
Melanoma

BOLETIM INFORMATIVO DO GBM - ANO V - No. 17
ABRIL, MAIO E JUNHO 2002

Editorial

Mesmo sem consenso de quais exames laboratoriais seriam úteis no estadiamento e seguimento dos doentes de melanoma, temos pedido de rotina a ultrasonografia e, se necessário, a punção biópsia, nos pacientes que no curso da doença venham apresentar adenomegalia. Se a morfologia do gânglio ou a punção biópsia não apresentarem características de metástases, não obtemos com o método muita ajuda, porém nos casos de positividade, abrevia a conduta a ser tomada.

Embora com resultados promissores, a cirurgia micrográfica ainda não é utilizada como rotina no tratamento do melanoma. Talvez a introdução de técnicas imunohistoquímicas, facilitando a identificação dos melanócitos, faça desta modalidade um dos métodos terapêuticos de escolha, principalmente nos casos de melanoma de localizações onde a preservação de tecido seja importante..

O câncer é uma doença genética, nos últimos anos temos assistido um grande avanço da biologia molecular abrindo caminhos para o entendimento de seu desenvolvimento e uma utilização futura como possível arma terapêutica.

Cyro Festa Neto
Editor chefe

Diagnóstico por Imagem da Doença Linfonodal Luis Fernando Tovo

Muitos ensaios clínicos recomendam apenas o exame físico no seguimento de portadores de melanoma estágio I e II, em pacientes assintomáticos. Segundo o último documento de consenso sobre melanoma cutâneo da *American Academy of Dermatology* (Março/2001), testes laboratoriais de rotina e métodos de investigação por imagem não são necessários na abordagem inicial (*work up*) de pacientes assintomáticos, com melanoma cutâneo primário ≤ 4 mm de espessura. No entanto é inquestionável a importância da detecção precoce de eventuais metástases linfonodais, sendo que o número e o volume dos linfonodos acometidos são fatores prognósticos de fundamental importância.

Muitos estudos revelam que a simples palpação de bases linfonodais apresenta taxas significativas de resultados falso negativos no seguimento de pacientes portadores de melanoma. A palpação de uma base linfonodal pode também ser prejudicada por lesões cicatriciais, resultantes do tratamento do melanoma ou de cicatrizes remanescentes da técnica do "Linfonodo Sentinela".

Trabalhos recentes vêm demonstrando que, para o diagnóstico precoce de metástases de melanoma em trânsito ou metástases linfonodais, a avaliação ultra-sonográfica é significativamente superior à palpação na abordagem destes pacientes.

A ultra-sonografia permite visualizar linfadenopatias em pacientes portadores de melanoma, sendo que os linfonodos (reacionais ou metastáticos), podem ser detectados mesmo quando não identificados pela palpação à avaliação clínica. O ultra-som pode demonstrar aspectos bastante sugestivos de metástases linfonodais no melanoma como: linfonodos de aspecto globoso, com superfície bosselada, ausência de hilo e hipocogenicidade em sua trama ultra-sonográfica.

Na doença linfonodal, a ultra-sonografia além de conferir informações quanto à imagem dos linfonodos, aumenta a sensibilidade e especificidade da técnica da biópsia aspirativa por agulha fina, quando

orientada pelo ultra-som.

Apesar das evidências mencionadas, apenas ensaios clínicos de longo termo poderão demonstrar o potencial benefício nas taxas de recidiva e sobrevida, da utilização da ultra-sonografia na avaliação da drenagem linfática e bases linfonodais em pacientes portadores de melanoma.

Cirurgia Micrográfica de Mohs no Tratamento do Melanoma Localizado

Eugênio R. A. Pimentel e Luiz Roberto Terzian

A cirurgia micrográfica de Mohs é uma técnica diferenciada para a remoção dos tumores malignos cutâneos; suas principais características são:

- a) Retirada inicial do tumor, com margens exíguas (2 a 3 mm);
- b) Avaliação histológica de 100% destas margens durante o ato operatório, por cortes especiais de congelação;
- c) Desenho de um mapa da ferida operatória onde serão marcadas as áreas com tumor residual (se houver), após a análise histológica das lâminas;
- d) Ampliação das margens cirúrgicas (mais de 2 a 3 mm) somente nos locais ainda comprometidos pela neoplasia, com novo preparo de lâminas e mapeamento;
- e) Outras fases de retirada e avaliação até a remoção completa da lesão;
- f) Fechamento da ferida operatória no mesmo tempo cirúrgico.

Essa técnica tem as vantagens de permitir a remoção completa do tumor e poupar o máximo possível de pele sã ao redor da lesão. Ela apresenta os melhores índices de cura e as menores taxas de recorrência para os principais tumores cutâneos como o carcinoma basocelular, o carcinoma espinocelular, o carcinoma sebáceo e o dermatofibrossarcoma protuberans, entre outros. ⁽¹⁾

A cirurgia micrográfica de Mohs é realizada com sucesso há mais de 50 anos para o tratamento de melanoma ⁽²⁾, e mesmo assim existem inúmeras controvérsias na sua utilização.

A primeira delas é a dificuldade na identificação histológica dos melanócitos em congelação, pois eles não apresentam o artefato da vacuolização citoplasmática que está presente nas lâminas de parafina. ⁽³⁾ Mesmo assim, alguns trabalhos demonstram alta sensibilidade e especificidade na avaliação histológica de melanomas na congelação da cirurgia de Mohs, corados de maneira convencional (hematoxilina-eosina) quando comparados com a fixação em parafina. ^(4,5)

Outro ponto controverso é o receio de que a retirada de menores margens de pele sã pudesse aumentar a incidência de recidivas locais, devido as microssatelitoses locais.

Porém, contrariamente a esta suspeita, ao longo dos últimos anos vem ocorrendo a indicação pela *American Academy of Dermatology* da retirada dos melanomas cutâneos com margens cada vez menores, sem aumento nos índices de recidivas e com menor morbidade. ^(e)

Estudos com a remoção de melanomas pela cirurgia micrográfica de Mohs têm demonstrado taxas de sobrevida, metástases e recidivas melhores ou iguais às da cirurgia convencional com margens mais amplas. ^(2,3,7,8)

As biópsias incisionais nos melanomas com tratamento posterior e os resultados dos trabalhos com a cirurgia micrográfica não observaram nenhuma alteração nos índices de sobrevida, contradizendo a hipótese ⁽¹⁰⁾ de que o fato de se cortar o tumor durante as primeiras fases da cirurgia de Mohs favoreceria a disseminação das células tumorais do melanoma.

Estágio atual da cirurgia micrográfica no tratamento do Melanoma

A novidade é a utilização da imunohistoquímica que facilita muito a identificação dos melanócitos nas lâminas de congelação durante a cirurgia, através do uso anticorpos monoclonais específicos marcados com corantes. ^(10,11,12,13,14)

Os marcadores mais utilizados são o HMB-45, MEL-5, Melan-A e S-100.⁽¹²⁾

Os estudos mais recentes utilizando a cirurgia micrográfica de Mohs associada à imunohistoquímica demonstraram que com esta técnica é possível conservar mais ainda tecido e manter ou melhorar os índices de sobrevida, de recidivas e de metástases. Em alguns casos porém, foi necessária a remoção de margens cirúrgicas maiores que as preconizadas para a retirada completa do melanoma. Estes resultados demonstram que ao proceder a cirurgia convencional com as margens usuais pode ocorrer ora uma exérese incompleta restando ainda parte do melanoma no paciente e ora uma remoção de margens maiores que as necessárias, com piores resultados funcionais e estéticos. Apesar dos resultados promissores o uso desta técnica cirúrgica ainda não é consenso para o tratamento do melanoma, mas deverá ser muito útil no tratamento dos melanomas localizados na face e nas áreas onde a preservação de tecido seja importante.

Erramos

- na edição anterior, no artigo do Dr. Reinaldo Tovo (pág.1), ao invés de 107 células, o número correto é 10^7 (10 elevado a sétima potência).
- na mesma edição, no artigo do Dr. Francisco Belfort (pág. 2), a tabela de "localização" tem como referência "M" na coluna da esquerda. No agrupamento por estágio faltou a observação após o estágio III de que "não há subgrupos para estadiamento clínico III".

Genética Molecular do Melanoma Maligno
Dra Itamar Romano Garcia Ruiz - Laboratório de Genética,
Instituto Butantan / Itamruiz@usp.br

I. Ciclo Celular

Câncer é uma doença genética que se caracteriza por alterações no ciclo celular e sua regulação resultando, na maioria dos casos, em proliferação desordenada e descontrolada, em momento e/ou local inadequados. A progressão do ciclo celular normal é mediada por sinais mitóticos que ativam ciclinas e kinases dependentes de ciclinas (CDKs). Proteínas específicas fazem parte desses complexos, como p53 e retinoblastoma (rb). No final da fase G1 do ciclo celular (*restriction point*), a hiperfosforilação ou mutação dessas proteínas altera sua conformação. Nessas condições, o tetrâmero de p53 não mais se liga a promotores de genes através dos quais normalmente exerce controle negativo sobre a divisão. Por sua vez, a proteína rb ativada libera o fator de transcrição E2F, que passa a promover a expressão de outros genes relacionados com a divisão celular.

II. Constituição Genética, Ambiente, Herança e MM

A susceptibilidade do paciente portador de MM depende de seu contexto genético, fundamental para a compreensão dos mecanismos que levam ao aparecimento de células malignas persistentes, ou à sua erradicação. Tipos de pele 1 e 2, olhos azuis, cabelos ruivos ou louros, características estas determinadas geneticamente, são mais susceptíveis ao MM.

As influências ambientais contribuem para acentuar o fenótipo constitutivo do indivíduo particularmente as radiações UV do sol. A exposição crônica a estas radiações pode provocar mutações pontuais no oncogene N-RAS, induzir imunossupressão, bem como esgotar os mecanismos de reparo do DNA, causas potenciais para desenvolvimento de MMs.

Estudos epidemiológicos demonstram que um dos maiores riscos no desenvolvimento do MMC é de indivíduos com presença de grande número de nevos atípicos ou nevos melanocíticos benignos. Este risco aumenta se existir história familiar.

Modelo genético da progressão de MM

MM é um modelo de progressão genética que se desenvolve através de estágios (**Figura 1**). Os eventos moleculares subjacentes a essas alterações biológicas ainda hoje assemelham-se a um mosaico inacabado. A partir de dados citogenéticos é possível estabelecer um modelo cromossômico da progressão do MM. A perda de estabilidade genética inicial é acompanhada de perda do controle do

crescimento e desprendimento do melanócito transformado da sua posição funcional na epiderme, formando nichos de melanócitos, com variações pigmentares. Esses aglomerados celulares resultam de alterações na comunicação intercelular, via moléculas de adesão, como as caderinas. Caderinas tipo E expressas na superfície dos melanócitos permitem sua adesão aos queratinócitos. Durante a malignização, a mudança de expressão para caderinas tipo N leva à "emancipação" dos melanócitos. Diversos tipos de integrinas, que são receptores celulares, permitem a adesão dos melanócitos à membrana basal e paredes vasculares. Mudanças no perfil de expressão para outros tipos de integrinas e/ou alterações quantitativas favorecem o crescimento invasivo e formação de metástases. A fase de crescimento invasivo começa com a transgressão da membrana basal e crescimento vertical do MM nas camadas dérmicas e tecidos mais profundos. Os melanócitos malignos invasivos produzem fatores de crescimento, como fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), que estimulam a formação de novos vasos (angiogênese). Fatores quimiotáticos liberados pelos melanócitos atraem mastócitos, que liberam bFGF assegurando a irrigação do tumor. MMs desencadeiam resposta imunitária acentuada do organismo e até regressão parcial pode ser observada pela eficiência das células T que infiltram o tumor. Apesar disto, quase sempre o MM consegue anular o sistema de defesa. Células T produzem uma proteína Fas-ligante (FasL) que se liga ao receptor Fas de outras células, desencadeando a apoptose destas. MMs metastáticos não exprimem Fas, e sim FasL, que se liga às Fas das células T, aniquilando-as.

Mutações Gênicas e MM

Dentre os principais fatores de risco genético para o aparecimento do MM estão as mutações nos genes supressores de tumor CDKN2, codificadores das proteínas p16^{INK4a} e p15^{INK4b}, que atuam no ciclo celular e estão situados no braço curto do cromossomo 9 humano (9p21). Essas mutações estão presentes em 25% das famílias predispostas ao MM devido a mutação na linhagem germinativa. Uma vez presente, essa mutação aumenta a probabilidade de mutação no segundo alelo, o que explica o desenvolvimento mais freqüente e mais precoce dos tumores familiares. Mutações no cromossomo 6p também parece ter papel nos estádios precoces. A progressão para estádios mais avançados está associada a mutações nos cromossomos 2, 3, 10 e 11. Muitos oncogenes também estão ativados no MM, como os genes da proteína tirosina kinase (c-kit).

Reparo do DNA e MM

Instabilidade genética e perda do controle de crescimento estão muito relacionadas. Quando o DNA é danificado sob efeito de radiação UV, formam-se dímeros timina e os chamados genes "*checkpoint*", que incluem os genes supressores TP53 e CDKN2, interrompem o ciclo celular na fase G1 de divisão. O DNA é então reparado pela ação de genes que mantêm a estabilidade genética. As proteínas de reparo reconhecem nucleotídeos mutados, ligam-se e desenrolam as fitas de DNA local, clivam, retiram e substituem-nos por nucleotídeos corretos, com base na fita molde intacta. Se a lesão for irreparável, desencadeia-se um processo de morte celular programada (apoptose).

Mutações no gene TP53 são observadas em 50% de todos os tumores, e estão presentes na pele exposta ao sol antes mesmo que se observem sinais clínicos. Essas mutações permitem que células com genes defeituosos prossigam no ciclo mitótico de divisão, e, em consequência, haja acúmulo de mutações. Mutações no gene TP53 têm papel importante no desenvolvimento de CBCs e CECs, mas não são fundamentais no caso dos MM. Parte das células agredidas pelo sol após exposição tornam-se queratinócitos apoptóticos. Melanócitos transformados têm alta expressão do gene BCL-2, que é inibidor da apoptose, e suportam doses de radiação UV mais fortes que os queratinócitos, embora ambos sejam igualmente sensíveis aos efeitos mutagênicos.

Indivíduos com mutações nos genes de proteínas de reparo do DNA, como nos casos de *xeroderma pigmentosum* (XP) apresentam elevado risco de desenvolver cânceres cutâneos. Além do aumento do número de CBCs e CECs, 50% desses pacientes XP apresentam lentigos malignos, com risco 200 vezes maior de desenvolver MM, em jovens com menos de 20 anos.

crom.9p21 CDKN2 crom. 10		crom. 6 crom. 11		CDKN2 crom. 1p crom. 7q
melanócito normal	nevus atípico	melanoma fase radia	melanoma fase vertical	metástase

Terapia Gênica e MM

A utilização de genes com fins terapêuticos amplia e completa os vários procedimentos médicos convencionais. A novidade real consiste na possibilidade de produzir citocinas e inúmeras enzimas diretamente no interior do organismo. Essa profilaxia genética permite introduzir genes autólogos normais embalados em envelope viral, seja diretamente no tumor, seja a nível sistêmico, a fim de substituir genes mutados. Muitos antígenos associados ao MM têm sido identificados, que podem servir para desenho de vacinas imunoterápicas, com efeito sistêmico de longa duração, graças à produção de células T de memória. Todos os protocolos de terapia gênica de MM têm optado pela imunoterapia. Os antígenos associados ao MM (tirosinase, MART, gp100) podem ser utilizados para vacinação através de vetores virais ou mesmo na forma de DNA nu. Os vetores utilizados não devem ser capazes de se replicar dentro da célula hospedeira, por isso as funções que lhes faltam são providas por vírus auxiliares que atuam na sua encapsulação. Células tumorais tratadas com vírus que exprimem interleucinas (IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, IFN- γ , GM-CSF, B7, etc) produzem no local um ambiente favorável à atuação do sistema imune. O tratamento *in vivo* pode ser via sistêmica ou através de injeção no músculo ou pele. O tratamento *ex-vivo* consiste na retirada de células tumorais do paciente e seu cultivo *in vitro* (30-50% com sucesso em MM), transfecção com vetores portadores de genes de interesse e re-injeção no paciente na forma de vacina. Como alternativa, culturas primárias de fibroblastos são tratadas *in vitro*, irradiadas e re-injetadas no tumor do paciente. São técnicas trabalhosas, difíceis, e dispendiosas. Como o câncer é uma doença dinâmica e mal definida, com muita instabilidade genética, os tumores são heterogêneos e o tratamento é complexo. A análise primária mais precisa dos parâmetros tumorais tornará a terapia gênica mais racional e com melhores alvos.

Diretoria do GBM para o biênio 2001-2003

Presidente: Francisco A. Belfort

1ºsecretário: Francisco Macedo Paschoal

1º vice-presidente: Marcus A. Maia de Olivas Ferreira

Tesoureiro: Rogério Izar Neves

2º vice-presidente: Auro Del Giglio

1º tesoureiro: Nilceo Schwery. Michalany

Secretário geral: Mauro Y. Enokihara

Diretor Científico: José Antonio Sanches Júnior

SITES DE MELANOMA NA INTERNET

<http://www.mpip.org/>

http://healthology.com/focus_webcast.asp?f=skinhealth&b=healthology&c=skincare_skincancer

<http://www.skincheck.com/>

<http://www.oncologychannel.com/melanoma/>

<http://www.melanomasupport.com/>

<http://www.cancerlinksusa.com/melanoma/index.htm>

<http://nationalmelanoma.org/>

<http://www.mayo.edu/research/melanoma/>

<http://www.melanomacenter.com/>