

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIRURGIA

**TAMOXIFENO NO TRATAMENTO DO MELANOMA  
MURINO B16-F10 EM CAMUNDONGOS C57BL/6N**

*GERSON JUNQUEIRA JÚNIOR*

ORIENTADOR: PROF. DR. OLY CAMPOS CORLETA

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia  
para obtenção do título de Mestre em Medicina

Porto Alegre

1996



Bib. Fac. Med. UFRGS

T-1159

TAMOXIFENO NO TRATAMENTO DO ME



MED  
T  
QZ206 J95t 1996

05187025

{000176531} Junqueira Junior, Gerson.  
Tamoxifeno no tratamento do melanoma murino  
b16-f10 em camundongos c57bl/6n. 1996. 81 f. :  
il. color.

J95t Junqueira Júnior, Gerson

Tamoxifeno no tratamento do melanoma murino em camundongos /  
Gerson Junqueira Júnior; orient. Oly Campos Corleta. - Porto Alegre:  
UFRGS, 1996.

81 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina: Ci-  
rurgia.

1. Melanoma. 2. Camundongos. 3. Tamoxifeno. 4. Terapia. I. Corleta,  
Oly Campos. II. Título.

C.D.D. 616.992

C.D.U. 616-006.8

Ficha catalográfica elaborada na Biblioteca da Faculdade de Medicina da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul / Hospital de Clínicas de Porto  
Alegre.

*Cultivemos a ciência por si mesma,  
sem considerar no momento as suas aplicações.  
Estas sempre chegam; tardam, às vezes, anos; às vezes séculos.*

Ramón y Cajal

À minha querida esposa *Jaqueline*,  
que com amor e compreensão soube  
me incentivar durante esta jornada.

À minha filha *Laura*,  
sentido da vida e incentivo  
permanente aos meus ideais.

À minha mãe *Corina*,  
exemplo de dedicação e amor  
ao longo da minha formação.

À minha irmã *Lúcia Isabel*,  
fonte inesgotável de alegria,  
pelo seu companheirismo.

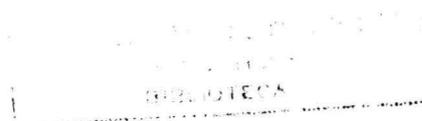
À minha segunda família,  
*Antonio Carlos, Eva e Júnior,*  
pela amizade e carinho permanentes.

## AGRADECIMENTOS

Ao final desta dissertação, não pude deixar de lembrar do tempo e esforço empregados durante todo este período. Foram quase quatro anos de intensa atividade intelectual e física. Agradeço, neste momento, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta pesquisa e, de forma especial:

- ao Prof. Dr. Oly Campos Corleta, pelas sugestões, orientação e incentivo constantes durante a execução deste trabalho;
- ao Prof. Renato Luiz Amaral, pelos ensinamentos e oportunidades ao longo de minha vida profissional;
- ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, em especial à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Célia Regina Whitaker Carneiro, pela cessão das células para cultura e dos animais de experimentação;
- à Unidade de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela utilização das dependências do Laboratório de Cultura de Tecidos e, em especial, à bióloga Andréia Maria Ida Sopelsa, pela curiosidade científica e dedicação demonstradas com as culturas celulares;
- à Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, pela utilização das dependências da Divisão de Produção e Experimentação Animal e, em especial, às médicas-veterinárias Luisa Maria Gomes de Macedo Braga e Mara de Souza Motta, incansáveis nos cuidados com os animais de experimentação;
- à Prof<sup>ª</sup> Lúcia Maria Kliemann, pelas sugestões e dedicação durante a avaliação histológica;
- ao Prof. Dr. Mário Bernardes Wagner, pelas orientações de cunho estatístico;

- ao colega Antonio Carlos Timm, pelo auxílio na versão do *Resumo* para o idioma inglês;
- à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Maria do Horto Motta, pela revisão de linguagem e padronização técnica do texto;
- ao fotógrafo Clóvis de Souza Prates, pelo auxílio na documentação dos resultados;
- à minha prima Belkis Giannetti Miceli, pelo apoio logístico em São Paulo;
- aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Medicina da UFRGS, pelo auxílio na busca do material bibliográfico, em especial à bibliotecária Helen Flores, pela normatização das referências bibliográficas e ficha catalográfica;
- à secretária do Curso de Pós-Graduação em Medicina: Cirurgia, Estela Maris Emer Araripe, pelo interesse e atenção demonstrados;
- à Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES - pelo auxílio financeiro.



## **SUMÁRIO**

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	12
<b>LISTA DE TABELAS</b>	13
<b>LISTA DE QUADROS</b>	14
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	15
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	16
<b>2. OBJETIVO</b>	28
<b>3. MÉTODO</b>	29
3.1. AMOSTRA	29
3.2. PROCEDIMENTOS	30
3.2.1. Cultura Celular	30
3.2.2. Inoculação	34
3.2.3. Tratamento	35
3.2.4. Seguimento	35
3.2.5. Avaliação Histológica	36
3.2.6. Análise Estatística	38
<b>4. RESULTADOS</b>	39
4.1. SOBREVIDA	39
4.2. VOLUME TUMORAL	40
4.3. NECROSE TUMORAL	46
<b>5. DISCUSSÃO</b>	50
<b>6. CONCLUSÃO</b>	64
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	65
<b>NORMAS ADOTADAS</b>	75

<b>RESUMO</b>	76
<b>SUMMARY</b>	78
<b>APÊNDICE</b>	80

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Detalhe da técnica de inoculação subcutânea das células de melanoma murino no dorso do camundongo

Figura 2 - Curvas de sobrevivência dos grupos em estudo

Figura 3 - Camundongo, após a morte, com o tumor subcutâneo desenvolvido no dorso

Figura 4 - Toracolaparotomia no camundongo evidenciando ausência de metástases torácicas e abdominais

Figura 5 - Detalhe do tumor mostrando sua localização subcutânea

Figura 6 - Tumor completamente excisado mostrando sua relação com o tamanho do camundongo

Figura 7 - Detalhe do tumor excisado para avaliação histológica

Figura 8 - Curvas de crescimento tumoral nos grupos em estudo - volume tumoral calculado pela fórmula do volume da esfera

Figura 9 - Curvas de crescimento tumoral nos grupos em estudo - volume tumoral calculado pela fórmula do volume do prisma retangular

Figura 10 - Fotomicrografias (100x) mostrando o percentual total de necrose no tumor

Figura 11 - Fotomicrografias (400x) mostrando o percentual total de necrose no tumor

Figura 12 - Fotomicrografias (100x) mostrando a localização da necrose no tumor

Figura 13 - Necrose tumoral nos grupos em estudo

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela I - Mediana do volume tumoral ( $\text{cm}^3$ ), calculado pela fórmula do volume da esfera, segundo o dia da mensuração e o grupo em estudo

Tabela II - Mediana do volume tumoral ( $\text{cm}^3$ ), calculado pela fórmula do volume do prisma retangular, segundo o dia da mensuração e o grupo em estudo

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro I - Classificação de Clark para o melanoma cutâneo

Quadro II - Classificação de Breslow para o melanoma cutâneo

Quadro III - Estadiamento do melanoma cutâneo de acordo com o  
AJCC/UICC

Quadro IV - Escore atribuído ao percentual total de necrose

Quadro V - Escore atribuído à necrose central e à necrose periférica

## LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC: *American Joint Committee on Cancer*

BCG: bacilo Calmette-Guerin

DMSO: dimetil sulfoxido

EDTA: ácido etilendiamino tetracíclico dissódico

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HE: hematoxilina-eosina

ILPC: Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer

PBS: *phosphate-buffered saline*

rpm: rotações por minuto

UICC: União Internacional de Combate ao Câncer

# 1. INTRODUÇÃO

O melanoma cutâneo é uma lesão maligna que tem origem no melanoblasto da pele, correspondendo a cerca de 1 a 3% de todas as neoplasias malignas. O tumor desenvolve-se em qualquer área da pele e, excepcionalmente, pode atingir mucosas, leptomeninges e o globo ocular. Ocorre em igual proporção entre homens e mulheres e acomete principalmente pessoas de pele clara. Em negros, as regiões palmares e plantares são os sítios mais comuns. Embora o pico de incidência ocorra entre os 40 e 60 anos, a lesão tem sido observada em qualquer grupo etário, sendo, porém, bastante rara em crianças (ARIEL, 1981; ROSES, HARRIS e ACKERMAN, 1983; KOH, 1991; EVANS e MANSON, 1994).

A etiologia do melanoma cutâneo permanece obscura, porém vários fatores ambientais e do hospedeiro têm sido associados ao desenvolvimento dessa neoplasia. Dentre esses fatores, exposição solar excessiva, queimaduras solares, pele clara, cabelos loiros ou ruivos, grande quantidade de sardas nos ombros e dorso, história familiar de melanoma e presença de ceratose actínica parecem ser os mais importantes (ARIEL, 1981; ROSES e col, 1983; KOH, 1991; EVANS e MANSON, 1994).

Estudos sugerem ser a luz solar o fator ambiental mais importante na gênese do melanoma cutâneo. O mecanismo preciso de sua atuação não é de todo conhecido. Tem-se proposto que os raios B ultravioleta estimulam o potencial mitótico dos melanócitos. Pacientes com queimaduras solares acompanhadas de dor e formação de flictenas têm um risco de desenvolvimento do melanoma cutâneo duas a três vezes maior que a população normal; efélides e lesões cutâneas induzidas pela luz solar conferem um risco vinte e nove vezes

maior (SOBER, 1987; ARMSTRONG, 1988; KOH, KLIGLER e LEW, 1990; KOPE, KRIPKE e STERN, 1990).

A maioria dos melanomas está associada a um nevo pré-existente, geralmente com atividade juncional. O seu aparecimento, sem uma lesão pigmentada prévia, só ocorre em 30% dos casos. Os nevos das regiões palmares e plantares, dos leitos ungueais, dos genitais e das membranas mucosas são mais propensos a atuar como origem de melanoma cutâneo do que os sinais congênitos de outras localizações (ARIEL, 1981; ROSES e col, 1983; KOH, 1991; EVANS e MANSON, 1994).

Não só a incidência como também a morbidade e a mortalidade do melanoma cutâneo vêm aumentando em várias partes do mundo, principalmente na Suécia, Austrália, Nova Zelândia, Israel e Estados Unidos (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1992). Nesse último, foi o câncer cuja incidência teve o crescimento mais expressivo nos últimos 35 anos, aumentando quase três vezes (EVANS e MANSON, 1994). Estima-se que, no ano 2000, um em cada 90 americanos desenvolverá esta neoplasia (RIGEL, KOPF e FRIEDMAN, 1987). A explicação para esta elevação na incidência estaria no aumento da exposição à radiação solar nas raças de pele clara (RIGEL e col, 1987; MORTON, 1990).

No Brasil, conforme dados obtidos a partir dos Registros de Base Populacional de São Paulo, Porto Alegre, Recife e Fortaleza, a incidência de melanoma cutâneo variou entre 1,3 e 4,0 por 100 mil habitantes no período de 1978 a 1982. Quanto à mortalidade, segundo dados do Ministério da Saúde, não foram observadas modificações significativas no período de 1977 a 1985 (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1992). Estima-se que o melanoma cutâneo venha a ser responsável por 0,7% dos óbitos por câncer no ano de 1996 em ambos os sexos (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996).

Em Porto Alegre, segundo dados da Secretaria Estadual da Saúde e do Meio Ambiente, as taxas de incidência foram de 1,43/100.000 e 1,42/100.000 em 1991, respectivamente, para os sexos masculino e feminino, uma das mais altas em todo o país (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995).

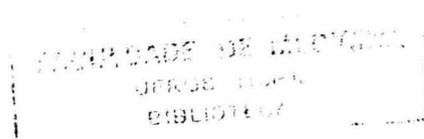
A população do Rio Grande do Sul é constituída, em sua maioria, por indivíduos de cor branca, descendentes de imigrantes europeus, etnicamente classificados como caucasianos. É grande também o número de trabalhadores que exerce suas atividades em zonas rurais - agricultura, pecuária, pesca - com exposição intensa aos raios solares (JORNAL ZERO HORA).

Outro fator a ser considerado é a redução progressiva da camada de ozônio, o filtro natural de proteção da atmosfera contra os raios ultravioletas, que em 1993 era da ordem de 19,5% no Rio Grande do Sul, segundo artigo publicado na imprensa leiga (STIEGGER, 1993).

Esses fatores certamente concorrem para que, em nosso meio, também se observe um aumento da incidência do melanoma cutâneo, tornando-se cada vez mais importante sua prevenção e tratamento.

Deve-se considerar o diagnóstico de melanoma cutâneo sempre que uma lesão pigmentada apresentar uma ou mais das seguintes características: prurido, tamanho superior a 0,6 cm, crescimento, contornos irregulares, alteração de cor, reação inflamatória local, ulceração e sangramento (ARIEL, 1981; ROSES e col, 1983).

Frente a uma lesão pigmentada suspeita, a realização de biópsia se impõe, para que o diagnóstico de melanoma cutâneo seja confirmado ou excluído histologicamente. Dá-se preferência sempre à biópsia excisional, estando a incisional reservada apenas para os casos em que a lesão é de grandes dimensões ou está situada em regiões anatômicas em que sua remoção completa envolve procedimentos cirúrgicos maiores (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1992).



Em todos os casos confirmados de melanoma cutâneo, a avaliação da presença de metástases locorregionais e à distância deve ser feita através de exame físico completo e de exames complementares pertinentes de acordo com o quadro clínico (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1992).

Com base em suas manifestações clínicas, comportamento biológico e características histológicas, classifica-se o melanoma cutâneo em quatro subgrupos: de espalhamento superficial, nodular, lentigo maligno e acral-lentiginoso.

A variedade mais comum é o melanoma de espalhamento superficial, ocorrendo em 70% dos casos. Só é menos agressivo que o nodular. Em cerca de 30% dos casos, desenvolve-se sobre um nevo pré-existente, o qual transforma-se lentamente durante um longo período de tempo, meses a anos, e então cresce rapidamente; o restante dos casos já é maligno desde o seu surgimento. Pode ser plano ou discretamente elevado quando ocorre crescimento vertical. Comumente encontra-se uma variedade de coloração na mesma lesão, combinada com bordas irregulares e pouco nítidas e hiperqueratose também irregular. Parece haver um ligeiro predomínio em mulheres, principalmente nos membros inferiores e dorso (ARIEL, 1981; ROSES e col, 1983).

O segundo tipo mais freqüente é o melanoma nodular, que ocorre em 15 a 30% dos casos e é a variedade mais agressiva. Em nosso meio, contudo, a maioria dos doentes apresenta tumores desse subgrupo (46,5%) (MIGLIAVACCA, GUIMARÃES e HOFMANN, 1993). Sua evolução é rápida, de semanas a meses, originando-se de pele normal ou, mais raramente, de nevo pré-existente. A lesão é elevada, nodular, geralmente preta ou azulada, com tendência a ulceração e hemorragia e com rápido crescimento vertical, invadindo a derme. Aproximadamente 5% das lesões são amelanóticas. A incidência é

maior no sexo masculino, comumente no tronco e cabeça (ARIEL, 1981; ROSES e col, 1983).

O lentigo maligno é pouco freqüente, perfazendo 4 a 10% do total. Tem baixa agressividade e aproximadamente 95% das lesões são *in situ*, ou seja, só apresentam fase de crescimento lateral. A coloração varia do castanho ao negro, sem bordas nítidas, podendo alcançar vários centímetros de diâmetro. Apresenta crescimento muito lento, anos a décadas. Acomete ambos os sexos em igual proporção, principalmente em cabeça e pescoço e quase sempre em pessoas de idade avançada (ARIEL, 1981; ROSES e col, 1983).

Por fim, o melanoma acral-lentiginoso também é pouco freqüente, 2 a 8%, porém em negros, asiáticos e hispânicos pode chegar a 35 - 60%. Tem alta agressividade e acomete as regiões palmar, plantar e leito ungueal. A lesão é plana, variando do castanho ao negro, com bordas irregulares, podendo alcançar vários centímetros de diâmetro. Ambos os sexos são acometidos igualmente (ARIEL, 1981; ROSES e col, 1983).

A profundidade do melanoma cutâneo na pele tem relação com o seu prognóstico. A avaliação histopatológica da profundidade da lesão primária é denominada microestadiamento e tem sido feita segundo classificações propostas por Clark (CLARK, FROM, BERNARDINO e MIHM, 1969) e por Breslow (BRESLOW, 1970).

A classificação de Clark mede os diferentes níveis de invasão que refletem a profundidade de penetração nas camadas dérmicas até a hipoderme (Quadro I) (CLARK e col, 1969).

## QUADRO I

## CLASSIFICAÇÃO DE CLARK PARA O MELANOMA CUTÂNEO

CLASSIFICAÇÃO DE CLARK
I - compromete apenas a epiderme ( <i>in situ</i> )
II - invade a derme papilar
III - atinge a junção papilorrreticular
IV - invade a derme reticular
V - invade a hipoderme

A classificação de Breslow mede a espessura da lesão através de um micrômetro ocular, determinando sua altura vertical total (Quadro II). A espessura do melanoma cutâneo guarda uma estreita relação com a história natural da doença: quanto maior a espessura do tumor, pior o prognóstico. Assim, é a medida de prognóstico considerada mais importante, pois permite uma estimativa individual do risco de metástases regionais ou à distância e da sobrevida (BRESLOW, 1970).

## QUADRO II

## CLASSIFICAÇÃO DE BRESLOW PARA O MELANOMA CUTÂNEO

CLASSIFICAÇÃO DE BRESLOW
até 0,75 mm
0,76 a 1,5 mm
1,51 a 4,0 mm
acima de 4,0 mm

A classificação mais difundida e aceita atualmente para o estadiamento do melanoma cutâneo é a compilada pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e pela União Internacional de Combate ao Câncer (UICC) (Quadro III) (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1992).

QUADRO III

ESTADIAMENTO DO MELANOMA CUTÂNEO DE ACORDO COM O AJCC/UICC

ESTÁDIO	pTNM <sup>1</sup>	DESCRIÇÃO
0	pTis <sup>2</sup>	melanoma <i>in situ</i> (Clark I)
I	pT1 N0 M0	tumor confinado à derme papilar (Clark II) ou até 0,75 mm
	pT2 N0 M0	tumor atingindo a junção papilorrreticular (Clark III) ou de 0,76 a 1,5 mm
II	pT3a	tumor com invasão da derme reticular (Clark IV) ou de 1,51 a 3 mm
	pT3 N0 M0 pT3b	tumor com invasão da derme reticular (Clark IV) ou de 3,1 a 4 mm
III	pT4a	tumor com invasão da hipoderme (Clark V) ou acima de 4 mm
	pT4 N0 M0 pT4b	satelitose
	pT* <sup>3</sup> N1 M0	adenopatia regional menor que 3 cm no maior diâmetro
	N2a	adenopatia regional maior que 3 cm no maior diâmetro
IV	pT* N2 M0	metástase em trânsito
	N2b	ambos (N2a e N2b)
	N2c	
IV	M1a	metástase para a pele, tecido celular subcutâneo ou adenopatia não regional
	pT* N* <sup>4</sup> M1 M1b	metástase visceral

<sup>1</sup>: segundo a Classificação TNM dos Tumores Malignos (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1989), T representa a extensão do tumor primário, N as metástases em linfonodos regionais, M as metástases à distância e p a classificação histopatológica pós-operatória; <sup>2</sup>: tumor *in situ*; <sup>3</sup>: qualquer T; <sup>4</sup>: qualquer N.

A cirurgia constitui-se no recurso de primeira linha no tratamento da lesão primária e das metástases locorregionais e sistêmicas do melanoma cutâneo (ARIEL, 1981; ROSES e col, 1983; CASCINELLI, BELLI, VAGLINI e LOVO, 1991; BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1992; EVANS e MANSON, 1994).

A ressecção cirúrgica da lesão primária deve ser ampla, tridimensional e envolver uma margem de tecido sadio. Essa margem de segurança é diretamente proporcional ao microestadiamento do tumor e pode variar entre 1 e 3 cm (NEADES, ORR, HUGHES e HORGAN, 1993).

Na presença de linfonodos regionais metastáticos, está indicada a linfadenectomia regional radical (COIT, 1992a; COIT, 1992b; KARAKOUSIS, 1992; SPIRO e SPIRO, 1992). A ressecção cirúrgica também é empregada em metástases viscerais únicas e em metástases cutâneas, subcutâneas e linfáticas, desde que tecnicamente factível, levando-se em consideração o tamanho e o número das mesmas (ARIEL, 1981; ROSES e col, 1983; AMARAL, SEBEN, ZANOTELLI, LUZ JÚNIOR, SILVA, VAZ e CAMARGO, 1986; EVANS e MANSON, 1994).

Embora os avanços da terapia adjuvante - quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, hormonioterapia - tenham sido grandes nos últimos anos, até o momento não existe protocolo que seja suficientemente efetivo para ser recomendado como rotina no tratamento do melanoma cutâneo em seus estágios iniciais (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1992; STEFFENS e LIVINGSTON, 1992; EVANS e MANSON, 1994).

Já no melanoma avançado, o tratamento quimioterápico sistêmico pode ser empregado, porém não causa aumento significativo na sobrevida; 20 a 25% dos pacientes tratados terão uma resposta parcial e apenas 1% terá resposta efetiva e durável. A dacarbazina, utilizada de forma isolada, é a única droga citotóxica que tem demonstrado taxas consistentes de resposta que variam entre 15 e 25%.

Entretanto essa resposta em geral é parcial, de poucos meses e principalmente em metástases de tecidos moles. Outras drogas têm sido estudadas, como as nitrosuréias, a cisplatina e o taxol, porém nenhuma demonstrou superioridade em relação à dacarbazina. Vários estudos cooperativos, combinando múltiplas drogas, têm demonstrado aumento na toxicidade sem elevação significativa da resposta (GOLOMB, 1985; CREAGAN, 1989; LAKHANI, SELBY e BLISS, 1990; KOH, 1991; BUZAID e MURREN, 1992; GUERRY e SCHUCHTER, 1992; EVANS e MANSON, 1994).

O papel da radioterapia no tratamento do melanoma cutâneo é limitado e tem relação direta com a dose empregada e com a extensão e localização do tumor. Sua maior indicação é para o tratamento paliativo de metástases sintomáticas em ossos, cérebro e raque (BLAKE, CATTERALL e ERVINGTON, 1985; COOPER, 1985).

A imunoterapia é outra alternativa para o melanoma cutâneo. O tratamento com o bacilo Calmette-Guerin (BCG) e com a *Corynebacterium parvum* mostrou resposta em estudos não randomizados no passado. Contudo esse tratamento foi abandonado, pois nenhum estudo randomizado mostrou resposta efetiva (EVANS e MANSON, 1994). Recentes trabalhos sobre o emprego de uma vacina autóloga antimelanoma em pacientes portadores de melanoma cutâneo com alto risco para o desenvolvimento de doença metastática, que estimula a produção de anticorpos antimelanoma, mostraram aumento no intervalo livre de doença. Contudo as taxas de sobrevida não foram alteradas (EVANS e MANSON, 1994). Resposta objetiva em pacientes com doença metastática foi observada com a utilização de modificadores da resposta biológica, como o  $\alpha$ -interferon, a interleucina-2 e os linfócitos *killer* ativados, isolados ou associados a fármacos citotóxicos, porém com taxas não superiores a 20% (BUZAID e MURREN, 1992; RICHARDS, GILEWSKI, RAMMING, MITCHEL, DOANE

e VOGELZANG, 1992; STEFFENS e LIVINGSTON, 1992; EVANS e MANSON, 1994; FOPPOLI, CITTERIO, POLASTRI e GUERRIERI, 1994; ATZPODIEN, HÄNNINEN, KIRCHNER, FRANZKE, KÖRFER, VOLKENANDT, DUENSING, SCHOMBURG, CHAITCHIK e POLIWODA, 1995).

Os resultados insatisfatórios obtidos com as modalidades de tratamento tradicionais do melanoma cutâneo metastático têm estimulado a realização de estudos experimentais com novos métodos. A busca de drogas alternativas ou complementares para o tratamento do melanoma cutâneo, principalmente nos estágios avançados, tem ocasionado um grande número de publicações na área. Uma modalidade terapêutica promissora é a que explora a manipulação hormonal através da utilização de hormônios ou substâncias correlatas.

No câncer de mama, por exemplo, a dependência hormonal é um fato reconhecido há mais de um século. O grau dessa dependência e as variações de resposta terapêutica à manipulação hormonal são também conhecidos e explorados há longo tempo. Está bem estabelecido, nos dias atuais, que pelo menos uma fração dos tumores mamários é hormônio-dependente e, desta forma, responsiva à hormonioterapia. A resposta depende da presença de receptores hormonais nas células neoplásicas (ARNAUD, 1995; KARDINAL, 1995).

Os receptores hormonais são proteínas que se ligam aos hormônios com graus variáveis de afinidade e especificidade. São encontrados nas células neoplásicas, que muitas vezes dependem da estimulação hormonal para expressar suas manifestações fenotípicas. No câncer de mama, foram identificados receptores hormonais para estrógenos e para progesterona (MONTORO, 1995; WITTLIFF, 1995).

A determinação desses receptores hormonais permite identificar grupos que mais provavelmente responderão à terapêutica hormonal. Além disso, essa

dosagem tem valor prognóstico, pois as pacientes que apresentam receptores positivos evoluem e respondem melhor a todas as formas de tratamento; sua presença é um sinal indicativo de tumor mais diferenciado (MONTORO, 1995; WITTLIFF, 1995).

Os critérios gerais de seleção de pacientes com câncer de mama para hormonioterapia são os seguintes: doença recorrente de crescimento lento, particularmente em pele e tecidos moles (excluído o carcinoma inflamatório) e ossos, intervalo livre de doença superior a 2 anos, idade acima de 35 anos e resposta objetiva à manipulação endócrina prévia. Metástases hepáticas, pulmonares e cerebrais são mais resistentes à manipulação endócrina (ARNAUD, 1995; KARDINAL, 1995).

Nas pacientes que menstruam regularmente, a ablação, através da castração cirúrgica, é geralmente recomendada como tratamento endócrino de primeira linha. Já nas pós-menopáusicas, o tratamento aditivo com tamoxifeno, um antiestrógeno não-esteróide, é a terapia hormonal mais amplamente usada na atualidade (ARNAUD, 1995; KARDINAL, 1995).

O papel exercido pelos hormônios esteróides no desenvolvimento e disseminação do melanoma cutâneo há muito tem sido objeto de investigação.

A história natural da doença sugere que esses hormônios possam afetar seu comportamento biológico. Reforçam esse conceito de dependência hormonal do melanoma cutâneo as seguintes observações: seu aparecimento é extremamente raro antes da puberdade; seu pico de incidência nas mulheres é bimodal, coincidindo com a menacme e a menopausa; não são incomuns os relatos de rápida disseminação durante a gestação e são encontrados alguns relatos de regressão espontânea após o parto; e o prognóstico do melanoma cutâneo nas mulheres, apesar do estágio da doença e do tratamento instituído, é melhor que nos homens (FISCHER, NEIFELD e LIPPMAN, 1976; CHAUDHURI,

WALKER, BEATTIE e Das GUPTA, 1979; KARAKOUSIS, LOPEZ, BHAKOO, ROSEN, MOORE e CARLSON, 1980).

Em face da premissa de que essa neoplasia maligna possa ter seu comportamento biológico influenciado pelos hormônios esteróides, vários estudos são encontrados utilizando a manipulação hormonal no tratamento do melanoma cutâneo avançado. Essas observações estimulam pesquisas na área, em especial com o tamoxifeno.

## 2. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é avaliar a resposta do melanoma murino B16-F10, desenvolvido experimentalmente em camundongos C57BL/6N, à terapêutica antiestrogênica isolada com tamoxifeno.

### 3. MÉTODO

#### 3.1. AMOSTRA

Foram utilizados 42 camundongos (*Mus domesticus domesticus*) da cepa C57BL/6N, fêmeas, isogênicos, adultos, clinicamente sadios e provenientes do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (ILPC) de São Paulo.

Os animais foram alojados na Divisão de Produção e Experimentação Animal da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde da Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente do Rio Grande do Sul, em sistema convencional, sem controle de temperatura e umidade. Foram mantidos em caixas de polipropileno padrão para camundongo (49 x 34 x 16 cm) com tampas gradeadas de arame galvanizado com tratamento antioxidante, com 5 animais por caixa no máximo. As caixas eram limpas duas vezes por semana, com troca da serragem e alimentação. Utilizava-se serragem esterilizada em autoclave e a alimentação consistiu de ração para camundongo (Purina®) e água fresca permanente.

Os 42 camundongos foram divididos em 2 grupos por alocação casual probabilística. Convencionou-se denominá-los grupo tratamento e grupo controle.

No primeiro dia do experimento (dia 1), foram inoculadas células de melanoma murino em todos os animais.

Os animais do grupo tratamento - 22 camundongos - receberam citrato de tamoxifeno (Zeneca®) a partir do primeiro dia do experimento (dia 1) até a sua morte, e os animais do grupo controle - 20 camundongos - não receberam nenhuma medicação.

## 3.2. PROCEDIMENTOS

### 3.2.1. Cultura Celular

A linhagem celular utilizada foi o melanoma murino B16-F10 proveniente do ILPC e foi cultivada no Laboratório de Cultura de Tecidos da Unidade de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Todo o trabalho foi realizado em condições assépticas, em capela de fluxo laminar com lâmpada ultravioleta (Luwa®), com material estéril e descartável.

Como substrato químico para o cultivo celular, foi utilizado o seguinte meio:

- 1.000 ml de meio de cultura RPMI-1640 com L-glutamina (Cultilab®)
- 100 ml de soro fetal bovino (Cultilab®)
- 40 mg de gentamicina (Schering®)
- 2 g de bicarbonato de sódio 5,6% (Cultilab®)
- 2,38 g de HEPES (Sigma®)

Como substrato físico, foi utilizado frasco de 275 ml para cultura de células, plano e com tampa vedadora (Corning®).

#### • Descongelamento

As células de melanoma murino B16-F10 eram estocadas e congeladas em tanques de nitrogênio líquido, em pequenas alíquotas dentro de frascos criogênicos estéreis de 2 ml, fundo em “u” e com tampa de rosca interna

(Corning®). Para descongelá-las, o frasco criogênico era retirado do nitrogênio líquido e aquecido, sem agitação, em banho-maria a 37°C.

#### • Semeadura

Terminado o descongelamento, o frasco criogênico era lavado com álcool etílico 70% e o seu conteúdo transferido para um tubo de centrifuga de 15 ml, de polipropileno e com tampa vedadora (Corning®), com 2 ml de substrato químico. O tubo era centrifugado (Excelsa Baby I modelo 206 - Fanem®) por 5 min a 1.000 rotações por minuto (rpm). O sobrenadante era desprezado por decantação e todo o excesso do tubo aspirado com auxílio de pipeta Pasteur. Eram adicionados 5 ml de substrato químico ao tubo e as células desprendidas suavemente, batendo-se o tubo na palma da mão. Eram retirados 2,5 ml com seringa e passados para o frasco de cultura celular com 20 ml de substrato químico. O conteúdo do frasco era homogeneizado levemente, observado ao microscópio invertido (Carl Zeiss®) e, a seguir, o frasco era mantido em estufa (Forma Scientific®) a 37°C, com atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e umidade relativa de 100%, com a tampa entreaberta.

#### • Troca do substrato químico

O frasco era observado ao microscópio invertido diariamente. A cada 72 h, ou antes disto se a coloração do substrato químico mudasse (variação do róseo para o alaranjado), era feita a troca do substrato químico antigo. Esse era decantado e substituído por 24 ml de substrato químico novo, com leve homogeneização do conteúdo do frasco e novamente observado ao microscópio invertido. O frasco era recolocado na estufa de CO<sub>2</sub> com a tampa entreaberta.

### • Tripsinização e repique

Quando o frasco ficava repleto de células, o substrato químico era decantado e adicionava-se 1 ml de solução de tripsina-EDTA (Cultilab®), previamente filtrada com filtro 0,22 µm (Millipore®) e aquecida a 37°C. O frasco era homogeneizado e deixado, com a tampa entreaberta, em estufa de CO<sub>2</sub> por 30 seg. As células eram ressuspensas batendo-se vigorosamente o frasco contra a palma da mão e, após, o conteúdo era observado ao microscópio invertido. Eram adicionados 10 ml de substrato químico ao frasco e homogeneizados levemente. O conteúdo era transferido para um tubo de centrifuga e centrifugado por 6 min a 1.000 rpm. O sobrenadante era desprezado por decantação e o precipitado ressuspenso em 6 ml de substrato químico com leve agitação. Eram preparados 2 frascos com 20 ml de substrato químico em cada e adicionados 3 ml da suspensão celular em cada um. O conteúdo era homogeneizado levemente, observado ao microscópio invertido e incubado em estufa de CO<sub>2</sub>, mantendo-se as tampas dos frascos entreabertas.

### • Doses para inoculação

Quando o frasco ficava repleto de células, o substrato químico era decantado. Previamente preparou-se a solução de *phosphate-buffered saline* (PBS) com utilização de ácido acético 2N, ajuste de pH em 7 e conservação a 4°C, com a seguinte composição:

PBS (em 1.000 ml): 8,2 g de NaCl

0,2 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> . 2H<sub>2</sub>O

1,6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> . 12H<sub>2</sub>O

O frasco era lavado duas vezes com 10 ml de PBS, e o restante do conteúdo retirado com pipeta Pasteur. As células eram suspensas com 2 ml de solução de tripsina-EDTA (filtrada e aquecida a 37°C) e mantidas por 30 seg na estufa de CO<sub>2</sub>, com a tampa do frasco entreaberta. As células eram desprendidas, batendo-se vigorosamente o frasco contra a palma da mão, e ressuspensas em 10 ml de PBS. Uma gota era retirada deste conteúdo total de 12 ml e as células eram contadas em câmara de Neubauer. O total de células era calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{total de células} = \frac{\text{número de células contadas}}{8} \times 1.000 \times 12$$

onde: 8 = número de quadriláteros contados na câmara de Neubauer

1.000 = fator de correção (células/ml)

12 = volume total do frasco

O número total de células era dividido por 500.000 (número de células para inoculação em cada animal de experimentação), para se obter o número de doses disponíveis, e centrifugado por 5 min a 3.000 rpm. O sobrenadante era desprezado e o precipitado ressuspenso com 0,2 ml de PBS para cada dose calculada e homogeneizado com pipeta Pasteur. Após, as células eram imediatamente inoculadas nos camundongos.

#### • Congelamento

Quando o frasco ficava repleto de células, o substrato químico era decantado e adicionava-se 1 ml de tripsina-EDTA (filtrada e aquecida a 37°C) ao frasco. O conteúdo do frasco era homogeneizado e novamente decantado.

Adicionava-se mais 1 ml de tripsina-EDTA (filtrada e aquecida a 37°C) e o conteúdo do frasco era novamente homogeneizado e mantido por 30 seg na estufa de CO<sub>2</sub>, com a tampa do frasco entreaberta. As células eram ressuspensas, batendo-se vigorosamente o frasco contra a palma da mão, e, após, observadas ao microscópio invertido.

Como substrato químico para o congelamento, era utilizado o seguinte meio:

solução criopreservante: 18 ml de meio sem soro

2 ml de soro fetal bovino

2 ml de DMSO (Sigma®)

Era acrescentado 1 ml de solução criopreservante, previamente filtrada com filtro 0,22 µm, e todo o conteúdo era transferido para um frasco criogênico, que era mantido por 1 h no *freezer* a -70°C e, após, estocado em nitrogênio líquido.

### 3.2.2. Inoculação

No primeiro dia do experimento (dia 1), foi injetada uma dose individual de 500.000 células de melanoma murino em todos os camundongos. Os animais foram submetidos à contenção manual, e a inoculação foi feita no dorso, por via subcutânea, com seringa de 1 ml e agulha hipodérmica (13 x 0,45 mm) (Figura 1).



Fig. 1 - Detalhe da técnica de inoculação subcutânea das células de melanoma murino no dorso do camundongo

### 3. 2. 3. Tratamento

Todos os animais do grupo tratamento receberam citrato de tamoxifeno a partir do primeiro dia do experimento (dia 1) até a sua morte. A droga era administrada por via oral, em doses diárias de aproximadamente 0,0143 mg, diluída na água para beber.

Essa dose de antiestrógeno foi calculada convertendo-se a dose diária máxima de 40 mg empregada em pacientes com câncer de mama, adultas com peso médio de 70 kg, para o peso médio de 25 g do camundongo C57BL/6N.

Quanto à diluição na água para beber, eram preparados frascos de 350 ml para cada caixa com 5 animais, trocados duas vezes por semana, nos quais era

acrescentada a dose de 0,0143 mg de tamoxifeno para cada 5 ml, que corresponde ao volume médio diário de ingesta hídrica de cada camundongo.

#### 3.2.4. Seguimento

Cada camundongo era acompanhado diariamente desde o momento da inoculação (dia 1) até a sua morte, observando-se o surgimento do tumor, seu desenvolvimento, suas características morfológicas e as condições clínicas do animal.

A sobrevida foi expressa em dias, correspondendo ao dia da morte de cada animal no experimento.

Semanalmente, nos dias 14, 21, 28 e 35 do experimento, mensurou-se o tumor de cada camundongo vivo com régua milimétrica, e o seu volume foi calculado pela fórmula do volume da esfera e pela fórmula do volume do prisma retangular. Para essa mensuração, os animais foram submetidos à sedação com éter anestésico.

fórmula do volume da esfera:  $\frac{4 \times \pi \times r^3}{3}$

onde:  $\pi = 3,1416$

$r$  = raio do maior diâmetro do tumor

fórmula do volume do prisma retangular:  $l1 \times l2 \times l3$

onde:  $l1$  = altura do tumor

$l2$  = comprimento do tumor

$l3$  = largura do tumor

### 3.2.5. Avaliação Histológica

Após a morte dos animais, era feita a excisão completa de cada tumor para avaliação do seu volume e quantificação da necrose tumoral. A médica patologista que realizou as análises não tinha conhecimento dos grupos de estudo a que pertenciam os camundongos.

Mensurou-se o tumor com régua milimétrica, e o volume tumoral foi calculado pela fórmula do volume da esfera e pela fórmula do volume do prisma retangular.

Avaliou-se a necrose a partir da leitura de cortes histológicos obtidos do maior eixo do tumor, abrangendo toda a circunferência do mesmo e compreendendo amostras das regiões central e periférica. Prepararam-se lâminas em número suficiente para que toda a circunferência do tumor fosse amostrada, variando de uma a três. Os cortes foram feitos em micrótomo rotativo (American Optical 820®) com navalhas descartáveis, com 4  $\mu$ m de espessura e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE).

Quantificou-se a necrose tumoral em relação ao seu percentual total (Quadro IV) e à sua distribuição no tumor em central e periférica (Quadro V).

#### QUADRO IV

##### SCORE ATRIBUÍDO AO PERCENTUAL TOTAL DE NECROSE

PERCENTUAL TOTAL DE NECROSE NO TUMOR
0 a 20% - 1
21 a 40% - 2
41 a 60% - 3
61 a 80% - 4
81 a 100% - 5

## QUADRO V

ESCORE ATRIBUÍDO À NECROSE CENTRAL E À NECROSE PERIFÉRICA

LOCALIZAÇÃO DA NECROSE NO TUMOR	
NECROSE CENTRAL	NECROSE PERIFÉRICA
ausente - 1 pequena quantidade - 2 grande quantidade - 3	ausente - 1 pequena quantidade - 2 grande quantidade - 3

## 3.2.6. Análise Estatística

Na análise da sobrevida dos grupos em estudo, foi utilizada a técnica de análise de sobrevida pelo método de *Kaplan-Meier* com teste de *Log Rank* para comparação entre curvas. Já na análise do volume e da necrose tumoral, foi empregado o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* para duas amostras independentes. O nível de significância utilizado foi  $\alpha = 0,05$ . Os dados foram processados através dos programas estatísticos Epi-Info (versão 6.0) e SPSS (versão 6.0).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. SOBREVIDA

A sobrevida do grupo controle apresentou mediana de 29,5 dias, variando entre 18 e 52 (amplitude de 34 dias). O grupo tratamento apresentou mediana de 23,9 dias, oscilando entre 21 e 40 (amplitude de 19 dias). A comparação entre as curvas de sobrevida dos dois grupos não mostrou diferença estatisticamente significativa pelo teste de *Log Rank* ( $\chi^2 = 0,59$ ;  $p = 0,4430$ ) (Figura 2).

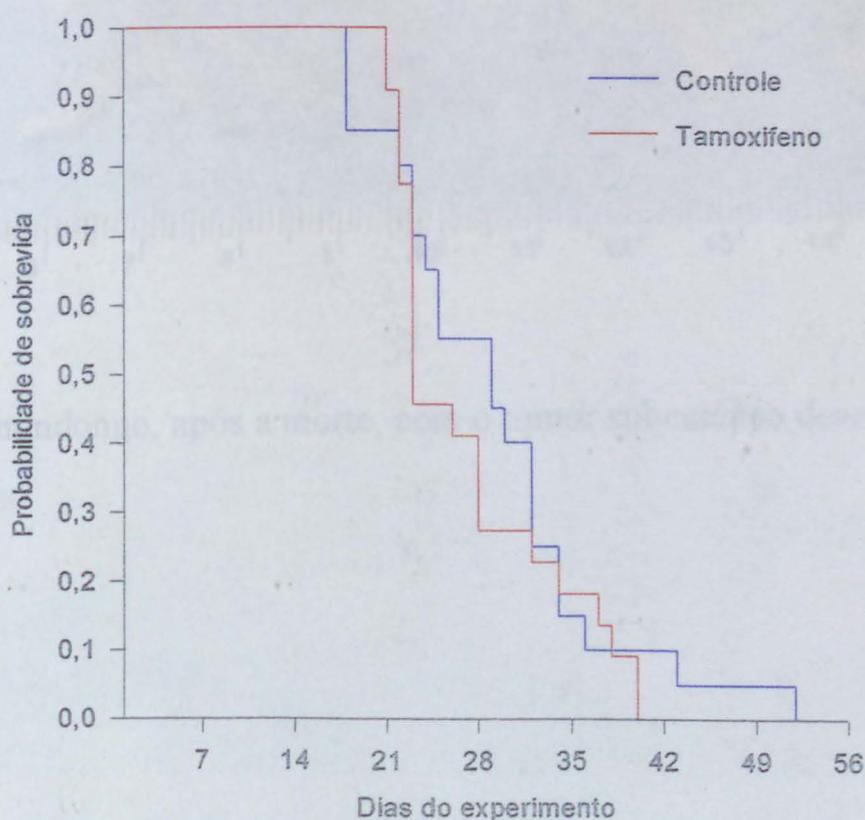


Fig. 2 - Curvas de sobrevida dos grupos em estudo

#### 4.2. VOLUME TUMORAL

As Figuras de 3 a 7 ilustram aspectos relativos aos tumores nos animais de experimentação após a morte.



Fig. 3 - Camundongo, após a morte, com o tumor subcutâneo desenvolvido no dorso

Fig. 5 - Detalhe do tumor mostrando sua localização subcutânea



Fig. 4 - Toracolaparotomia no camundongo evidenciando ausência de metástases torácicas e abdominais



Fig. 5 - Detalhe do tumor mostrando sua localização subcutânea



Fig. 6 - Tumor completamente excisado mostrando sua relação com o tamanho do camundongo



Fig. 7 - Detalhe do tumor excisado para avaliação histológica

A Tabela I exibe a mediana do volume tumoral ( $\text{cm}^3$ ) dos camundongos nos grupos controle e tratamento, calculado pela fórmula do volume da esfera, nos dias 14, 21, 28 e 35 do experimento, bem como no dia da morte dos animais.

TABELA I

MEDIANA DO VOLUME TUMORAL ( $\text{CM}^3$ ), CALCULADO PELA FÓRMULA DO VOLUME DA ESFERA, SEGUNDO O DIA DA MENSURAÇÃO E O GRUPO EM ESTUDO

GRUPO EM ESTUDO	DIA DA MENSURAÇÃO				
	14	21	28	35	óbito
controle	0,80	8,18	22,45	33,51	31,12
tratamento	4,19	22,45	22,45	18,30	32,29
<i>significância</i>	$p = 0,0502$	$p = 0,0045$	$p = 0,5913$	$p = 0,2888$	$p = 0,7141$

A Tabela II traz os mesmos dados, porém calculados pela fórmula do volume do prisma retangular.

TABELA II

MEDIANA DO VOLUME TUMORAL ( $\text{CM}^3$ ), CALCULADO PELA FÓRMULA DO VOLUME DO PRISMA RETANGULAR, SEGUNDO O DIA DA MENSURAÇÃO E O GRUPO EM ESTUDO

GRUPO EM ESTUDO	DIA DA MENSURAÇÃO				
	14	21	28	35	óbito
controle	0,68	4,80	22,54	30,00	25,80
tratamento	2,80	11,63	17,10	17,75	21,45
<i>significância</i>	$p = 0,0343$	$p = 0,0088$	$p = 0,5183$	$p = 0,2888$	$p = 0,5144$

A comparação entre os dois grupos mostrou diferença estatisticamente significativa apenas nas mensurações feitas nos dias 14 e 21 do experimento, tanto pela fórmula do volume da esfera como pela fórmula do volume do prisma retangular, onde os tumores do grupo tratamento apresentaram volumes maiores.

A Figura 8 mostra as curvas de crescimento tumoral em ambos os grupos ao longo do experimento, através da mediana do volume tumoral ( $\text{cm}^3$ ) dos camundongos nos grupos controle e tratamento, calculado pela fórmula do volume da esfera, nos dias 14, 21, 28 e 35 do estudo.

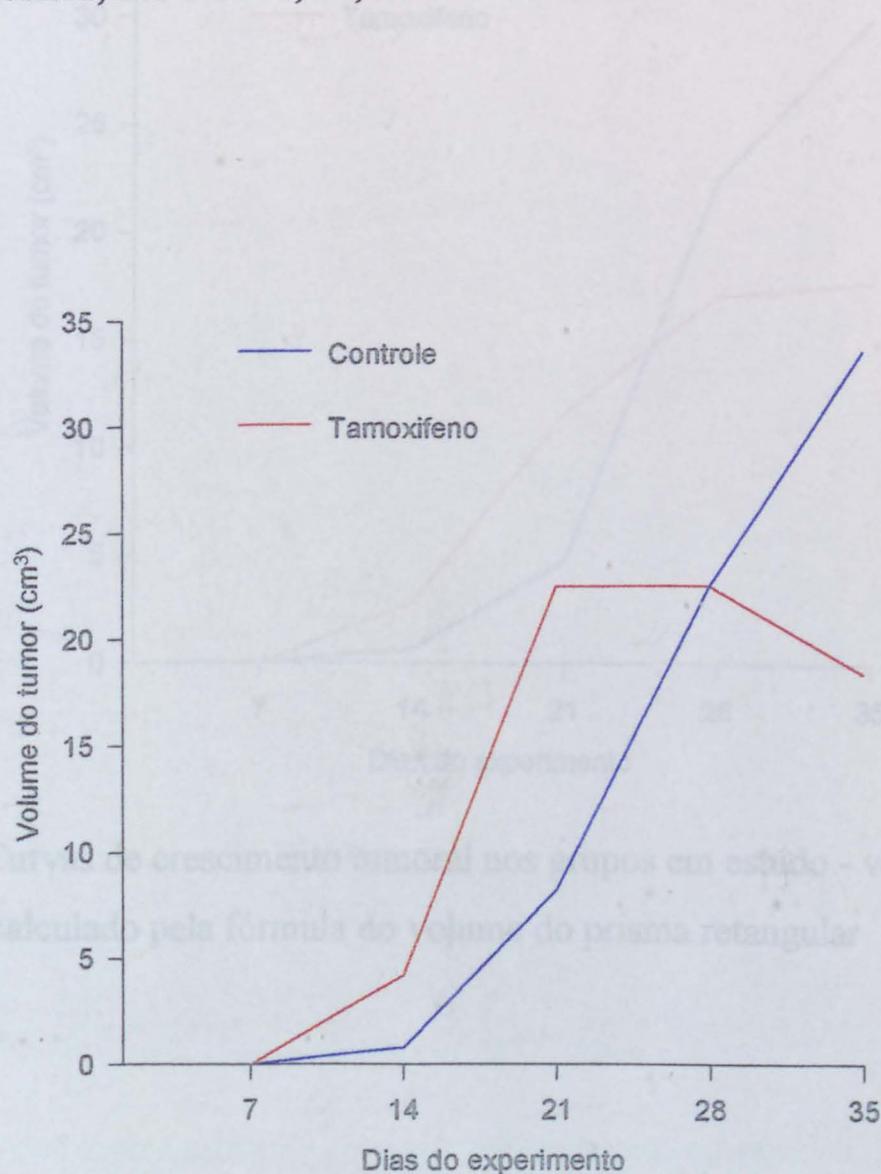


Fig. 8 - Curvas de crescimento tumoral nos grupos em estudo - volume tumoral calculado pela fórmula do volume da esfera

A Figura 9 traz as mesmas curvas, porém obtidas com a fórmula do volume do prisma retangular.

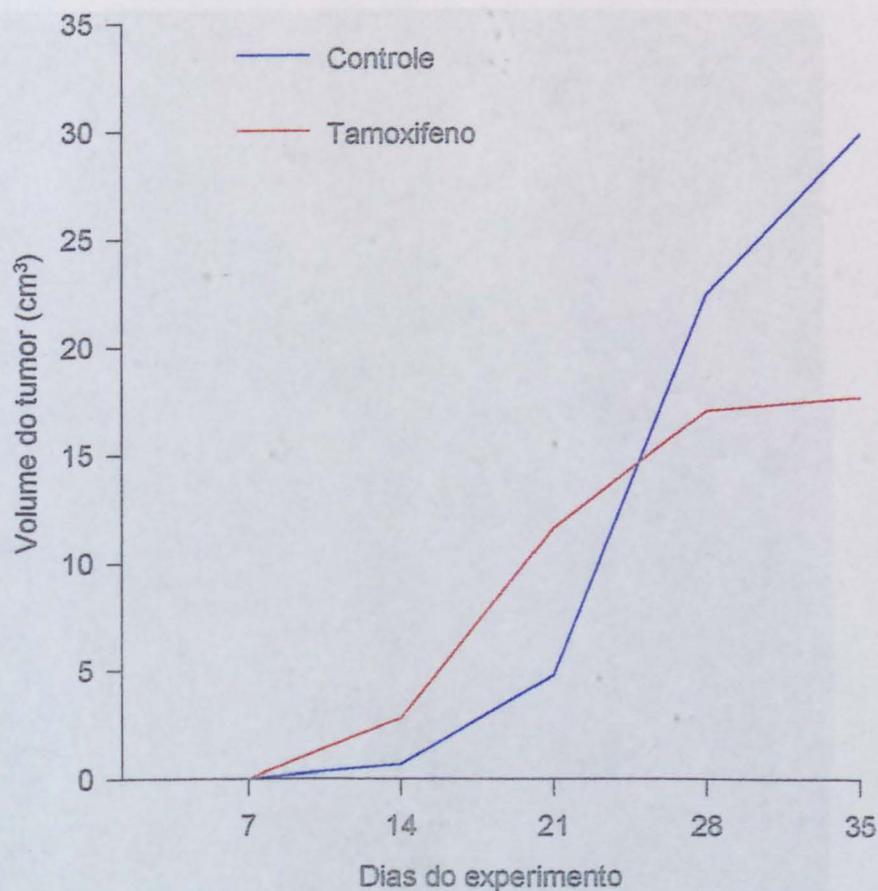


Fig. 9 - Curvas de crescimento tumoral nos grupos em estudo - volume tumoral calculado pela fórmula do volume do prisma retangular

Fig. 10 - Fotomicrografias (100x) mostrando o percentual total de necrose do tumor (a: ausente, b: 0 a 20%, c: 21 a 40%, d: 41 a 60%, e: 61 a 80%, f: 81 a 100%)

### 4.3. NECROSE TUMORAL

As Figuras 10, 11 e 12 mostram aspectos relacionados à necrose tumoral à microscopia óptica.

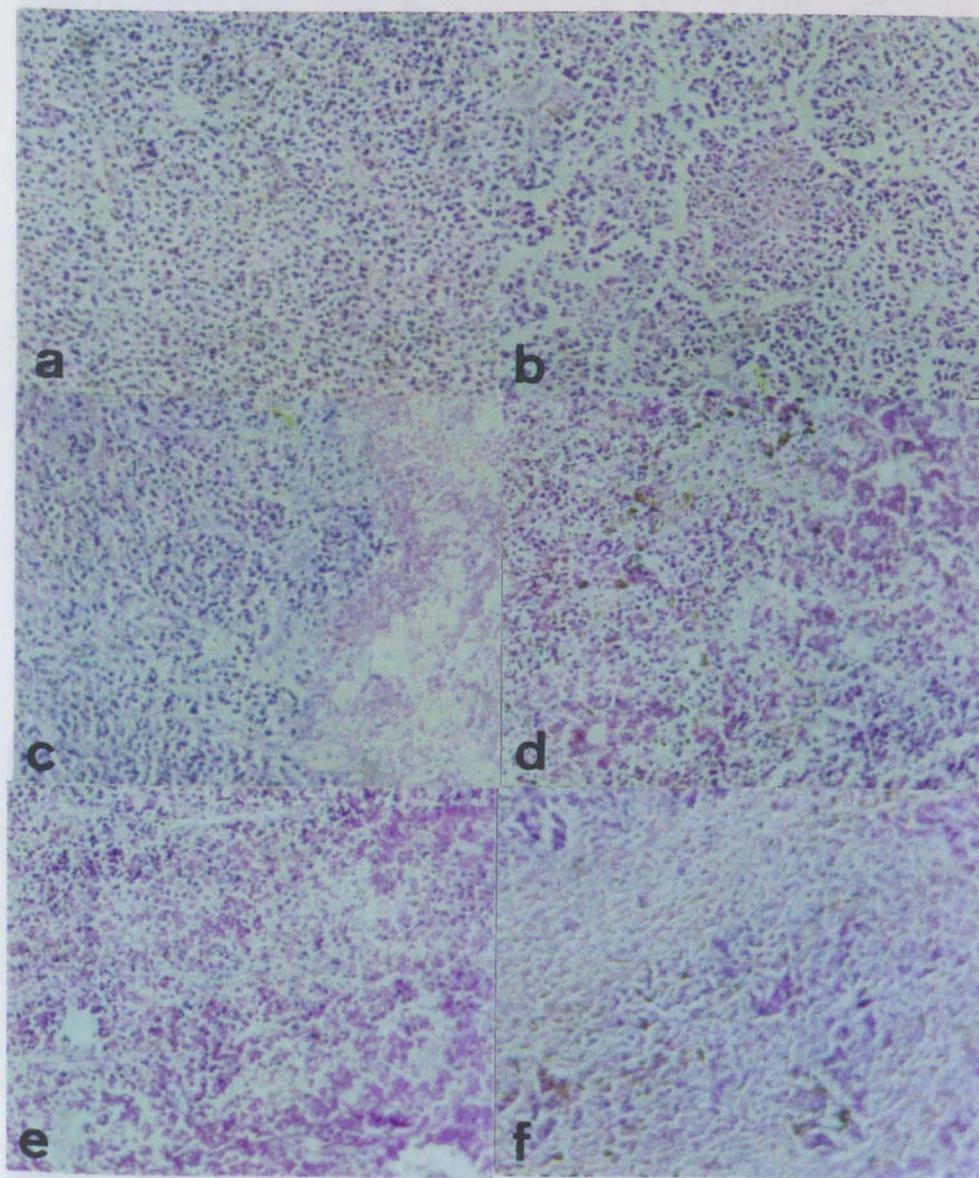


Fig. 10 - Fotomicrografias (100x) mostrando o percentual total de necrose no tumor (a: ausente; b: 0 a 20%; c: 21 a 40%; d: 41 a 60%; e: 61 a 80%; f: 81 a 100%)

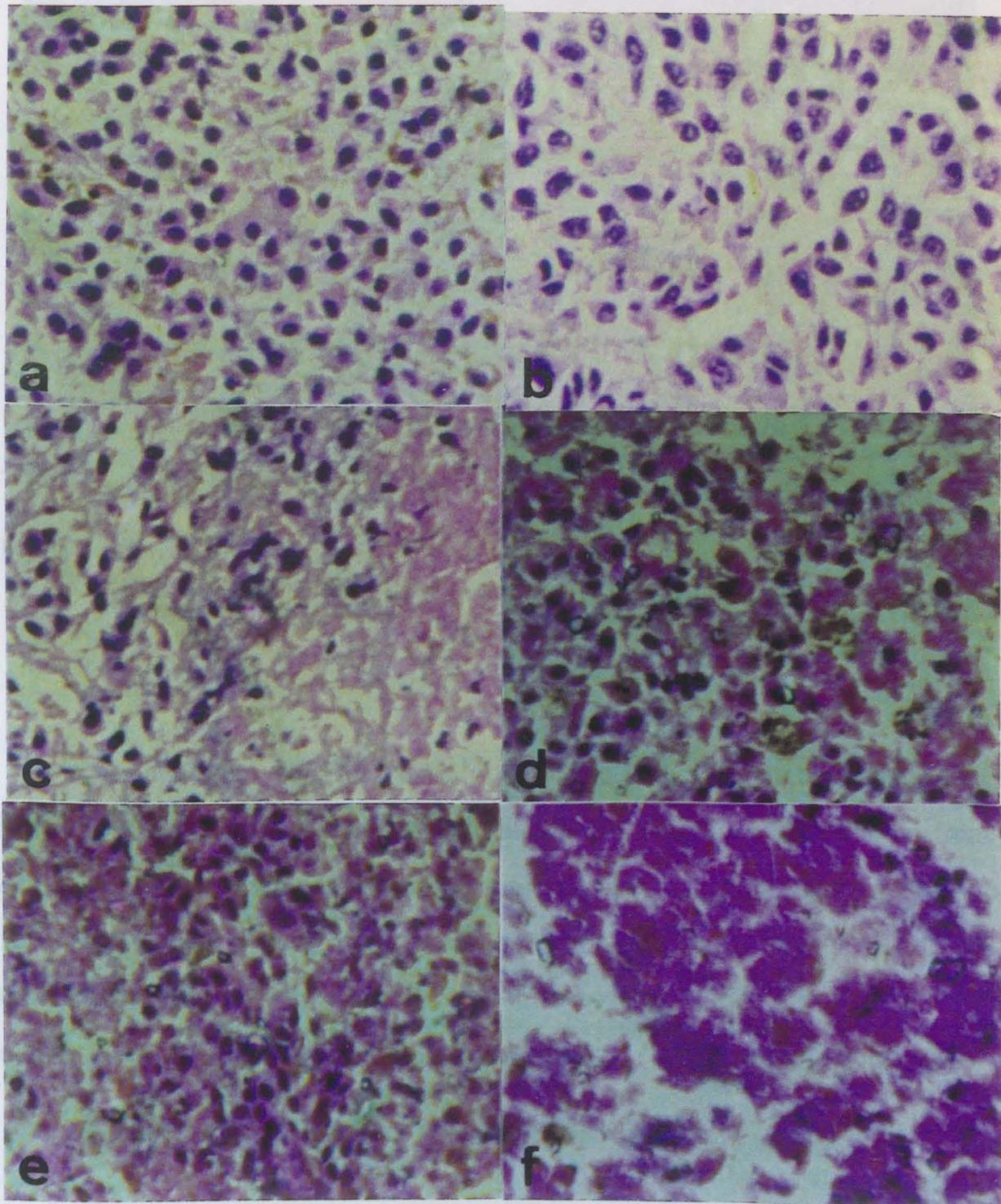


Fig. 11 - Fotomicrografias (400x) mostrando o percentual total de necrose no tumor (a: ausente; b: 0 a 20%; c: 21 a 40%; d: 41 a 60%; e: 61 a 80%; f: 81 a 100%)

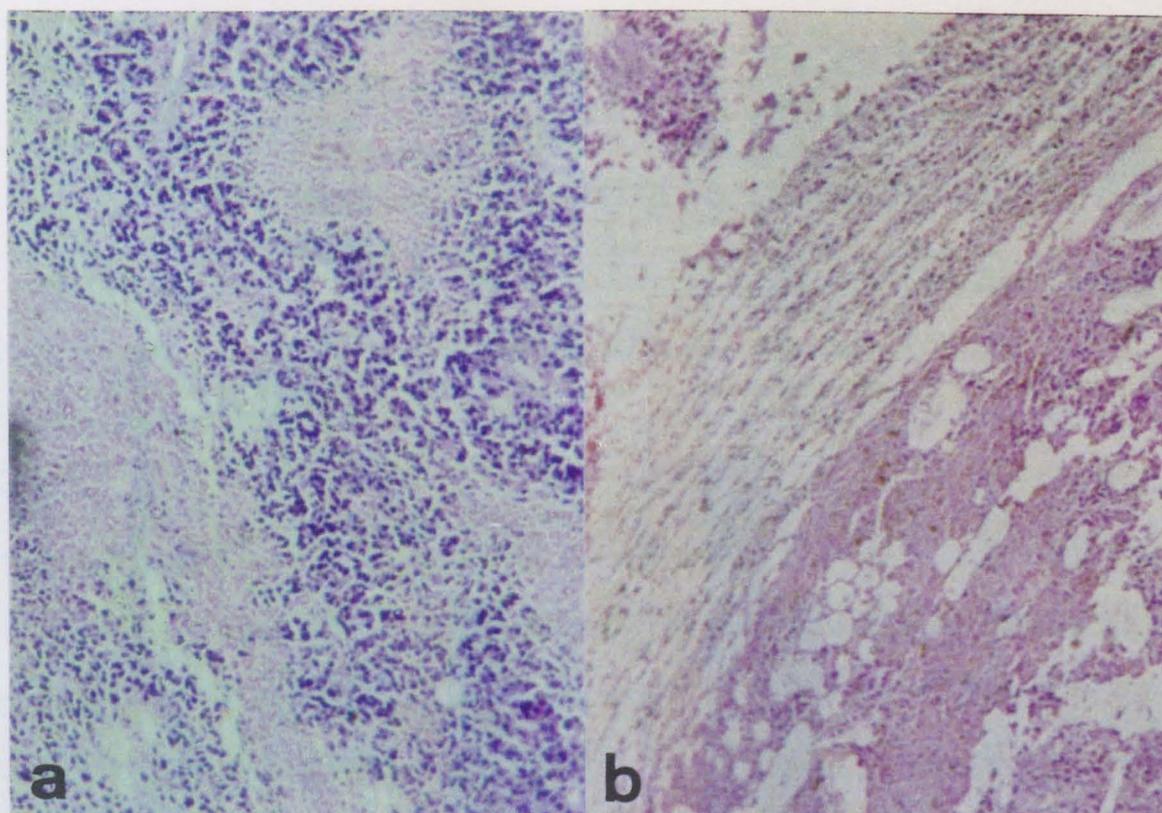


Fig. 12 - Fotomicrografias (100x) mostrando a localização da necrose no tumor  
(a: central; b: periférica)

A comparação entre os dois grupos mostrou diferença estatisticamente significativa em todos os quesitos estudados. Em relação ao percentual total de necrose, o grupo controle teve mediana de 2 e o grupo tratamento, de 4 ( $p < 0,0001$ ); quanto à necrose central, a mediana no grupo controle foi de 2 e no grupo tratamento, de 3 ( $p < 0,0001$ ); já a necrose periférica apresentou mediana de 1 no grupo controle e de 2 no grupo tratamento ( $p < 0,0001$ ) (Figura 13).

## 5. DISCUSSÃO

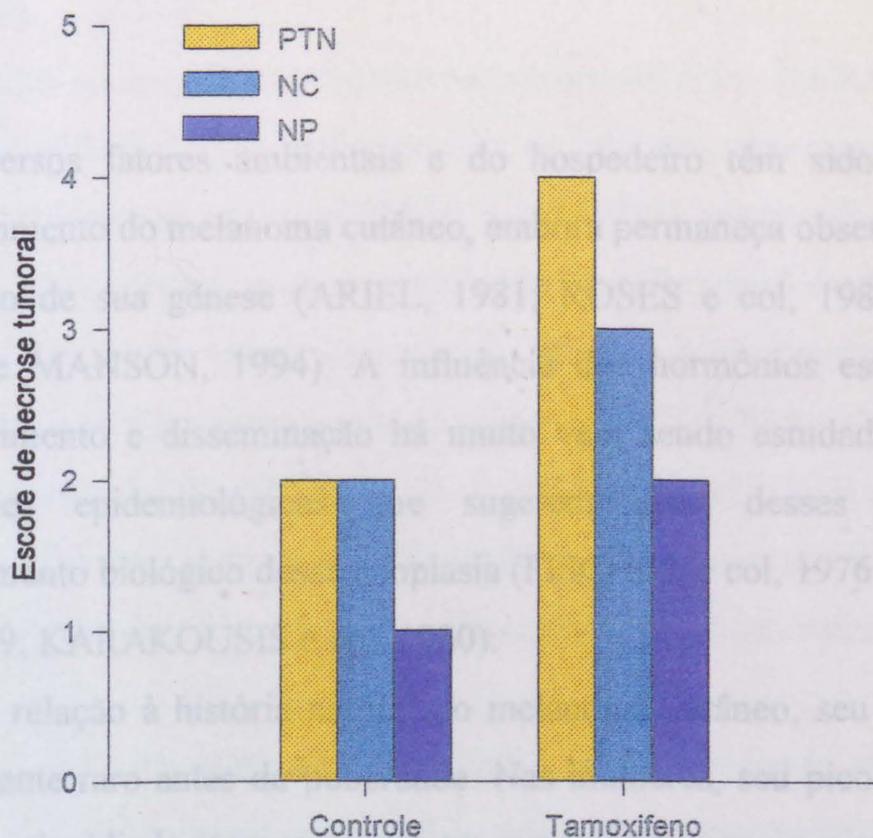


Fig. 13 - Necrose tumoral nos grupos em estudo (PTN: percentual total de necrose; NC: necrose central; NP: necrose periférica)

Um estudo realizado nas Ilhas Britânicas mostrou que a incidência desse tumor nas mulheres é duas vezes maior, sugerindo um certo grau de dependência hormonal no seu desenvolvimento (STOICA e col, 1997). O prognóstico do melanoma cutâneo nas mulheres, independentemente do estágio da doença e do tratamento instituído, é melhor que nos homens (FISCHER, e col, 1976; CHAUDHURI e col, 1979; KARAKOUSIS e col, 1980).

Durante a gestação são comuns os relatos de rápida disseminação metastática e são encontrados alguns casos de regressão espontânea do tumor

## 5. DISCUSSÃO

Diversos fatores ambientais e do hospedeiro têm sido associados ao desenvolvimento do melanoma cutâneo, embora permaneça obscuro o verdadeiro mecanismo de sua gênese (ARIEL, 1981; ROSES e col, 1983; KOH, 1991; EVANS e MANSON, 1994). A influência dos hormônios esteróides no seu desenvolvimento e disseminação há muito vem sendo estudada, ancorada em observações epidemiológicas que sugerem ação desses hormônios no comportamento biológico dessa neoplasia (FISCHER e col, 1976; CHAUDHURI e col, 1979; KARAKOUSIS e col, 1980).

Em relação à história natural do melanoma cutâneo, seu aparecimento é extremamente raro antes da puberdade. Nas mulheres, seu pico de incidência é bimodal, coincidindo com a menacme e a menopausa, e a maior incidência ocorre nas quarta e quinta décadas de vida, período em que a atividade dos hormônios esteróides está aumentada (FISCHER e col, 1976; CHAUDHURI e col, 1979; KARAKOUSIS e col, 1980; STOICA, HOFFMAN, MARTA e VOICULETZ, 1991).

Um estudo realizado nas Ilhas Britânicas mostrou que a incidência desse tumor nas mulheres é duas vezes maior, sugerindo um certo grau de dependência hormonal no seu desenvolvimento (STOICA e col, 1991). O prognóstico do melanoma cutâneo nas mulheres, independentemente do estágio da doença e do tratamento instituído, é melhor que nos homens (FISCHER, e col, 1976; CHAUDHURI e col, 1979; KARAKOUSIS e col, 1980).

Durante a gestação são comuns os relatos de rápida disseminação metastática e são encontrados alguns casos de regressão espontânea do tumor

após o parto (FISCHER e col, 1976; CHAUDHURI e col, 1979; KARAKOUSIS e col, 1980).

Quanto ao uso de contraceptivos hormonais orais, KARAKOUSIS e col (1980) evidenciaram que mulheres que os utilizam têm uma incidência de melanoma cutâneo mais alta. STOICA e col (1991), porém, demonstraram que seu uso parece contribuir para uma evolução mais favorável da doença. Também são referidas taxas de sobrevida mais elevadas em mulheres múltiparas do que em nulíparas e pior prognóstico após a menopausa (STOICA e col, 1991).

Em contraposição, SLINGLUFF Jr. e REINTGEN (1993) afirmam que são mínimos ou ausentes o impacto da gestação e o uso de contraceptivos hormonais orais e de hormônios exógenos na incidência e prognóstico do melanoma cutâneo.

HEHIR, DAWSON e PARBHOO (1992), mediante relatos de casos clínicos, comentam a associação entre carcinoma de mama e melanoma cutâneo, ressaltando uma possível dependência hormonal de ambas as neoplasias.

Estudos *in vitro* e *in vivo* são de fundamental importância para o melhor entendimento do comportamento biológico das neoplasias e para o desenvolvimento de métodos diagnósticos e terapêuticos. A cultura de células e a utilização de animais de experimentação são modelos experimentais vantajosos para testar um grande número de drogas e selecionar compostos específicos para diferentes tipos tumorais (BEATTIE, TISSOT e AMOSS, 1988; KREUTZ, 1992).

No presente estudo, o autor pretendeu avaliar a resposta do melanoma murino, desenvolvido experimentalmente em camundongos, à terapêutica antiestrogênica isolada com tamoxifeno.

A linhagem celular selecionada para o presente experimento foi o melanoma murino B16-F10 proveniente do ILPC. A técnica de cultura celular



adotada para o cultivo das células foi a mesma empregada no ILPC (FRESHNEY, 1988).

O camundongo C57BL/6N, animal de experimentação utilizado neste trabalho, tem pelagem negra, peso médio de 25 g e vive 2 anos em média. O acasalamento pode ser feito entre irmãos logo após o desmame (isogênicos) ou a partir de 54 a 60 dias de vida, quando o roedor atinge a idade adulta. A média de parição por fêmea é de 5 filhotes, com período gestacional de 21 dias. É um animal dócil e de fácil manipulação (UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 1982).

A inoculação intraperitoneal de uma dose de 500.000 células de melanoma murino B16-F10 implica o desenvolvimento de um tumor sólido que ocupa toda a cavidade abdominal em poucos dias, freqüentemente com envolvimento metastático do mediastino. Em 2 semanas, em média, o camundongo morre por insuficiência respiratória restritiva. Com a inoculação subcutânea da mesma dose de células, provoca-se o desenvolvimento de um nódulo hipodérmico que se torna palpável em torno de 1 a 2 semanas. Esse nódulo evolui para um tumor sólido, de grandes dimensões, que pode ulcerar a pele. O surgimento de metástases sistêmicas é incomum. Em 4 a 5 semanas, em média, o camundongo morre; o peso do tumor dificulta a locomoção do animal e conseqüentemente sua alimentação, levando-o ao óbito por inanição. Quando a inoculação é feita no dorso do camundongo, o tumor provoca restrição da caixa torácica e também ocasiona insuficiência respiratória restritiva. Essas observações foram feitas durante o projeto piloto do presente estudo.

No presente experimento, a opção pela via subcutânea se deve ao fato de ter-se um tempo maior para observação dos efeitos do fármaco em estudo entre a inoculação e o óbito.

Experimentalmente, SNYDER e Das GUPTA (1977) administraram estrógenos a *hamsters* fêmeas com melanoma e constataram maior crescimento tumoral, sugerindo uma provável dependência hormonal desse tumor.

LOPEZ, BHAKOO, PAOLINI, ROSEN, HOLYOKE e GOLDROSEN (1978) também administraram estrógenos experimentalmente a camundongos C57BL/6J com melanoma B16 e observaram que existe um efeito dose-dependente positivo no desenvolvimento tumoral e nas taxas de metástases pulmonares. A manipulação cirúrgica (ooforectomia) não afetou o melanoma B16, porém o uso de um antiestrógeno (nafoxidina) exerceu influência negativa em seu desenvolvimento.

CHAUDHURI e col (1979), investigando algumas linhagens celulares de melanoma humano *in vitro*, demonstraram que a administração quer de estrógenos quer de progesterona pode exercer tanto um efeito negativo como positivo no seu crescimento.

SCHLEICHER, HITSELBERGER e BEATTIE (1987), estudando o melanoma de *hamster* HM-1, evidenciaram inibição do crescimento de células em cultura com a utilização de estrógeno e tamoxifeno, bem como inibição do crescimento tumoral em ratos atímicos BALB/c-nu/nu com a administração de estrógeno e nafoxidina.

AMOSS Jr., RONAN e BEATTIE (1988) constataram diminuição do crescimento de melanoma exofítico congênito suíno após submeterem fêmeas da raça *Sinclair* à ooforectomia. Os mesmos autores (BEATTIE, RONAN e AMOSS Jr., 1991), administrando estrógeno a esse grupo em estudo, constataram o efeito inverso.

Similarmente ao presente trabalho, LOPEZ e col (1978) utilizaram a mesma linhagem celular de melanoma, o camundongo C57BL/6J como animal de experimentação e a mesma via de inoculação, porém com dose menor

(100.000 células). O tamanho do tumor foi avaliado pelo peso e volume. De forma semelhante, SCHLEICHER e col (1987) e FEUCHT, WALKER, Das GUPTA e BEATTIE (1988) inocularam as células de melanoma por via subcutânea e o tamanho do tumor foi mensurado pelo volume. AMOSS Jr. e col (1988) e BEATTIE e col (1991) também utilizaram o volume para avaliar o tamanho do tumor.

A opção da via oral para administração de tamoxifeno aos camundongos do grupo tratamento no presente estudo foi feita em face das facilidades técnicas que esta via oferece quando comparada às vias intravenosa, intraperitoneal e subcutânea. Sabe-se que o volume médio diário de ingesta hídrica para cada animal gira em torno de 5 ml e a esse volume foi acrescentado 0,0143 mg de antiestrógeno. Foram preparados frascos de 350 ml para cada caixa com 5 camundongos, trocados duas vezes por semana. Dessa forma, evitou-se a manipulação diária dos animais para administração do fármaco em estudo, o que não ocorreria se outra via fosse escolhida. Em contraposição, tanto LOPEZ e col (1978) como SCHLEICHER e col (1987) administraram as drogas em estudo por via hipodérmica.

Quanto à avaliação do efeito do tamoxifeno sobre o tamanho do tumor, a exemplo de LOPEZ e col (1978), SCHLEICHER e col (1987), AMOSS Jr. e col (1988) e BEATTIE e col (1991), utilizou-se a mensuração indireta do volume tumoral no presente experimento. Como os tumores subcutâneos excisados tinham formato ovóide, optou-se pela utilização da fórmula do volume da esfera para sua mensuração mais precisa. A fórmula do volume do prisma retangular foi testada como alternativa, pois alguns tumores não possuíam formato totalmente esférico. Contudo a comparação entre as duas formas de mensuração não mostrou diferença.

Clinicamente, FISCHER e col (1976) relatam que pacientes com doença disseminada apresentaram respostas objetivas após manipulação endócrina, incluindo administração de estrógenos ou andrógenos e hipofisectomia.

KARAKOUSIS e col (1980), também em um estudo clínico, referem que alguns pacientes apresentam recidiva neoplásica ou o desenvolvimento de outro melanoma cutâneo após a administração de estrógenos.

WALKER, RONAN, HAN, BEATTIE e Das GUPTA (1991) afirmam que a presença de receptores estrogênicos em pacientes com melanoma cutâneo, mormente em mulheres, estaria diretamente associada a um aumento no intervalo livre de doença. Nesse estudo, ainda, os autores não encontraram relação entre o aumento no intervalo livre de doença e as características histológicas do tumor. Portanto, fortalecendo a hipótese de influência hormonal no comportamento biológico dessa neoplasia.

A propósito de receptores estrogênicos, tem-se tentado relacionar sua presença em pacientes com melanoma cutâneo com o prognóstico da doença, como no câncer de mama. Contudo a identificação desses receptores suscita controvérsias na literatura, dependendo do tipo de análise laboratorial realizada.

Experimentalmente, SNYDER e Das GUPTA (1977), estudando melanomas de *hamster*, e CHAUDHURI e col (1979), analisando algumas imagens celulares de melanoma humano *in vitro*, detectaram receptores estrogênicos através de análises bioquímicas.

Também foram encontrados os mesmos resultados com testes bioquímicos, porém em tumores humanos, nos trabalhos de FISCHER e col (1976), KARAKOUSIS e col (1980) e STOICA e col (1991).

Já McCARTY Jr., WORTMAN, STOWERS, LUBAHN, McCARTY e SEIGLER (1980) e COHEN, DeROSE, CAMPBELL, SCHLOSNAGLE e

SGOUTAS (1990) não identificaram receptores hormonais com os mesmos testes bioquímicos em melanomas cutâneos humanos.

Quando foram empregadas técnicas imunoistoquímicas com anticorpos monoclonais (FLOWERS, SEIGLER, McCARTY, KONRATH e McCARTY Jr., 1987; COHEN e col, 1990; LECAVALIER, FROM e GAID, 1990; DUNCAN, TRAVERS, KOERNER, MIHM Jr. e SOBER, 1994) e técnicas histoquímicas (COHEN e col, 1990), também não houve a demonstração dos receptores estrogênicos em espécimes humanos.

Acredita-se, atualmente, que a aparente capacidade de ligação de estrógenos com células de melanoma cutâneo é o resultado da interação de outras substâncias, que necessitam ser melhor elucidadas, não se devendo à presença de receptores hormonais específicos (FLOWERS e col, 1987; COHEN e col, 1990; LECAVALIER e col, 1990; DUNCAN e col, 1994).

Em analogia ao câncer de mama e em face das evidências sugestivas de dependência hormonal do melanoma cutâneo, a terapêutica antiestrogênica, em especial com o tamoxifeno, desponta como alternativa promissora e suscita investigação.

Nas duas últimas décadas, o tamoxifeno tem se tornado o agente hormonal mais amplamente usado em pacientes com câncer de mama avançado. Está indicado em pacientes pós-menopáusicas com doença metastática e receptor estrogênico positivo. É um agente ativo em pacientes pré-menopáusicas, embora seu valor seja menos bem documentado. O percentual de resposta parece ser comparável àquele relatado para ablação ovariana; contudo, não existem dados firmes indicando sua equivalência. Também pode ser empregado como terapia adjuvante, em pacientes após a menopausa, para prevenir as recorrências da doença (ARNAUD, 1995; KARDINAL, 1995; HARDMAN, LIMBIRD, MOLINOFF, RUDDON e GILMAN, 1996).

O mecanismo de ação desse antiestrógeno não-esteróide vem sendo progressivamente elucidado e compreende atividades como: bloqueio reversível da fase G0-G1 do ciclo celular, determinando uma ação citostática ao se ligar aos receptores hormonais; redução da secreção do fator transformante de crescimento celular alfa, que age estimulando a proliferação celular; aumento da secreção do fator transformante de crescimento celular beta, que age inibindo a proliferação das células; ligação aos sítios de ligação antiestrogênica, aumentando a concentração celular do tamoxifeno; aumento das globulinas carreadoras dos hormônios esteróides, diminuindo a quantidade de estrógeno passível de entrar nas células; e aumento do número de *natural killers*, que é uma subpopulação de linfócitos T relacionada com a imunidade antitumoral (ARNAUD, 1995; HARDMAN e col, 1996).

A toxicidade é mínima e transitória e dificilmente é tão grave que exija a interrupção do tratamento. As reações adversas mais freqüentes são náuseas, vômitos e fogachos (25%). Eritema cutâneo, edema, ganho ponderal, sangramento vaginal e testes laboratoriais da função hepática alterados ocorrem com uma freqüência inferior a 3%. Distúrbios visuais transitórios são raros, menos de 1%. Trombocitopenia, leucopenia e hipercalcemia podem ocorrer em aproximadamente 5%. O efeito estrogênico do tamoxifeno pode diminuir os níveis de antitrombina III circulante, predispondo efeitos tromboembólicos. A freqüência cumulativa de câncer endometrial infiltrante, em mulheres recebendo tamoxifeno, é de 0,5%, comparado com 0,1% em um grupo controle (ARNAUD, 1995; KARDINAL, 1995; HARDMAN e col, 1996).

A dose padrão de tamoxifeno preconizada para o tratamento hormonal de pacientes com câncer de mama avançado, administrada por via oral, é 20 mg diários. Não ocorrendo resposta satisfatória após 1 ou 2 meses, pode-se aumentar a dose para 40 mg diários (ARNAUD, 1995; KARDINAL, 1995; HARDMAN e

col, 1996). Levando-se em conta o peso médio de 70 kg de uma mulher adulta e convertendo-se a dose máxima de tamoxifeno para o peso médio de 25 g do camundongo C57BL/6N, chegou-se à dose diária de 0,0143 mg para cada animal no presente estudo.

Em humanos, com a administração oral de tamoxifeno, não se atinge uma concentração sérica estável antes de 4 semanas de tratamento (KARDINAL, 1995). Por este motivo, optou-se pela administração do antiestrógeno aos camundongos desde o primeiro dia do experimento (dia 1), e não somente quando houvesse sinais clínicos de desenvolvimento tumoral.

KARAKOUSIS e col (1980), em um estudo clínico fase II, selecionaram dezessete pacientes com melanoma cutâneo estágio IV, cujos protocolos de quimioterapia haviam falhado, e administraram 40 mg diários de tamoxifeno. Três pacientes do sexo feminino apresentaram resposta: duas com resposta completa e uma com 50% de resposta parcial. Os autores consideraram os resultados promissores.

MASIEL, BUTTRICK e BITRAN (1981) trataram cinco pacientes (quatro homens e uma mulher) com melanoma cutâneo estágio III refratários a quimioterapia e a imunoterapia. O tamoxifeno foi administrado em doses diárias de 20 mg. Dois pacientes, ambos do sexo masculino, apresentaram resposta parcial por seis e oito meses respectivamente. Nesse estudo clínico fase II, os autores também interpretaram os resultados como encorajadores.

Utilizando a mesma dose de antiestrógeno, LEICHMAN, SAMSON e BAKER (1982) conduziram outro estudo clínico fase II com vinte pacientes (onze homens e nove mulheres) portadores de melanoma cutâneo disseminado e já tratados com quimioterapia ou imunoterapia. Somente um paciente, após quatro semanas de tratamento, apresentou resposta parcial por apenas três semanas. Os autores consideraram o tamoxifeno não efetivo.

A análise de doze estudos clínicos fase II do início da década de 80, onde foi utilizado o tamoxifeno isoladamente no tratamento do melanoma cutâneo avançado, mostrou resposta completa em cinco pacientes e parcial em dez, de um total de duzentos e treze. No sexo feminino, 10% das pacientes reagiram de forma positiva comparativamente a 6% dos homens, e quatro mulheres apresentaram resposta completa contra apenas um homem. A maioria das pacientes que respondeu ao tamoxifeno era pós-menopáusicas (RÜMKE, KLEEGERG, MacKIE, LEJEUNE, PLANTING, BRÖCKER, BIERHORST e LENTZ, 1992).

RÜMKE e col (1992) acompanharam cento e dois pacientes do sexo feminino, pós-menopáusicas, com melanoma cutâneo metastático, em mais um estudo clínico fase II. A dose diária de tamoxifeno empregada foi de 40 mg. A taxa de resposta foi de 4,9% e houve resposta completa em 1% das pacientes. Não houve diferença entre os grupos em relação à quimioterapia prévia. A resposta foi mais evidente em pacientes com metástases de crescimento lento em tecidos moles. Os autores concluíram que o tamoxifeno estaria indicado em pacientes pós-menopáusicas, com metástases de crescimento lento, preferentemente em tecidos moles e em pequeno número, e que ainda não fossem candidatas a quimioterapia.

Experimentalmente, FEUCHT e col (1988) demonstraram que o tamoxifeno não afeta o crescimento das linhagens celulares de melanoma humano UISO-MEL-1, UISO-MEL-2 e UISO-MEL-4.

Estudando culturas de células de melanoma humano T-289, McCLAY, ALBRIGHT, JONES, EASTMAN, CHRISTEN e HOWELL (1992b), McCLAY, ALBRIGHT, JONES, CHRISTEN e HOWELL (1993a), McCLAY, ALBRIGHT, JONES, CHRISTEN e HOWELL (1993c) e McCLAY, ALBRIGHT, JONES, CHRISTEN e HOWELL (1994) concluíram que existe interação entre o

tamoxifeno e a cisplatina nessa linhagem celular. O tamoxifeno possui atividade bioquímica sinérgica com a cisplatina, modulando a sensibilidade e a resistência das células tumorais a esta. Esse sinergismo também foi demonstrado *in vivo* (McCLAY, McCLAY, ALBRIGHT, JONES, CHRISTEN, ALCARAZ e HOWELL, 1993b).

Segundo FISCHER, BARBÉ, BERLION, FORMENTO, BERRILE, BIZZARI e MILANO (1993), o tamoxifeno aumenta *in vitro* o efeito citotóxico da fotemustina em linhagens celulares de melanoma humano.

No presente experimento não foram observadas modificações na sobrevida e no volume tumoral do grupo tratamento, apenas nas mensurações feitas nos dias 14 e 21 do estudo, onde os tumores apresentaram volumes maiores. Os índices de necrose tumoral, no entanto, foram maiores nesse grupo.

Os estudos clínicos envolvendo a associação do antiestrógeno com drogas quimioterápicas no tratamento do melanoma cutâneo avançado iniciaram com DEL PRETE, MAURER, O'DONNELL, JACKSON FORCIER e Le MARBRE (1984). Esses autores obtiveram taxas de 20% de resposta completa e 35% de resposta parcial com a associação de dacarbazina, cisplatina, carmustina e tamoxifeno.

McCLAY, MASTRANGELO, BELLET e BERD (1987), em seu primeiro estudo fase II, trataram vinte pacientes com dacarbazina, cisplatina, carmustina e tamoxifeno, este último numa dose diária de 20 mg continuamente; 15% dos pacientes apresentaram resposta completa e 35% resposta parcial. Como 30% dos pacientes apresentaram fenômenos tromboembólicos secundários à administração do antiestrógeno, o tamoxifeno foi excluído em seu segundo estudo fase II, porém apenas 10% dos vinte pacientes apresentaram resposta, 5% completa e 5% parcial (McCLAY, MASTRANGELO, SPRANDIO, BELLET e BERD, 1989a). Os autores, então, reincorporaram o tamoxifeno em

seu terceiro estudo fase II, com dose diária de 20 a 40 mg continuamente, e observaram resposta completa em 8% e parcial em 44% dos vinte e cinco pacientes estudados (McCLAY, MASTRANGELO, BELLET e BERD, 1989b). Cabe ressaltar que não houve seleção dos pacientes para inclusão nos três estudos, como, por exemplo, local das metástases, tratamentos prévios e *performance status*, apenas a presença de doença metastática.

Posteriormente, McCLAY, MASTRANGELO, BELLET e BERD (1992a) compararam os resultados obtidos nos pacientes com melanoma cutâneo avançado incluídos nos três estudos prévios (McCLAY, 1987; McCLAY, 1989a; McCLAY, 1989b). Os pacientes foram divididos em dois grupos: no primeiro, aqueles que receberam tamoxifeno e, no segundo, aqueles que não receberam. No grupo tratado, 11% dos pacientes apresentaram resposta completa e 40%, resposta parcial. No outro grupo, somente 5% dos pacientes apresentaram resposta completa e 5%, resposta parcial. Em ambos os grupos, a taxa de sobrevida foi semelhante e não houve aumento da mesma.

BUZAID, MURREN e DURIVAGE (1991) avaliaram, em um estudo clínico fase II, a associação de altas doses de dacarbazina e cisplatina com altas doses de tamoxifeno. Este foi administrado numa dose diária de 200 mg por sete dias, antes do primeiro ciclo de quimioterapia e, após, numa dose diária de 20 mg até o fim do tratamento. A atividade das drogas, segundo os autores, foi desapontadora. Dos vinte e três pacientes com melanoma cutâneo metastático, houve resposta completa em dois e resposta parcial em um; a duração da resposta foi de quatro, doze e quatro meses respectivamente.

A *University of South Florida* e o *H. Lee Moffitt Melanoma Center and Research Institute* apresentaram dois estudos clínicos fase II com o emprego da associação dacarbazina, cisplatina, carmustina e tamoxifeno. No primeiro estudo, doze pacientes de alto risco para o desenvolvimento de recorrência da doença

foram tratados de forma adjuvante após a ressecção cirúrgica da metástase locorregional ou à distância. A dose diária de tamoxifeno foi de 20 mg continuamente. Apesar de não ocorrer mudança na taxa de sobrevida, os resultados mostraram aumento do intervalo livre de doença no grupo tratado, comparado com o grupo controle (SABA, CRUSE, WELLS, KLEIN e REINTGEN, 1992a).

No segundo estudo, quatorze pacientes com melanoma cutâneo estágio IV foram tratados. A dose diária de tamoxifeno foi de 20 mg continuamente. Houve resposta completa em 21% e resposta parcial em 7% dos pacientes. A taxa de sobrevida em 300 dias no grupo tratado foi de 48% e, no grupo controle, de 27%; nos pacientes que responderam ao tratamento foi de 83% e nos que não responderam, de 22% (SABA, CRUSE, WELLS, KLEIN e REINTGEN, 1992b).

Em um estudo clínico fase III, COCCONI, BELLA, CALABRESI, TONATO, CANALETTI, BONI, BUZZI, CECI, CORGNA, COSTA, LOTTICI, PAPADIA, SOFRA e BACCHI (1992) avaliaram cento e dezessete pacientes com melanoma cutâneo metastático. O primeiro grupo, tratado com dacarbazina e tamoxifeno na dose diária de 10 mg continuamente, foi composto por sessenta e dois pacientes, e o segundo grupo, tratado apenas com dacarbazina, compunha-se de cinquenta e cinco pacientes. As taxas de resposta foram de 28% e 12% e as de sobrevida média de 48 e 29 semanas, respectivamente, para o primeiro e segundo grupo. Entre as mulheres, ambas as taxas foram melhores com a associação do tamoxifeno; entre os homens não houve diferença. Dos pacientes que receberam antiestrógeno, as mulheres responderam melhor que os homens; entre os pacientes que não receberam tamoxifeno não houve diferença.

McKEAGE, LORENTZOS e GORE (1993), em um relato pessoal, observaram resposta objetiva em quatro de dezesseis pacientes com melanoma

cutâneo avançado tratados com cisplatina e tamoxifeno (20 mg/dia), administrados com ou sem dacarbazina, dependendo do uso prévio da mesma.

REINTGEN e SABA (1993), em um estudo clínico fase II, investigaram quarenta e sete pacientes com melanoma cutâneo estágio IV tratados com dacarbazina, cisplatina, carmustina e tamoxifeno. A dose diária de antiestrógeno foi de 20 mg continuamente. Houve resposta completa em 13% e resposta parcial em 23% dos pacientes. A taxa de sobrevida foi maior nos pacientes tratados que no grupo controle, principalmente nos que apresentaram resposta clínica.

PUNT, TYTGAT, Van LIESSUM e GERARD (1995) realizaram um estudo clínico fase II em treze pacientes com melanoma cutâneo metastático, utilizando fotemustina com altas doses de tamoxifeno. A dose diária do antiestrógeno foi de 160 mg durante quatorze dias no primeiro ciclo e durante sete dias nos ciclos subseqüentes. Duas pacientes do sexo feminino apresentaram resposta completa.

Depreende-se, então, que a utilização do tamoxifeno no tratamento do melanoma cutâneo avançado não está de todo bem estabelecida. Mais estudos são necessários para que se conheça melhor seu verdadeiro mecanismo de ação. Ao que tudo indica, os melhores resultados obtidos com o antiestrógeno aparecem quando empregado em combinação com outras drogas quimioterápicas, abrindo perspectivas futuras promissoras.

## 6. CONCLUSÃO

Nas condições experimentais do presente estudo, a terapêutica antiestrogênica isolada com tamoxifeno em camundongos C57BL/6N com melanoma murino B16-F10 não modificou a sobrevida e o volume tumoral (apenas nas mensurações feitas nos dias 14 e 21 do experimento, onde os tumores do grupo tratamento apresentaram volumes maiores), porém propiciou aumento nas taxas de necrose tumoral total, central e periférica.

## 7. REFERÊNCIAS

AMARAL, R.L.; SEBEN, R.L.; ZANOTELLI, M.L.; LUZ JÚNIOR, P.N.; SILVA, G.M.C.; VAZ, M.; CAMARGO, E.G. - Melanoma cutâneo com metástases intestinais. Relato de dois casos. *Revista HCPA*, 6:111-4,1986.

AMOSS Jr., M.S.; RONAN, S.G.; BEATTIE, C.W. - Growth of Sinclair swine melanoma as a function of age, histopathological staging, and gonadal status. *Cancer Res.*, 48:708-11,1988.

ARIEL, I.M. - *Malignant melanoma*. New York, Appleton-Century-Crofts, 1981. 536p.

ARMSTRONG, B.K. - Epidemiology of malignant melanoma: intermittent or total accumulated exposure to the sun. *J. Dermatol. Surg. Oncol.*, 14:835-49,1988.

ARNAUD, D.G. - Tratamento hormonal do câncer de mama. In: CHAVES, E. - *Câncer de mama: diagnóstico, tratamento e prognóstico*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1995. p.177-81.

ATZPODIEN, J.; HÄNNINEN, E.L.; KIRCHNER, H.; FRANZKE, A.; KÖRFER, A.; VOLKENANDT, M.; DUENSING, S.; SCHOMBURG, A.; CHAITCHIK, S.; POLIWODA, H. - Chemoimmunotherapy of advanced malignant melanoma: sequential administration of subcutaneous interleukin-2 and interferon- $\alpha$  after intravenous dacarbazine and carboplatin or intravenous dacarbazine, cisplatin, carmustine and tamoxifen. *Eur. J. Cancer*, 31A:876-81,1995.

BEATTIE, C.W.; TISSOT, R.; AMOSS, M. - Experimental models in human melanoma research: a logical perspective. *Sem. Oncol.*, 15:500-11,1988.

BEATTIE, C.W.; RONAN, S.G.; AMOSS Jr., M.S. - Estrogens influence the natural history of Sinclair swine cutaneous melanoma. *Cancer Res.*, 51:2025-8,1991.

BLAKE, P.R.; CATTERALL, M.; ERVINGTON, R.D. - Treatment of malignant melanoma by fast neutrons. *Br. J. Surg.*, 72:517-19,1985.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA NACIONAL DE PROGRAMAS ESPECIAIS DE SAÚDE. DIVISÃO NACIONAL DE DOENÇAS CRÔNICO-DEGENERATIVAS. - *TNM: classificação dos tumores malignos*. 4.ed. Brasília, Ministério da Saúde, 1989. 197p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCa). COORDENAÇÃO DE PROGRAMAS DE CONTROLE DE CÂNCER (Pro-Onco). - *Oncologia hoje: melanoma*. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde, 1992. 28p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA NACIONAL DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCa). COORDENAÇÃO DE PROGRAMAS DE CONTROLE DE CÂNCER (Pro-Onco). - *Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional*. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde, 1995. v.2.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA NACIONAL DE ASSISTÊNCIA À SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. COORDENAÇÃO DE PROGRAMAS DE CONTROLE DE CÂNCER - Pro-Onco. - *Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 1996*. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde, 1996. 19p.

BRESLOW, A. - Thickness, cross-sectional area and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann. Surg.*, 172:902-8,1970.

BUZAID, A.C.; MURREN, J.R.; DURIVAGE, H.J. - High-dose cisplatin with dacarbazine and tamoxifen in the treatment of metastatic melanoma. *Cancer*, 68:1238-41,1991.

BUZAID, A.C. & MURREN, J.R. - Chemotherapy for advanced malignant melanoma. *Int. J. Clin. Lab. Res.*, 21:205-9,1992.

CASCINELLI, N.; BELLI, F.; VAGLINI, M.; LOVO, G.F. - Tumores cutáneos. In: VERONESI, U. - *Cirugía oncológica*. Buenos Aires, Panamericana, 1991. p.768-805.

CHAUDHURI, P.K.; WALKER, M.J.; BEATTIE, C.W.; Das GUPTA, T.K. - Endocrine correlates of human malignant melanoma. *J. Surg. Res.*, 26:214-9,1979.

CLARK, W.H.; FROM, L.; BERNARDINO, E.A.; MIHM, M.C. - The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanoma of the skin. *Cancer Res.*, 29:705-26,1969.

COCCONI, G.; BELLA, M.; CALABRESI, F.; TONATO, M.; CANALETTI, R.; BONI, C.; BUZZI, F.; CECI, G.; CORGNA, E.; COSTA, P.; LOTTICI, R.; PAPADIA, F.; SOFRA, M.C.; BACCHI, M. - Treatment of metastatic malignant melanoma with dacarbazine plus tamoxifen. *N. Engl. J. Med.*, 327:516-23,1992.

COHEN, C.; DeROSE, P.B.; CAMPBELL, W.G.; SCHLOSNAGLE, D.C.; SGOUTAS, D. - Estrogen receptor status in malignant melanoma. *Am. J. Dermatopathol.*, 12:562-4,1990.

COIT, D.G. - Extent of groin dissection for melanoma. *Surg. Onc. Clin. N. Am.*, 1:271-80,1992a.

COIT, D.G. - Prognostic factors in patients with melanoma metastatic to regional nodes. *Surg. Onc. Clin. N. Am.*, 1:281-95,1992b.

COOPER, J.S. - Radiotherapy of malignant melanoma. Symposium on melanoma and pigmented lesions. *Dermatol. Clin.*, 3:341-50,1985.

CREAGAN, E.T. - Regional and systemic strategies for metastatic malignant melanoma. *Mayo Clin. Proc.*, 64:852-60,1989.

Del PRETE, S.A.; MAURER, L.H.; O'DONNELL, J.; JACKSON FORCIER, R.; Le MARBRE, P. - Combination chemotherapy with cisplatin, carmustine, dacarbazine and tamoxifen in metastatic melanoma. *Cancer Treat. Rep.*, 68:1403-5,1984.

DUNCAN, L.M.; TRAVERS, R.L.; KOERNER, F.C.; MIHM Jr., M.C.; SOBER, A.J. - Estrogen and progesterone receptor analysis in pregnancy-associated melanoma: absence of immunohistochemically detectable hormone receptors. *Hum. Pathol.*, 25:36-41,1994.

EVANS, G.R.D. & MANSON, P.N. - Review and current perspectives of cutaneous malignant melanoma. *J. Am. Col. Surg.*, 178:523-40,1994.

FEUCHT, K.A.; WALKER, M.J.; Das GUPTA, T.K.; BEATTIE, C.W. - Effect of 17 $\beta$ -estradiol on the growth of estrogen receptor-positive human melanoma *in vitro* and *in vivo* athymic mice. *Cancer Res.*, 48:7093-101,1988.

FISCHEL, J.L.; BARBÉ, V.; BERLION, M.; FORMENTO, P.; BERRILE, J.; BIZZARI, J.P.; MILANO, G. - Tamoxifen enhances the cytotoxic effects of the nitrosourea fotemustine. Results on human melanoma cell lines. *Eur. J. Cancer*, 29A:2269-73,1993.

FISHER, R.I.; NEIFELD, J.P.; LIPPMAN, M.E. - Oestrogen receptors in human malignant melanoma. *Lancet*, 14:337-9,1976.

FLOWERS, J.L.; SEIGLER, H.F.; McCARTY, K.S.; KONRATH, J.; McCARTY Jr., K.S. - Absence of estrogen receptor in human melanoma as evaluated by a monoclonal antiestrogen receptor antibody. *Arch. Dermatol.*, 123: 764-5,1987.

FOPPOLI, M.; CITTERIO, G.; POLASTRI, D.; GUERRIERI, R. - The feasibility of repetitive courses of high-dose continuous intravenous infusion interleukin-2 and subcutaneous alpha-interferon with polychemotherapy in advanced malignant melanoma. *Tumori*, 81:102-6,1994.

FRESHNEY, R.I. - *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 2.ed. New York, Alan R. Liss, 1988. 287p.

GOLOMB, F.M. - Chemotherapy of melanoma. *Dermatol. Clin.*, 3:335-40,1985.

GUERRY, D. & SCHUCHTER, L.M. - Disseminated melanoma - is there a new standard therapy? *N. Engl. J. Med.*, 327:560-1,1992.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G. - *Goodman and Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics*. 9.ed. New York, McGraw-Hill, 1996. 1905p.

HEHIR, D.J.; DAWSON, K.J.; PARBHOO, S.P. - Primary breast carcinoma in patients with malignant melanoma. *Eur. J. Surg. Oncol.*, 18:77-9,1992.

JORNAL ZERO HORA. - *O Rio Grande em 29 gráficos*. Porto Alegre, RBS, 1993(maio). 32p.

KARAKOUSIS, C.P.; LOPEZ, R.E.; BHAKOO, H.S.; ROSEN, F.; MOORE, R.; CARLSON, M. - Estrogen and progesterone receptors and tamoxifen in malignant melanoma. *Cancer Treat. Rep.*, 64:819-27,1980.

KARAKOUSIS, C.P. - Technique of lymphadenectomy for melanoma. *Surg. Onc. Clin. N. Am.*, 1:157-93,1992.

KARDINAL, C.G. - Endocrine therapy of breast cancer. In: DONEGAN, W.L. & SPRATT, J.S. - *Cancer of the breast*. 4.ed. Philadelphia, Saunders, 1995. p.534-80.

KOH, H.K.; KLIGLER, B.E.; LEW, R.A. - Sunlight and cutaneous malignant melanoma. *Photochem. Photobiol.*, 51:765-79,1990.

KOH, H.K. - Cutaneous melanoma, review article. *N. Engl. J. Med.*, 325:171-82,1991.

KOPE, A.W.; KRIPKE, M.L.; STERN, R.S. - Sun and malignant melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 11:674-84,1984.

KREUTZ, F.T. - O laboratório de biologia tumoral - a cultura de células e os xenotransplantes. In: FLECK, J. - *Câncer: integração Clínico-biológica*. Rio de Janeiro, MEDSI, 1992. p.337-52.

LAKHANI, S.; SELBY, P.; BLISS, J.M. - Chemotherapy for malignant melanoma: combinations and high doses produce more responses without survival benefit. *Br. J. Cancer*, 61:330-34,1990.

LECAVALIER, M.A.; FROM, L.; GAID, N. - Absence of estrogen receptors in dysplastic nevi and malignant melanoma. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 23:242-6,1990.

LEICHMAN, C.G.; SAMSON, M.K.; BAKER, L.H. - Phase II trial of tamoxifen in malignant melanoma. *Cancer Treat. Rep.*, 66:1447,1982.

LOPEZ, R.E.; BHAKOO, H.; PAOLINI, N.S.; ROSEN, F.; HOLYOKE, E.D.; GOLDROSEN, M.H. - Effect of estrogen on the growth of B-16 melanoma. *Surg. Forum*, 29:153-4,1978.

MASIEL, A.; BUTTRICK, P.; BITRAN, J. - Tamoxifen in the treatment of malignant melanoma. *Cancer Treat. Rep.*, 65:531-2,1981.

McCARTY Jr., K.S.; WORTMAN, J.; STOWERS, S.; LUBAHN, D.B.; McCARTY, K.S.; SEIGLER, H.F. - Sex steroid receptor analysis in human melanoma. *Cancer*, 46:1463-70,1980.

McCLAY, E.F.; MASTRANGELO, M.J.; BELLET, R.E.; BERD, D. - Combination chemotherapy and hormonal therapy in the treatment of malignant melanoma. *Cancer Treat. Rep.*, 71:465-9,1987.

McCLAY, E.F.; MASTRANGELO, M.J.; SPRANDIO, J.D.; BELLET, R.E.; BERD, D. - The importance of tamoxifen to a cisplatin containing regimen in the treatment of metastatic melanoma. *Cancer*, 63:1292-5,1989a.

McCLAY, E.F.; MASTRANGELO, M. J.; BELLET, R.E.; BERD, D. - An effective chemo/hormonal therapy regimen for the treatment of disseminated malignant melanoma. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 8:282,1989b.

McCLAY, E.F.; MASTRANGELO, M.J.; BERD, D.; BELLET, R.E. - Effective combination chemo/hormonal therapy for malignant melanoma: experience with three consecutive trials. *Int. J. Cancer*, 50:553-6,1992a.

McCLAY, E.F.; ALBRIGHT, K.D.; JONES, J.A.; EASTMAN, A.; CHRISTEN, R.; HOWELL, S.B. - Modulation of cisplatin resistance in human malignant melanoma cells. *Cancer Res.*, 52:6790-6,1992b.

McCLAY, E.F.; ALBRIGHT, K.D.; JONES, J.A.; CHRISTEN, R.D.; HOWELL, S.B. - Tamoxifen modulation of cisplatin sensitivity in human malignant melanoma cells. *Cancer Res.*, 53:1571-6,1993a.

McCLAY, E.F.; McCLAY, M.E.T.; ALBRIGHT, K.D.; JONES, J.A.; CHRISTEN, R.D.; ALCARAZ, J.; HOWELL, S.B. - Tamoxifen modulation of cisplatin resistance in patients with metastatic melanoma. *Cancer*, 72:1914-8,1993b.

McCLAY, E.F.; ALBRIGHT, K.D.; JONES, J.A.; CHRISTEN, R.D.; HOWELL, S.B. - Tamoxifen modulation of cisplatin cytotoxicity in human malignancies. *Int. J. Cancer*, 55:1018-22,1993c.

McCLAY, E.F.; ALBRIGHT, K.D.; JONES, J.A.; CHRISTEN, R.D.; HOWELL, S.B. - Tamoxifen delays the development of resistance to cisplatin in human melanoma and ovarian cancer cell lines. *Br. J. Cancer*, 70:449-52,1994.

McKEAGE, M.J.; LORENTZOS, A.; GORE, M.E. - Tamoxifen and chemotherapy for refractory metastatic malignant melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 328:140-1,1993.

MIGLIAVACCA, A.; GUIMARÃES, J.R.; HOFMANN, E. - Melanoma: experiência do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - RS, de 1973 a 1990. *Rev. Bras. Cancerol.*, 39:27-33,1993.

MONTORO, A.F. - Receptores hormonais. In: CHAVES, E. - *Câncer de mama: diagnóstico, tratamento e prognóstico*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1995. p.15-7.

MORTON, D.L. - Current management of malignant melanoma. *Ann. Surg.*, 212:123-4,1990.

NEADES, G.T.; ORR, D.J.A.; HUGHES, L.E.; HORGAN, K. - Safe margins in the excision of primary cutaneous melanoma. *Br. J. Surg.*, 80:731-3,1993.

PUNT, C.J.A.; TYTGAT, J.H.; Van LIESSUM, P.A.; GERARD, B. - Fotemustine and tamoxifen combination therapy in metastatic malignant melanoma. A phase II study. *Eur. J. Cancer*, 31A:421-2,1995.

REINTGEN, D. & SABA, H. - Chemotherapy for stage 4 melanoma: a three-year experience with cisplatin, DTIC, BCNU, and tamoxifen. *Sem. Surg. Oncol.*, 9:251-5,1993.

RICHARDS, J.M.; GILEWSKI, T.A.; RAMMING, K.; MITCHEL, B.; DOANE, L.L.; VOGELZANG, N.J. - Effective chemotherapy for melanoma after treatment with interleukin-2. *Cancer*, 69:427-9,1992.

RIGEL, D.S.; KOPF, A.W.; FRIEDMAN, R.J. - The rate of malignant melanoma in the United States: are we making an impact? *J. Am. Acad. Dermatol.*, 17:1050-3,1987.

ROSES, D.F.; HARRIS, M.N.; ACKERMAN, A.B. - *Diagnosis and management of cutaneous malignant melanoma*. Philadelphia, Saunders, 1983. 304p.

RÜMKE, P.; KLEEGERG, U.R.; MacKIE, R.M.; LEJEUNE, F.J.; PLANTING, A.S.T.; BRÖCKER, E.B.; BIERHORST, J.F.; LENTZ, M.A. - Tamoxifen as a single agent for advanced melanoma in postmenopausal women. A phase II study of the EORTC Malignant Melanoma Cooperative Group. *Melanoma Res.*, 2:153-6,1992.

SABA, H.I.; CRUSE, C.W.; WELLS, K.E.; KLEIN, C.J.; REINTGEN, D.S. - Adjuvant chemotherapy in malignant melanoma using dacarbazine, carmustine, cisplatin, and tamoxifen: a University of South Florida and H. Lee Moffitt Melanoma Center study. *Ann. Plast. Surg.*, 28:60-4,1992a.

SABA, H.I.; CRUSE, C.W.; WELLS, K.E.; KLEIN, C.J.; REINTGEN, D.S. - Treatment of stage IV malignant melanoma with dacarbazine, carmustine, cisplatin, and tamoxifen regimens: a University of South Florida and H. Lee Moffitt Melanoma Center study. *Ann. Plast. Surg.*, 28:65-9,1992b.

SCHLEICHER, R.L.; HITSELBERGER, M.H.; BEATTIE, C.W. - Inhibition of hamster melanoma growth by estrogen. *Cancer Res.*, 47:453-9,1987.

SLINGLUFF Jr., C.L. & REINTGEN, D. - Malignant melanoma and the prognostic implications of pregnancy, oral contraceptives, and exogenous hormones. *Sem. Surg. Oncol.*, 9:228-31,1993.

SNYDER, J. & Das GUPTA, T.K. - Estrogen receptors in hamster melanoma. *Fed. Proc.*, 422,1977.

SOBER, A.J. - Solar exposure in the etiology of cutaneous melanoma. *Photodermatology*, 4:23-31,1987.

SPIRO, J.D. & SPIRO, R.H. - Extent of lymph node dissection for melanoma of the head and neck. *Surg. Onc. Clin. N. Am.*, 1:261-70,1992.

STEFFENS, T.A. & LIVINGSTON, P.O. - Status of adjuvant therapy of melanoma. *Surg. Onc. Clin. N. Am.*, 1:307-33,1992.

STIEGGER, I. - Diminui camada de ozônio sobre o Estado. *Jornal Zero Hora*, 27:46,1993(out.).

STOICA, A.; HOFFMAN, M.; MARTA, L.; VOICULETZ, N. - Estradiol and progesterone receptors in human cutaneous melanoma. *Neoplasma*, 38:137-45,1991.

UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. PUBLIC HEALTH SERVICE. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. - *NIH Rodents: 1980 catalogue*. National Institutes of Health, 1982. 253p.

WALKER, M.J.; RONAN, S.G.; HAN, M.C.; BEATTIE, C.W.; Das GUPTA, T.K. - Interrelationship between histopathologic characteristics of melanoma and estrogen status. *Cancer*, 68:184-8,1991.

WITTLIFF, J.L. - Hormone and growth factor receptors. In: DONEGAN, W.L. & SPRATT, J.S. - *Cancer of the breast*. 4.ed. Philadelphia, Saunders, 1995. p.346-74.

## NORMAS ADOTADAS

GOLDENBERG, S.; AZEVEDO, J.L.M.C.; POBLACIÓN, D.A.; FINO, T.P.M. - *Referências bibliográficas: manual adotado pelo Curso de Pós-Graduação em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Escola Paulista de Medicina*. São Paulo, Brasiliiana, 1990. 40p.

GOLDENBERG, S. - Orientação normativa para elaboração de tese. *Acta Cir. Bras.*, 8(supl.1):1-24,1993.

## RESUMO

O melanoma cutâneo corresponde a cerca de 1 a 3% de todas as neoplasias malignas. Não só sua incidência como também sua morbidade e mortalidade vêm aumentando em várias partes do mundo, inclusive no Brasil. Estima-se que venha a ser responsável por 0,7% dos óbitos por câncer no ano de 1996 em ambos os sexos em todo o país.

Diversos fatores ambientais e do hospedeiro têm sido associados ao desenvolvimento do melanoma cutâneo, embora permaneça obscuro o verdadeiro mecanismo de sua gênese. Estudos sugerem ser a luz solar o fator etiológico mais importante. O papel exercido pelos hormônios esteróides no desenvolvimento e disseminação dessa neoplasia há muito tem sido objeto de investigação. A história natural da doença sugere que esses hormônios possam afetar seu comportamento biológico.

A cirurgia constitui-se no recurso de primeira linha no tratamento da lesão primária e das metástases locorregionais e sistêmicas do melanoma cutâneo. Contudo, na doença avançada, o arsenal terapêutico disponível traz resultados insatisfatórios, estimulando a realização de estudos experimentais com novas drogas. Uma modalidade terapêutica promissora é a que explora a manipulação hormonal dessa neoplasia através da utilização de hormônios ou substâncias correlatas.

O objetivo do presente estudo é avaliar a resposta do melanoma murino B16-F10, desenvolvido experimentalmente em camundongos C57BL/6N, à terapêutica antiestrogênica isolada com tamoxifeno.

Para tanto, dividiram-se 42 camundongos da cepa C57BL/6N em 2 grupos, denominados grupo tratamento e grupo controle. No primeiro dia do

experimento, inoculou-se, em todos os animais, células de melanoma murino da linhagem B16-F10 desenvolvidas em cultura. Os animais do grupo tratamento - 22 camundongos - receberam citrato de tamoxifeno a partir do primeiro dia do experimento até a sua morte, e os animais do grupo controle - 20 camundongos - não receberam nenhuma medicação.

Avaliou-se a sobrevida dos camundongos, mensurou-se o volume tumoral nos dias 14, 21, 28 e 35 do experimento, bem como após a morte de cada animal, e quantificou-se a necrose tumoral em relação ao seu percentual total e à sua distribuição no tumor em central e periférica.

A comparação entre as curvas de sobrevida dos grupos tratamento e controle não mostrou diferença estatisticamente significativa, assim como no que diz respeito ao volume tumoral. Porém, em relação à necrose tumoral, a comparação entre os dois grupos mostrou diferença estatisticamente significativa em todos os quesitos estudados. O grupo tratamento apresentou maior percentual total de necrose ( $p < 0,0001$ ), maior necrose central ( $p < 0,0001$ ) e maior necrose periférica ( $p < 0,0001$ ).

## SUMMARY

Cutaneous malignant melanoma has an incidence rate of 1 to 3% among all malignant neoplasms. In Brazil and other countries its morbidity and mortality rates have been increasing, along with its incidence rate. It is estimated that it will account for 0,7% of all male and female deaths from cancer in Brazil in 1996.

Several environmental and host factors have been associated with the development of cutaneous malignant melanoma; however the real nature of its etiology remains obscure. Solar light is suggested as the most important factor in some studies. The role of steroid hormones in the development and spread of this neoplasia has been long investigated. The natural history of the disease suggests that these hormones may affect its evolution.

In cutaneous malignant melanoma surgery is the basic treatment for primary lesions as well as for local and systemic metastases. Nevertheless, in advanced cases available therapy offers poor results, which has encouraged further experiments with new drugs. One such promising therapy attempts the hormonal control of cutaneous malignant melanoma by using hormones and correlate substances.

The purpose of this research was to evaluate the response to anti-estrogen therapy of experimentally induced B16-F10 murine melanoma in C57BL/6N mice. The drug used in this study was tamoxifen alone.

For this purpose, 42 C57BL/6N strain mice were separated in 2 groups, designated treatment and control group. As the first step of the experiment, in first day (day 1) B16-F10 strain culture murine melanoma cells were inoculated in all animals. Starting in day 1 until the day of death, 22 mice of treatment group received tamoxifen. The control group (20 mice) received no medication.

in all animals. Starting in day 1 until the day of death, 22 mice of treatment group received tamoxifen. The control group (20 mice) received no medication.

The survival time of the animals was evaluated; the tumor volume was measured in days 14, 21, 28 e 35, as well as after their death; and the tumor necrosis was assessed as a total percentage and as central or peripheral, according to its location in the tumor.

Comparison of survival curves and tumor volume between the two groups shows no statistically significant difference. However, comparison of the two groups concerning tumoral necrosis shows statistically significant difference in all the analysed items. The treatment group presented: greater percentage of total necrosis ( $p < 0,0001$ ), greater central necrosis ( $p < 0,0001$ ) and greater peripheral necrosis ( $p < 0,0001$ ).

## APÊNDICE 1

Parâmetros observados nos camundongos do grupo controle

Nº	SV	PTN	NC	NP	V14E	V21E	V28E	V35E	VFE	V14P	V21P	V28P	V35P	VFP
1	34	1	2	1	0,52	6,37	33,51	-	38,79	0,50	3,45	33,60	-	42,00
2	23	2	2	1	8,18	14,14	-	-	33,51	7,50	9,90	-	-	16,00
3	24	2	2	1	0,52	8,18	-	-	10,30	0,50	9,45	-	-	11,42
4	32	1	2	1	0,90	1,77	17,16	-	20,58	0,80	1,50	7,68	-	10,95
5	36	2	2	1	0,52	22,45	33,51	65,45	65,45	0,50	7,87	28,00	30,00	32,00
6	25	3	3	2	4,19	8,18	-	-	22,45	3,00	12,50	-	-	19,25
7	23	2	2	2	0,90	47,71	-	-	47,71	0,86	27,00	-	-	33,12
8	32	2	2	2	0,01	4,19	14,14	-	44,60	0,03	4,80	18,00	-	32,56
9	30	2	2	1	3,05	8,18	33,51	-	47,71	1,80	6,75	24,00	-	31,68
10	32	3	3	2	0,70	17,16	20,58	-	20,58	0,55	4,48	8,16	-	10,10
11	34	2	3	1	0,00	1,77	22,45	-	28,73	0,00	2,25	22,54	-	33,25
12	22	1	2	1	6,37	65,45	-	-	73,62	5,98	100,00	-	-	117,00
13	43	1	2	2	0,03	0,27	8,18	33,51	65,45	0,03	0,38	7,50	32,00	81,00
14	29	2	2	2	0,11	8,18	33,51	-	33,51	0,05	2,25	30,00	-	30,00
15	25	3	3	2	5,58	2,67	-	-	6,62	2,11	3,97	-	-	7,87
16	52	2	2	1	0,00	0,00	1,15	8,18	14,14	0,00	0,00	0,84	7,50	21,60
17	18	1	2	1	10,31	-	-	-	17,16	2,59	-	-	-	7,20
18	18	2	2	2	5,58	-	-	-	15,60	2,62	-	-	-	6,20
19	18	1	2	1	14,14	-	-	-	22,45	6,00	-	-	-	11,55
20	29	2	3	2	0,00	4,19	87,11	-	87,11	0,00	6,00	82,50	-	82,50

Nº: número do camundongo no grupo em estudo; SV: sobrevida do camundongo em dias; PTN: percentual total de necrose; NC: necrose central; NP: necrose periférica; V14E: volume do tumor em cm<sup>3</sup> pela fórmula do volume da esfera aos 14 dias; V21E: volume do tumor em cm<sup>3</sup> pela fórmula do volume da esfera aos 21 dias; V28E: volume do tumor em cm<sup>3</sup> pela fórmula do volume da esfera aos 28 dias; V35E: volume do tumor em cm<sup>3</sup> pela fórmula do volume da esfera aos 35 dias; VFE: volume final do tumor em cm<sup>3</sup> pela fórmula do volume da esfera; V14P: volume do tumor em cm<sup>3</sup> pela fórmula do volume do prisma retangular aos 14 dias; V21P: volume do tumor em cm<sup>3</sup> pela fórmula do volume do prisma retangular aos 21 dias; V28P: volume do tumor em cm<sup>3</sup> pela fórmula do volume do prisma retangular aos 28 dias; V35P: volume do tumor em cm<sup>3</sup> pela fórmula do volume do prisma retangular aos 35 dias; VFP: volume final do tumor em cm<sup>3</sup> pela fórmula do volume do prisma retangular.

## APÊNDICE 2

## Parâmetros observados nos camundongos do grupo tratamento

Nº	SV	PTN	NC	NP	V14E	V21E	V28E	V35E	VFE	V14P	V21P	V28P	V35P	VFP
1	23	5	3	3	0,07	47,71	-	-	47,71	0,12	11,25	-	-	15,79
2	26	5	3	3	4,19	14,14	-	-	24,43	1,00	6,75	-	-	19,15
3	40	4	3	2	0,11	11,49	14,14	22,45	31,06	0,22	8,40	12,00	17,50	21,45
4	38	4	3	2	0,11	6,37	4,85	14,14	20,58	0,22	5,17	7,56	18,75	25,50
5	32	3	3	2	0,00	4,19	14,14	-	33,51	0,00	2,40	12,00	-	25,00
6	40	4	3	2	4,19	22,45	22,45	24,43	28,73	2,60	13,12	17,50	18,00	21,28
7	23	5	3	3	14,14	17,16	-	-	20,58	7,80	7,07	-	-	8,09
8	28	4	3	2	4,19	11,49	33,51	-	33,51	3,00	8,40	27,00	-	27,00
9	37	3	3	3	0,07	3,05	4,19	4,19	4,19	0,12	2,70	4,32	4,68	4,68
10	23	3	2	2	0,52	33,51	-	-	44,60	0,25	15,00	-	-	16,50
11	23	3	3	2	22,45	22,45	-	-	28,73	21,00	18,38	-	-	22,61
12	22	4	3	3	22,45	28,73	-	-	28,73	9,80	12,31	-	-	12,31
13	23	4	3	3	14,14	33,51	-	-	33,51	13,50	22,40	-	-	27,36
14	21	4	3	3	14,14	38,79	-	-	38,79	4,50	21,17	-	-	21,17
15	28	4	3	2	1,77	14,14	44,60	-	44,60	2,25	12	37,44	-	37,44
16	21	3	3	1	22,45	33,51	-	-	33,51	7,70	11,00	-	-	11,00
17	28	4	3	2	1,15	14,14	31,06	-	31,06	1,35	9,00	21,84	-	21,84
18	23	3	3	2	33,51	87,11	-	-	91,95	24,00	26,40	-	-	28,56
19	23	4	3	2	14,14	22,45	-	-	26,52	10,80	16,38	-	-	19,68
20	34	4	3	2	0,52	14,14	28,73	-	47,71	0,40	9,00	17,10	-	28,35
21	22	4	3	2	14,14	28,73	-	-	28,73	15,00	17,78	-	-	17,78
22	22	3	3	3	9,20	38,79	-	-	41,63	9,75	20,16	-	-	21,93

Nº: número do camundongo no grupo em estudo; SV: sobrevivida do camundongo em dias; PTN: percentual total de necrose; NC: necrose central; NP: necrose periférica; V14E: volume do tumor em cm<sup>3</sup> pela fórmula do volume da esfera aos 14 dias; V21E: volume do tumor em cm<sup>3</sup> pela fórmula do volume da esfera aos 21 dias; V28E: volume do tumor em cm<sup>3</sup> pela fórmula do volume da esfera aos 28 dias; V35E: volume do tumor em cm<sup>3</sup> pela fórmula do volume da esfera aos 35 dias; VFE: volume final do tumor em cm<sup>3</sup> pela fórmula do volume da esfera; V14P: volume do tumor em cm<sup>3</sup> pela fórmula do volume do prisma retangular aos 14 dias; V21P: volume do tumor em cm<sup>3</sup> pela fórmula do volume do prisma retangular aos 21 dias; V28P: volume do tumor em cm<sup>3</sup> pela fórmula do volume do prisma retangular aos 28 dias; V35P: volume do tumor em cm<sup>3</sup> pela fórmula do volume do prisma retangular aos 35 dias; VFP: volume final do tumor em cm<sup>3</sup> pela fórmula do volume do prisma retangular.