

Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo

Skin cancer: main molecular markers of cutaneous melanoma

Lícia Caldas Figueiredo,¹ Luciana Nunes Cordeiro,² Anderson Pontes Arruda,³ Maria Denise Fernandes Carvalho,³ Erlane Marques Ribeiro³ e Henrique Douglas Melo Coutinho⁴

Resumo

Melanoma é a principal doença fatal relacionada à pele. A incidência e a mortalidade pelo melanoma vêm aumentando no mundo, sendo sua incidência em países pouco desenvolvidos pouco conhecida. No Brasil, 0,15% de todas as neoplasias malignas correspondem a esta doença, sendo o diagnóstico histológico crescente. Visto que 12% dos pacientes com melanoma metastático sobrevivem mais de cinco anos, a chance de cura dessa doença está diretamente relacionada ao diagnóstico e ao tratamento no início do seu desenvolvimento. Por isso, estudos sobre a biologia molecular do melanoma cutâneo buscando a identificação de marcadores moleculares são interessantes na previsão do diagnóstico e na melhoria do prognóstico dos indivíduos com essa doença. Marcadores imuno-histoquímicos (Mel-CAM), enzimáticos (Tiosinase), protéicos (Integrinas; ICAM - 1; ciclina D1) e genéticos (CDKN2A; p53; p21) podem ser utilizados para esse fim. Devido a isso, foi observado um grande avanço nos estudos do desenvolvimento dos mecanismos patogênicos do melanoma maligno.

Palavras-chave: melanoma; neoplasias cutâneas; marcadores biológicos de tumor; imunohistoquímica.

Abstract

Melanoma is the main skin-related lethal disease; incidence and mortality from melanoma are increasing worldwide. The chance of cure for this disease is directly related to early diagnosis and immediate treatment. Because of that, molecular biology studies of cutaneous melanoma to find important molecular markers are interesting to foresee diagnosis and to have a better prognostic assessment of individuals with this disease.

Key words: melanoma; skin neoplasms; biological tumor markers; immunohistochemistry.

¹Graduando do curso de Medicina, Faculdade de Medicina do Juazeiro do Norte (FMJ).

²Técnica do Laboratório de Genética, Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ).

³Professor, Laboratório de Genética, Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ).

⁴Professor, Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ) e Universidade Regional do Cariri (URCA). *Enviar correspondência para H.D.M.C. E-mail:* hdouglas@zipmail.com.br / h-douglas@bol.com.br

INTRODUÇÃO

O melanoma é a principal doença fatal originada na pele. Relatos de várias partes do mundo vêm demonstrando aumento em suas taxas de incidência e mortalidade. Estima-se que o melanoma cutâneo represente cerca de 3% dos cânceres, segundo sua incidência, e um percentual que varia de 1% a 2% das mortes por câncer. O aumento médio anual de incidência dessa neoplasia nos Estados Unidos da América é de aproximadamente 6%.¹ No Brasil, um estudo baseado em relatórios anatomopatológicos revelou que o melanoma maligno corresponde a 0,15% de todas as neoplasias malignas.²

Para o estudo da biologia molecular do melanoma maligno, é importante que se conheça sua classificação segundo o nível de invasão. Segundo Clark et al¹ (apud Gon; Minelli; Guembarovski, 2001), a classificação é: nível-I, crescimento intra-epidérmico; nível-II, invasão da derme papilar; nível-III, atinge o limite entre a derme papilar e reticular; nível-IV, invasão da derme reticular e nível-V, invasão da tela subcutânea.

Conhecer os principais marcadores moleculares do melanoma pode ser de fundamental importância para a identificação de indivíduos geneticamente predispostos, além da detecção precoce da doença.^{3,4} Isso é importante já que as chances de cura do melanoma são tanto maiores quanto mais cedo é diagnosticada a doença e iniciado o tratamento.⁵

Aspectos Gerais: o conceito de marcadores moleculares do melanoma está relacionado a fatores e/ou substâncias que podem identificar a presença ou a predisposição a esse determinado tipo de câncer. Esses marcadores podem estar associados a alterações em determinadas regiões genômicas, como mutações em genes de predisposição, por exemplo, como também podem estar relacionados a expressão de alguns antígenos em tumores e a presença de substâncias específicas na circulação sistêmica.

MARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS AO MELANOMA CUTÂNEO

MARCADORES GÊNICOS

CDKN2A (p16 INK4a)

O gene supressor de tumores CDKN2A (p16^{INK4a}) é encontrado no cromossomo 9, na região p21 (braço curto); esta região está associada à perda de heterozigidade (LOH), deleções ou mutações nos melanomas. O gene CDKN2A codifica a proteína p16, que inibe competitivamente CDK4, bloqueando a

progressão do ciclo celular a partir da sua fase G1.^{3,6}

Estudos recentes em ratos, onde a proteína p16 foi mutada ou deletada, mostram um aumento na incidência de determinados tipos de câncer nesses animais, inclusive o melanoma.⁷ Relatam ainda que a perda da expressão da proteína p16 está relacionada ao aumento da proliferação de células tumorais na fase de crescimento vertical do melanoma cutâneo, o que indica perda de controle do ciclo celular; isso dá um suporte ainda maior ao conceito de que a proteína p16 é um importante regulador do ciclo celular nos melanomas.⁷

O início do desenvolvimento do melanoma não está associado à proteína p16, porém a perda dessa proteína está associada a baixas taxas de sobrevivência dos indivíduos com a doença.⁵ Portanto, fica provada a grande importância da proteína p16 como marcador molecular no prognóstico do melanoma cutâneo.^{6,7}

Gene p53

O gene p53 é um gene supressor tumoral encontrado em muitos tumores malignos e benignos; este tem a função primária de manter as células em estado de repouso após um dano no DNA. O gene p53 pode ainda iniciar o processo de apoptose caso o defeito do DNA não seja reparado. Um estudo realizado por Korabiowska et al⁶ (apud Mangini, Ning Li, Bhawan, 2002) mostrou uma correlação positiva entre a expressão de p53 e melanomas malignos comparados a nevos benignos; foi encontrada a expressão de p53 em 7 de 25 nevos benignos e 19 de 25 melanomas cutâneos, com uma maior percentagem de células manchadas em melanomas malignos que em benignos. Resultados semelhantes da expressão negativa de p53 em lesões melanocísticas benignas versus malignas foram relatadas por Gelsleichter et al⁶ (apud Mangini, Ning Li, Bhawan, 2002), sugerindo um possível papel diagnóstico.

WAF1- p21WAF1

O gene WAF1, localizado no cromossomo 6p, apresenta, freqüentemente, deleções em melanomas. A transcrição desse gene é comandada pelo gene p53, que codifica a proteína p21^{WAF1}; esta proteína inibe a progressão do ciclo celular da fase G1 para a G2. Níveis elevados e reduzidos de p21^{WAF1} têm sido relatado na proliferação de células melanocíticas comparadas com melanócitos normais. Porém ainda são necessários mais estudos que determinem o significado da expressão da proteína p21^{WAF1} no melanoma.⁶

Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) é um potente gene mitótico das células endoteliais que

aumenta a permeabilidade vascular. Níveis de VEGF são elevados em condições inflamatórias e neoplásticas. A expressão do VEGF e do receptor de VEGF em células tumorais tem sido relatada em melanomas e em linhagens de células dos melanomas. Por isso, a positividade de VEGF pode ter um valor diagnóstico na identificação de lesões melanocíticas malignas.⁶

MARCADORES PROTÉICOS E IMUNOHISTOQUÍMICOS

HMB-45 e Tirosinase

Melanomas primários e metastáticos manifestam uma variedade de padrões morfológicos e arquitetônicos que imitam outros tumores e aumentam problemas de diagnóstico diferencial.⁸

A tirosinase é a principal enzima na síntese de melanina, pois catalisa os dois passos iniciais da biossíntese desse pigmento;⁸ a síntese da tirosinase ocorre dentro de organelas altamente especializadas chamadas melanossomos.⁹ O HMB-45 é um anticorpo monoclonal que reage com uma proteína (chamada gp100) que está localizada dentro dos melanossomos.⁸ Tanto o HMB-45 como os anticorpos contra tirosinase são usados como marcadores imunoistoquímicos no diagnóstico diferencial do melanoma maligno.⁹

Em estudos realizados por Boyle et al,⁹ foi detectada a presença de Tirosinase em todos os melanomas estudados; também foi detectado, por esses estudos, que a reatividade para o anticorpo HMB-45 está presente em 100% dos melanomas. Outros estudos anteriores, porém, apontaram menor imunoreatividade para os anticorpos HMB-45 e Tirosinase.

Fas e Fas ligante

Fas, um receptor transmembranar, é um membro da família dos fatores de necrose tumoral. Linfócitos citotóxicos, assim como muitas outras células, expressam o Fas. O ligante para Fas é encontrado principalmente nos linfócitos T ativados; o Fas ligante é ainda encontrado em outras células, incluindo células tumorais e células dos melanomas. A interação do Fas com o Fas ligante resulta em apoptose.⁶

A expressão do Fas é altamente variável nos melanomas primários. Segundo estudo realizado por Redondo et al,¹⁰ o mais notável achado foi a ausência de Fas em lesões metastáticas e sugere que a redução da expressão pode estar associada com o fenótipo metastático.¹⁰

Fas e fas ligante não têm apresentado uso como marcadores de benignidade ou malignidade em lesões melanocíticas. Eles também são encontrados em uma grande variedade de células; assim não podem ser usados para distinguir lesões melanocíticas de não melanocíticas.⁶

Ki-67 (MIB-1)

O MIB-1 é um anticorpo monoclonal usado para detectar Ki-67 em tecidos embebidos em parafina. O Ki-67 é expresso nas fases G1, M, G2 e S do ciclo celular, mas é ausente na fase G0. Dessa forma, esse anticorpo é um marcador da proliferação celular.⁶

Em estudos realizados por Ozer et al⁶ (*apud* Mangini; Ning Li; Bhawan, 2002) foram encontrados níveis elevados de Ki-67 correlacionados com significativo volume e ainda significativo aumento em nevos displásticos, melanomas primários e melanomas metastáticos em comparação a nevos benignos. Porém, não há diferença significativa nos níveis de Ki-67 nos tecidos entre nevos displásticos, melanomas primários e melanomas metastáticos.⁶

Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA)

O Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA) é uma proteína acessória de polimerase presente no ciclo celular. Estudos realizados por Kanoto et al⁶ (*apud* Mangini; Ning Li; Bhawan, 2002) mostraram que o PCNA imologicamente maculado é maior em melanomas metastáticos.

Molécula de Adesão Celular do Melanoma (Mel-CAM)

A molécula de adesão celular do melanoma (Mel-CAM), um membro da superfamília das imunoglobulinas, é um antígeno de melanoma associado com um aumento do risco de doença metastática. Mel-CAM não se expressa em melanócitos normais, mas se expressa por nevos benignos, células de melanoma e outros tipos celulares. A interação entre Mel-CAM e seus receptores pode induzir outros sinais celulares necessários para a progressão do tumor.⁶

As moléculas de adesão celular do melanoma não são específicas para melanomas. Angiosarcomas, sarcoma Kaposi, leiomiomas, carcinomas mucoepidermóides, tumores trofoblásticos placentários e coriocarcinomas também expressam Mel-CAM.⁶

O diagnóstico usando Mel-CAM é mais eficaz quando ele é usado em um painel de marcadores para aumentar a especificidade. As moléculas de adesão celular do melanoma não são úteis na distinção de lesões melanocíticas benignas versus malignas.⁶

Integrinas

Integrinas são proteínas transmembrana que funcionam principalmente pela migração e aderência a células na matriz extracelular, bem como a outras células. Integrina b3 também tem sido associada com angiogênese. Integrinas avb3 e a5b1 são expressas em um alto estágio no melanoma metastático e no melano-

noma tardio comparado com melanoma prematuro e nevu. A Integrina avb3 esta associada com a progressão do melanoma, agindo com um receptor para vitronectina, o qual auto-regula expressão na matriz de metaloproteinase-2 e aumentando a doença invasiva.⁶

A integrina b3 pode ser usada no diagnóstico para distinguir nevu benigno do melanoma maligno em melanoma VGP.⁶

Molécula de Adesão Intercelular-1 (ICAM-1)

O ICAM-1 é uma molécula de adesão celular encontrado em muitos tipos celulares, incluindo leucócitos, células endoteliais, fibroblastos e células tumorais. Moléculas de adesão intercelular-1 mediam a adesão célula-a-célula pela ligação ao leucócito funcionalmente associado ao antígeno-1, uma integrina b2. Este contato célula-a-célula é necessário para o funcionamento da célula T helper, mediador celular e citotoxicidade dependente de anticorpo.⁶

Ambos nevu benigno (incluindo nevu displástico) e melanoma maligno expressam ICAM-1. No entanto, um diagnóstico usando este anticorpo não esta ainda válido.⁶

Ciclina D1

A ciclina D1 regula a proliferação celular e progressão da fase G1 para S do ciclo celular. A ciclina D1 tem um papel importante na distinção de nevu benigno e nevu Spitz, nevu displástico e melanoma. Alguns estudos relatam apenas deficiência in situ de ciclina D1, confundindo com diferenças não significativas entre nevu, melanomas primários e melanomas metastáticos. Estudos confirmam a utilidade da ciclina D1 no diagnóstico como um marcador melanocístico.⁶

TÉCNICAS MOLECULARES E IMUNO-HISTOQUÍMICAS

Uma variedade de técnicas moleculares, incluindo extração de DNA, amplificação de DNA por reação em cadeia de polimerase, seqüenciamento e expressão dos produtos da reação em cadeia de polimerase, análise de polimorfismos conformacionais, podem ser usados para diagnóstico laboratorial de rotina.

Numerosas proteínas, incluindo os fatores/receptores de crescimento, moléculas de adesão celular e produtos de oncogenes ou genes supressores tumorais são especialmente examinados através de secções de material tumoral embebido em parafina e fixado em formalina por técnicas imuno-histoquímicas que usam anticorpos específicos.¹¹

Muitos são os fatores que influenciam o aparecimento, crescimento, invasão e metástases nos tumores; estes fatores podem ter várias origens, podendo estar associados a alterações em determinadas regiões genômicas, por exemplo, bem como a antígenos, interação entre células e vascularização.

O conhecimento desses marcadores que podem identificar a existência de tumores ou a predisposição a desenvolvê-los é de fundamental interesse no diagnóstico e prognóstico de vários tipos de câncer. O p16 é um marcador empregado para prognóstico; entretanto o p53, VEGF, HMB-45, tirosinase, integrinas b3, ICAM-1 e ciclina D1 são marcadores que podem ser empregados no diagnóstico para distinguir as lesões melanocíticas benignas das malignas. As moléculas de adesão celular Mel-CAM são mais eficazes quando usadas com um painel de anticorpos apropriados.

O melanoma maligno é a forma mais agressiva de câncer de pele, em que o tratamento tardio é praticamente ineficaz, os marcadores moleculares mostram-se de grande importância para a sobrevivência de pacientes que desenvolvem esse tipo de doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gon AS, Minelli L, Guembarovski AL. Melanoma cutâneo primário em Londrina. *An Bras Dermatol* 2001;76(4):413-26.
2. Lapa MS, Guedes KF, Schalch FO, Landman G. Melanomas malignos cutâneos tratados no Hospital do Câncer de São Paulo: estudo retrospectivo para avaliação de distribuição, fatores prognósticos e sobrevida. *An Bras Dermatol* 2002;77(3):313-20.
3. Ashton-Prolla P. Síndromes de predisposição hereditária ao câncer de pele. In: Louro ID, Llerena JC Jr, Melo MSV, Ashton-Prolla P, Schwartsmann G, Conforti-Frões N, editores. *Genética molecular do câncer*. São Paulo: MSG; 2000. p. 206-16.
4. Waldmann V, Bock M, Jackel A, Deichmann M, Dockendorff K, Naher H. Pathogenesis of malignant melanoma. *Molecular biology aspect. Hautarzt* 1999;50(6):398-405.
5. Polsky D, Young AZ, Busam KJ, Alani RM. The transcriptional repressor of p16/Ink4a, Id1, is up-regulated in early melanomas. *Cancer Res* 2001;61(16):6008-11.
6. Mangini J, Li N, Bhawan J. Immunohistochemical markers of melanocytic lesions: a review of their diagnostic usefulness. *Am J Dermatopathol* 2002;24(3):270-81.
7. Straume O, Smeds J, Kumar R, Hemminki K, Akslen LA. Significant impact of promoter hypermethylation and the 540 C>T polymorphism of CDKN2A in cutaneous melanoma of the vertical growth phase. *Am J Pathol* 2002;161(1):229-37.

8. Boyle JL, Haupt HM, Stern JB, Mulhaupt HA. Tyrosinase expression in malignant melanoma, desmoplastic melanoma, and peripheral nerve tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:816-22.
9. Sharma S, Wagh S, Govindarajan R. Melanosomal proteins role in melanin polymerization. *Pigment Cell Res* 2002;15(2):127-33.
10. Redondo P, Solano T, Vazquez B, Bauza A, Idoate M. Fas and Fas ligand: expression and soluble circulating levels in cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2002;147:80-6.
11. Tahara E. Genetic alteration in human gastrointestinal cancers: the application to molecular diagnosis. *Cancer* 1995;75(6 Suppl):1410-7.