), seguido pelos melanomas localizados no tronco (31,4%) e membros superiores (13,7%).

A maioria dos pacientes foi de cor branca (72,5%) e do sexo feminino (62,7%). Foram 43,2% dos pacientes que apresentaram índice de Breslow > 2 mm. A maioria dos pacientes apresentou metástase linfonodal (51%) e estádios III-IV (52,9%). Detalhes da descrição das características clínicas dos pacientes estudados encontra-se na Tabela 1.

3.2 Análise dos níveis solúveis de sPD-1 e sPD-L1

- **Entre pacientes e controles**

Na análise dos níveis solúveis de sPD-1 e sPD-L1 foi observado que os pacientes apresentaram níveis diminuídos quando comparado aos controles ($p=0,02$ e $p=0,003$ respectivamente), como mostra a Figura 1.

- **Entre os grupos de pacientes com estádios I, II e III**

Foi observado que os pacientes com os estádios I e II apresentavam níveis diminuídos de sPD-1 e sPD-L1 quando comparados aos pacientes com estadio III e IV ($p=0,004$ e $p=0,005$, respectivamente), como mostra a Figura 2.

- **Entre os grupos de pacientes com Breslow ≤ 2 mm ou > 2 mm; e entre os grupos com linfonodos positivos (LN+) e linfonodos negativos (LN -)**

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de sPD-1 e sPD-L1 entre os grupos de pacientes LN+ e LN-; e espessura de Breslow ≤ 2 mm ou > 2 mm (Figura 3)

4 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram avaliados 51 pacientes com média de idade de 57,6 anos, sendo a maioria do sexo feminino. Essa maior prevalência da doença em mulheres, dados do INCA de incidência para 2018, mostraram uma proporção maior de incidência de melanoma cutâneo no sexo feminino¹⁹. Com relação à idade, diferente de outros tumores sólidos, o melanoma afeta principalmente indivíduos jovens e de meia-idade (idade mediana no diagnóstico, 57 anos). A incidência aumenta linearmente após 25 anos até 50 anos de idade, e depois diminui, particularmente no sexo feminino. Ao analisar dados de incidência em relação ao sexo, mulheres são mais frequentes em grupos de idade mais jovem, enquanto o sexo masculino prevalece a partir dos 55 anos²⁰.

A maioria dos pacientes se identificou como de cor de pele branca, sendo o melanoma cutâneo mais prevalente na população caucasiana pela sua origem de forma crônica ou intermitente a exposição ao que se traduzem em diferentes locais de origem, um grau de exposição acumulativa à radiação UV²¹. Com relação ao diagnóstico, verificou-se uma maior frequência de pacientes fase avançada da doença, com maior prevalência em estadios III-IV. De acordo com a literatura, as células do melanoma tendem a metastizar durante os estágios iniciais da tumorigênese, em grande parte devido à sua natureza altamente metastática²². No Brasil, a dificuldade do acesso aos serviços de saúde de referência pode ser uma das causas do maior número de pacientes com diagnóstico avançado da doença. Outra explicação, é que os pacientes com melanoma em estágios iniciais são frequentemente assintomáticos e, portanto, o diagnóstico é realizado de forma tardia na grande maioria dos países ocidentais²².

Por isso, apesar dos resultados clínicos encorajadores das novas terapias, o prognóstico ainda é ruim, e está associado as características anatomopatológicas do tumor primário no diagnóstico, incluindo a espessura de Breslow, status linfonodal, estadios da doença e tipo histológico. A interação de células do melanoma com as células do sistema imune inato e adaptativo está direta ou indiretamente associada a sobrevivência e invasão tumoral²³.

Com relação a expressão de PD1 e PDL1 solúveis, foi observado uma diminuição dos níveis solúveis de sPD1 nos pacientes quando comparado aos controles. Estudos mostraram que a presença de PD-1 solúvel atuaria como um fator prognóstico favorável, corroborando a resposta imune anti-tumoral, uma vez que o sPD-1 bloqueia a fenda de ligação do receptor de membrana do ligante de PD1 (PD-L1)^{24,25}, o que potencializaria a ativação da resposta imune²⁶. No entanto, poucos estudos analisaram a relação entre os níveis de PD-1 solúvel no sangue e os achados clínicos e patológicos de pacientes com câncer, objetivando determinar o valor preditivo dessa molécula^{27, 28, 29}. Sorensen et al. (2016) estudou a concentração de sPD-1 em pacientes com câncer de pulmão antes e durante o tratamento com erlotinib e observou que o pacientes que apresentavam aumento de sPD-1 durante o tratamento tinham um desfecho mais favorável³⁰. Em contrapartida, outro estudo observou que o aumento dos níveis de sPD-1 foi associado a um risco maior de carcinoma hepatocelular²⁸.

Também observamos uma diminuição nos níveis solúveis de sPD-L1 em pacientes quando comparados aos controles. Estudos descrevem essa molécula como um fator de pior prognóstico³⁰, uma vez que a interação de PDL1 na forma livre com o PD1 na membrana dos linfócitos promove a inibição dos mecanismos da resposta imune anti-tumorais, favorecendo a evasão tumoral²⁴. No entanto, a literatura não é clara e os dados são conflitantes uma vez que estudos demonstraram que níveis elevados de sPD-L1 foram associados a um pior prognóstico em vários tipos de câncer³¹⁻³⁶ enquanto um estudo com pacientes com adenocarcinoma de estômago mostrou elevados níveis de sPD-L1 associado ao bom prognóstico³³.

Na análise dos níveis de sPD-1 e sPD-L1 de acordo com o estágio, observou-se que os pacientes com melanoma estadio III e IV mostraram níveis aumentados dessas moléculas comparados os pacientes com estadio I e II. Isso sugere que com a progressão e desenvolvimento do câncer há uma maior ativação do sistema imune e, com isso, é desenvolvido um ambiente que favorece a expressão de RNAm e clivagem proteolítica, resultando no aumento da produção das formas solúveis de PD-1 e PD-L1^{37,38}.

No entanto, no presente estudo não foi observada diferença estatística nos níveis solúveis de sPD-1 e sPD-L1 entre os grupos de pacientes com e sem acometimento linfonodal e entre os pacientes em relação ao índice de Breslow. De acordo com o *American Joint Committee of Cancer* (AJCC), o índice de Breslow, a presença de ulcerações e a metástase para o linfonodo sentinela são os fatores prognósticos mais importantes em pacientes sem evidência clínica de metástase. O índice de Breslow foi

usado pela primeira vez pelo patologista Alexander Breslow em 1970 e indica a invasividade do melanoma, seu crescimento vertical a partir da camada granular, medido em milímetros³⁹. Melanomas com índice de Breslow inferior a 0,76mm possuem uma sobrevida superior a 10 anos em 95% dos casos⁴⁰. No entanto, dentre os fatores citados acima, o acometimento linfonodal é considerado o mais importante em termos de sobrevida e resposta ao tratamento⁴¹. Em um estudo que avaliou o sPD-L1 em pacientes com melanoma cutâneo, Cubillos-Zapata (2018) verificou que os níveis dessa molécula se correlacionaram com o índice de Breslow e a sua incorporação ao fatores de risco clássico para metástase, melhoraram a classificação, embora o valor isolado da molécula possua uma utilidade limitada⁴².

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados encontrados, conclui-se que as moléculas sPD-1 e sPD-L1 podem ser consideradas possíveis biomarcadores de prognóstico no melanoma cutâneo. Novos estudos que avaliem as formas solúveis de sPD-1 e sPD-L1 no câncer são necessários, bem como a expressão dessas moléculas na membrana de células do sistema imune e nas células tumorais, uma vez que existem grandes possibilidades de tratamentos, já que existem drogas que bloqueiam essas moléculas em uso no Brasil.

REFERÊNCIAS

1. Jimbow K, Fitzpatrick TB Changes in distribution pattern of cytoplasmic filaments in human melanocytes during ultraviolet-mediated melanin pigmentation. The role of the 100-Angstrom filaments in the elongation of melanocytic dendrites and in the movement and transfer of melanosomes. *J Cell Biol.* 1975;65(2):481-8.
2. Costin GE, Hearing VJ. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* 2007 Apr;21(4):976-94. Epub 2007 Jan 22. Review.
3. Elder, D. E. Pathology of melanoma. *Surgical Oncology Clinics of North America*, v. 24, n. 2, p. 229–237, 2015.
4. Picardo, M; Slominski, A T. Melanin pigmentation and melanoma. *Experimental Dermatology*, v. 26, n. 7, p. 555–556, 2017.
5. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med.* 1999; 340(17):1341-8.
6. Falzone L, Marconi A, Loreto C, Franco S, Spandidos DA, Libra M. Occupational exposure to carcinogens: Benzene, pesticides and fibers (Review). *Mol Med Rep.* 2016; 14(5):4467-4474.
7. Marsden JR, Newton-Bishop JA, Burrows L, Cook M, Corrie PG, Cox NH, Gore ME, Lorigan P, Mackie R, Nathan P, Peach H, Powell B, Walker C Revised UK guidelines for the management of cutaneous melanoma 2010. British Association of Dermatologists (BAD) Clinical Standards Unit. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010; 63(9):1401-19.
8. Gershenwald JE, Nelson KC Skin Cancer: Have melanoma and skin cancer finally met their match?. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017; 14(5):267-268.
9. Francken AB, Bastiaannet E, Hoekstra HJ. Follow-up in patients with localised primary cutaneous melanoma. *Lancet Oncol.* 2005; 6(8):608-2.
10. Moon H, Donahue LR, Choi E, Scumpia PO, Lowry WE, Grenier JK, Zhu J, White AC. Melanocyte Stem Cell Activation and Translocation Initiate Cutaneous Melanoma in Response to UV Exposure. *Cell Stem Cell.* 2017; 21(5):665-678.e6.
11. Bernard A, Lamy And L et al. The two-signal model of T-cell activation after 30 years. *Transplantation*, 2002. 73 (1 Suppl):S31-5.
12. Park HJ, Kusnadi A, Lee EJ, et al. Tumor infiltrating regulatory T cells delineated by upregulation of PD-1 and inhibitory receptors. *Cell Immunol* 2012; 278:76-83
13. Latchman Y, Wood C, Chernova T, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cells activation. *Nat Immunol* 2001; 2:261-8.

14. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366:2443-54.
15. Wei SC, Duffy CR, Allison JP, Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov.* 2018;8(9):1069-1086.
16. Terawaki S, Honjo T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *Int immunol.* 2005;17(2):133-144.43.
17. Okudaira K, Hokari R, Tsuzuki Y, et al. Blockade of B7-H1 or B7-DC induces an anti-tumor effect in a mouse pancreatic cancer model. *Int J Oncol.* 2009;35(4):741-749.
18. Gu D, Ao Xiang et al. Soluble immune checkpoints in cancer: production, function and biological significance. *J Immunother Cancer.* 2018; 6: 132.
19. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação de Prevenção e Vigilância (Ed.). Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 13. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2017. 54 p.
20. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo.* 2014; 28(6):1005-11.
21. Candido S, Rapisarda V, Marconi A, Malaponte G, Bevelacqua V, Gangemi P, Scalisi A, McCubrey JA, Maestro R, Spandidos DA, Fenga C, Libra M. Analysis of the B-RafV600E mutation in cutaneous melanoma patients with occupational sun exposure. *Oncol Rep.* 2014; 31(3):1079-82.
22. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, McArthur GA, Hutson TE, Moschos SJ, Flaherty KT, Hersey P, Kefford R, Lawrence D, Puzanov I, Lewis KD, Amaravadi RK, Chmielowski B, Lawrence HJ, Shyr Y, Ye F, Li J, Nolop KB, Lee RJ, Joe AK, Ribas A Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *Sosman . N Engl J Med.* 2012;366(8):707-14
23. Beutler BA. The role of tumor necrosis factor in health and disease. *J Rheumatol Suppl.* 1999;57:16-21. Review.
24. Zhu X, Lang J. Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget.* 2017; 8(57): 97671–97682.
25. Song MY, Park SH, Nam HJ et al. Enhancement of vaccine-induced primary and memory CD8(+) T-cell responses by soluble PD-1. *J Immunother.* 2011;34:297-306.
26. Zhang P, Ouyang S, Wang J et al. Levels of programmed death-1 and programmed death ligand-1 in the peripheral blood of patients with oral squamous cell carcinoma and its clinical implications. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2015;33:529-33.
27. Cheng HY, Kang PJ, Chuang YH et al. Circulating programmed death-1 as a marker for sustained high hepatitis B viral load and risk of hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2014 ;9:e95870.
28. Atanackovic, D.; Luetkens, T.; Kroger, N. Coinhibitory molecule pd-1 as a potential target for the immunotherapy of multiple myeloma. *Leukemia*, v. 28, p. 993-1000, 2014.

29. Sorensen SF, Demuth C, Weber B et al. Increase in soluble PD-1 is associated with prolonged survival in patients with advanced ECFR-mutated non-small cell lung cancer treated with erlotinib. *Lung Cancer*, 2016. 100:77-84.
30. Zhou, J.; et al.. Soluble pd-11 as a biomarker in malignant melanoma treated with checkpoint blockade. *Cancer Immunology Research*, v. 5, p. 480-492, 2017.
31. Wang L, Wang H, Chen H et al. Serum levels of soluble programmed death ligand 1 predict treatment response and progression free survival in multiple myeloma. *Oncotarget*, 2015. 6: 41228-36.
32. Rossille D, Gressier M, Damotte D et al. High level of soluble programmed cell death ligand 1 in blood impacts overall survival in aggressive diffuse large B-Cell lymphoma: results from a French multicenter clinical trial. *Leukemia*, 2014. 28: 2367-75.
33. Zheng Z, Bu Z, Liu X et al. Level of circulating PD-L1 expression in patients with advanced gastric cancer and its clinical implications. *Chin J Cancer Res*. 2014;26:104-11.
34. Wang H, Wand L, Liu WJ et al. High post-treatment serum levels of soluble programmed cell death ligand 1 predict early relapse and poor prognosis in extranodal NK/T cell lymphoma patients. *Oncotarget*. 2016; 7:33035-4.
35. Finkelmeier F, Canli Ö, TAL A et al. High levels of the soluble programmed death-ligand (sPD-L1) identify hepatocellular carcinomapatients with a poor prognosis. *Eur J Cancer*. 2016;59:152-159.
36. Zhang J, Gao J, LI Y et al. Circulating PD-L1 in NSCLC patients and the correlation between the level of PD-L1 expression and the clinical characteristics. *Thorac Cancer*. 2015;6:534-8.
37. Morgado-Carrasco, D.; Terc, F.; Ertekin, S.S.; Ferrandiz, L. Immunotherapy for advanced skin cancer. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, Disponível: . Acesso em: 20 abr. 2018.
38. Chen, D.S; Mellman, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*, Cambridge, v. 39, p. 1-10, 2013.
39. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*. 1970; 172:902–908.
40. Binder M, Dolezal I, Wolff K, Pehamberger H ET AL. Stereologic estimation of volume-weighted mean nuclear volume as a predictor of prognosis in “thin” malignant melanoma. *J. Invest Dermatol* 1992; 99:180-183.
41. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR et al. . Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin*. 2017;676:472–492.
42. Cubillos-zapata C, Martínez-garcía ma, Campos-Rodríguez F et al. Soluble PD-L1 is a potential biomarker of cutaneous melanoma aggressiveness and metastasis in obstructive sleep apnoea patients. *Eur Respir J*. 2019;53. pii: 1801298.

TABELA e FIGURAS

Tabela 1: Distribuição das frequências das características clínicas de 51 pacientes com melanoma cutâneo atendidos no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP).

CARACTERÍSTICAS	N (%)
Idade	
Média (DP)	57,6 (± 14,3)
Faixa Etária	
< 60 anos	26 (50,9%)
≥ 60 anos	25 (49,1%)
Sexo	
Masculino	19 (37,3%)
Feminino	32 (62,7%)
Cor	
Branca	37 (72,5%)
Não Branca	14 (27,5%)
Localização	
Membros inferiores	28 (54,9%)
Membros superiores	7 (13,7%)
Tronco	16 (31,4%)
Breslow	
≤ 2 mm	27 (52,9%)
>2 mm	22 (43,2%)
Sem informações	2 (3,9%)
Status Linfonodal	
Linfonodo negativo	25 (49,0%)
Linfonodo positivo*	28 (51,0%)
Estadio	
I	10 (19,7%)
II	14 (27,4%)
III-IV	27 (52,9%)

DP: Desvio Padrão.

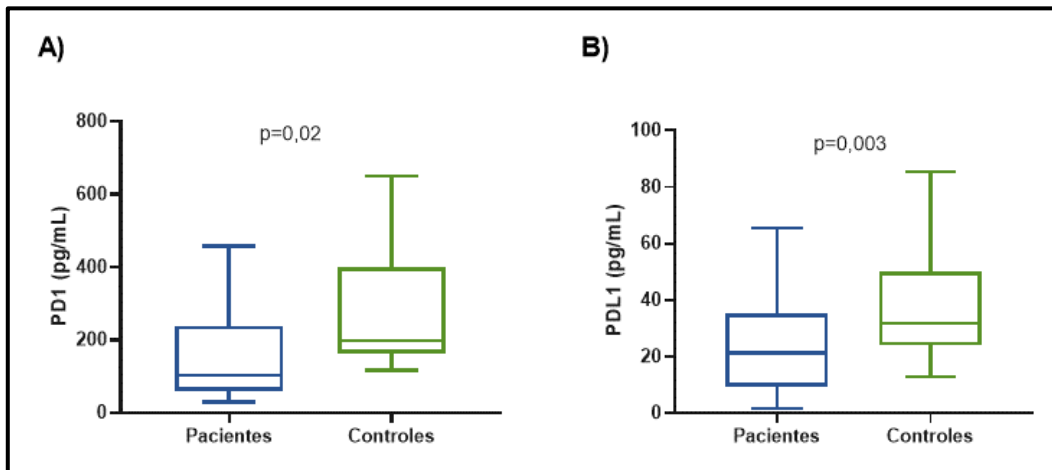


Figura 1. Análises dos níveis séricos de (A) sPD-1 e (B) sPD-L1 no sangue periférico de pacientes com melanoma e controles. Os gráficos foram representados em mediana e interquartil 25-75. Foi realizado o teste de Mann-Whitney para análise dos valores de mediana entre dois grupos. Foi considerado significativo $p < 0.05$.

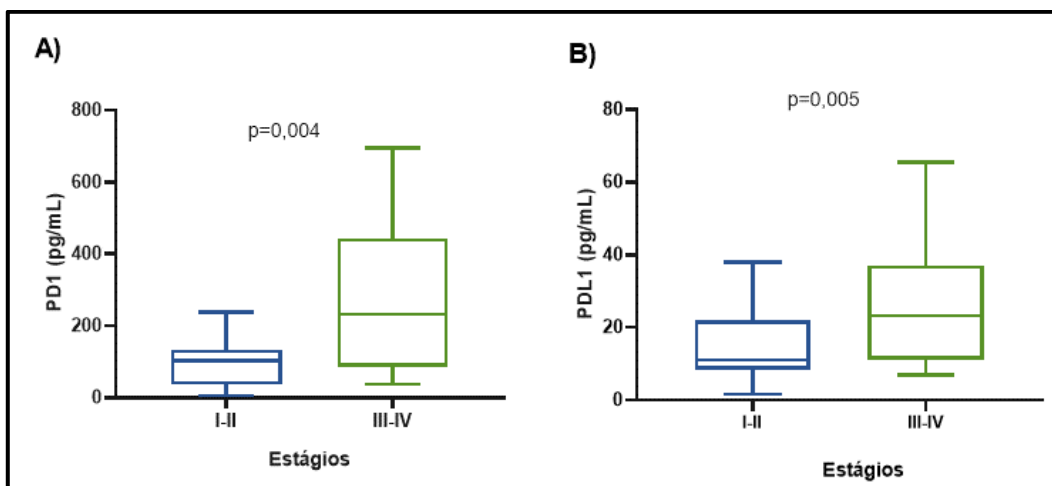


Figura 2. Análises dos níveis sPD-1 e sPD-L1 no sangue periférico de pacientes com melanoma de acordo com o estadio. Os gráficos foram representados em mediana e interquartil 25-75. Foi realizado o teste de Mann-Whitney para análise dos valores de mediana entre dois grupos. Foi considerado significativo $p < 0.05$.

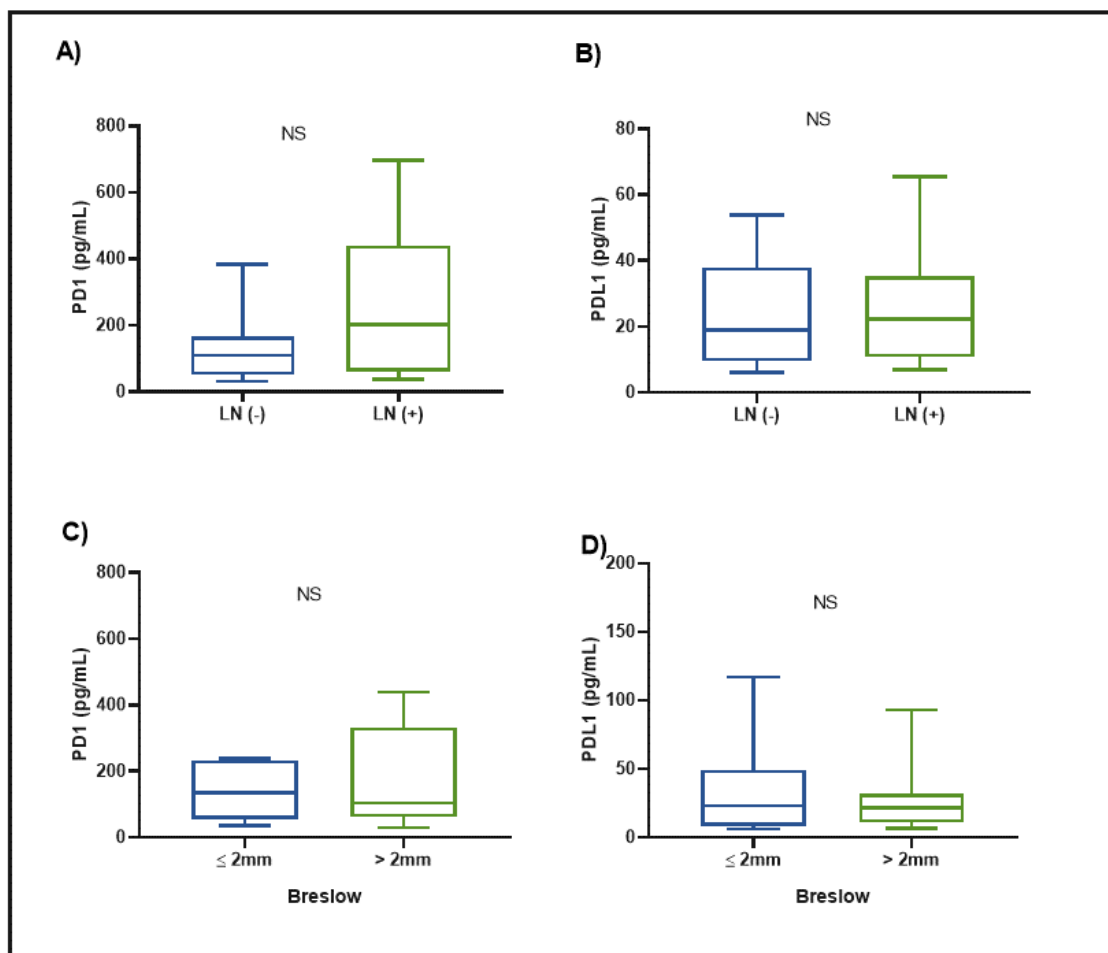


Figura 3. Análises dos níveis séricos de sPD-1 e sPD-L1 no sangue periférico de pacientes com melanoma cutâneo com os parâmetros de comprometimento linfonodal: linfonodos positivos (LN+) e linfonodos negativos (LN -) e de espessura de Breslow ≤ 2 mm ou > 2 mm. Os gráficos foram representados em mediana e interquartil 25-75. Foi realizado o teste de Mann-Whitney para análise dos valores de mediana entre dois grupos. Foi considerado significativo $p < 0.05$. NS: não significativo.