UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

MAÇANORI ODASHIRO

AVALIAÇÃO DO *MELANOMA INHIBITORY ACTIVITY*- MIA EM PACIENTES COM MELANOMA CUTÂNEO NO ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM TECNOLOGIA E SAÚDE

CAMPO GRANDE/MS

OUTUBRO/2010

MAÇANORI ODASHIRO

AVALIAÇÃO DO *MELANOMA INHIBITORY ACTIVITY*-MIA- EM PACIENTES COM MELANOMA CUTÂNEO NO ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO CENTRO-OESTE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM TECNOLOGIA E SAÚDE.

ORIENTADOR: PROF. DR. GÜNTER HANS FILHO

COORDENADOR DO CURSO: PROF. DR. RICARDO DUTRA AYDOS

CAMPO GRANDE/MS

OUTUBRO/2010

MAÇANORI ODASHIRO

AVALIAÇÃO DO *MELANOMA INHIBITORY ACTIVITY*-MIA- EM PACIENTES COM MELANOMA CUTÂNEO NO ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL

APROVADA POR:

_____
NOME DO ORIENTADOR, titulação (instituição de origem)
(ORIENTADOR)

_____
NOME DO EXAMINADOR INTERNO, titulação (instituição de origem)
(CO-ORIENTADOR E/OU EXAMINADOR INTERNO)

_____
NOME DO EXAMINADOR EXTERNO, titulação (instituição de origem)
(EXAMINADOR EXTERNO)

CAMPO GRANDE/MS, ____ de _____ de 2010

Maçanori Odashiro

***Melanoma Inhibitory Activity* em Pacientes com Melanoma Cutâneo no Estado do Mato Grosso do Sul** / Maçanori Odashiro – Campo Grande, 2010.

Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste.

Título em inglês: MIA in Patients with Cutaneous Melanoma in Mato Grosso do Sul State.

1. Melanoma cutâneo. 2. *Melanoma Inhibitory Activity*
3. Brasil. 4. Recidiva.

DEDICATÓRIA

A minha esposa,

pelo amor, dedicação, companheirismo,

apoio, amizade e incentivo

demonstrados ao longo destes anos de convívio.

Aos meus filhos, Danilo, Luciana

(Roberto) e Alexandre (Patrícia), pelo amor, carinho,

dedicação e incentivo constantes, toda a minha gratidão.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao **Prof. Dr. Günter Hans Filho**, Professor Adjunto da UFMS, pelo incentivo, apoio e orientação na realização desta Tese, pelas lições de medicina e vida, e pela amizade de todos esses anos.

À **Profa. Dra**. **Ana Rita Coimbra Motta de Castro,** Professora Adjunto da UFMS, e à **Alcione Faro Stief**, farmacêutica bioquímica da UFMS, pela ajuda na execução do teste de ELISA.

Aos Médicos **Fábio Kanomata**, **Erlon Klein**, **Daniela Santos**, **Carmencita Lang**, **Amauri Ferreira**, **João Siufi**, **Adalberto Siufi**, **Eva Siufi**, **Rosana L. Melo**, **Heda Rodrigues**, **Moacyr Basso Jr.**, **Jesusmar M. Ramos, Jorge João Chacha,** e **Carlos Alberto de Freitas**: por colaborarem com este trabalho, nos colocando em contato com seus pacientes e esclarecendo- os sobre o nosso estudo.

À Profa. Dra. **Elenir Rose Jardim Cury Pontes**, Professora da Disciplina de Bioestatística do Departamento de Medicina Preventiva da UFMS, pelos ensinamentos e orientação estatística.

À Dra. **Izaura Minei,** Dr. **Donevir José Cividini**, Dr. **Tatsuya Sakuma** e Dr. **José Ronaldo Gonzales** pelo apoio na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Mato Grosso do Sul** (UFMS), pelo apoio efetivo na realização desta tese.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste**, UFMS.

Ao Prof. Dr. **Ricardo Dutra Aydos**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, pelo incentivo e apoio a esta pesquisa.

Aos **Secretários** do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, pelo apoio durante a execução e conclusão desta tese.

À Profa Dra **Maria Elizabeth Cavalheiros Dorval**, Laboratório de Parasitologia – Departamento de Patologia CCBS, pela gentileza em armazenar as amostras no freezer do Departamento.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo das camadas da epiderme da pele. 18

Figura 2 – Histologia da epiderme da pele. 19

Figura 3 – Aspectos clínicos dos MC.. 29

Figura 4 – Aspectos histopatológicos dos MC. 29

Figura 5 – Curva de sobrevida em 15 anos do sistema de estagiamento de melanoma, comparando doença localizada (estágios I e II), metástases regionais (estágio III) e metástases à distância (estágio IV). 33

Figura 6 – 10 anos de sobrevida do estagiamento do melanoma do banco de dados da AJCC, comparando as diferentes categorias T e os seus agrupamentos, para estágios I e II do melanoma. 38

Figura 7 – Taxa de sobrevida em 5 anos comparando as diferentes categorias N e os agrupamentos para o estágio III. 39

Figura 8 – Esquema representando as diversas possíveis vias de metástases do MC e suas respectivas porcentagens de ocorrência. 44

Figura 9 – Esquema representando as diversas possíveis vias de metástases do MC e suas respectivas porcentagens de ocorrência. 46

Figura 10 – Kit MIA ELISA em sua embalagem original. 61

Figura 11 – Mediana e quartis dos valores de MIA, segundo os grupos 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estagiamento do Melanoma. 31

Tabela 2 – Grupos de Estágio para Melanoma Cutâneo. 32

Tabela 3 – Recomendações para seguimento dos pacientes com MC..... 48

Tabela 4 – Recomendações para seguimento dos pacientes com MC..... 59

Tabela 5 – Dados clínicos e níveis séricos de MIA nos pacientes e no grupo controle 64

Tabela 6 – Descrição dos dados clínicos de todos os participantes, quanto ao sexo e idade 65

Tabela 7 – Estatística descritiva dos valores séricos de MIA (ng/ml) para os grupos. 66

Tabela 8 – Descrição dos dados do grupo controle quanto ao nível de MIA e raça 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AJCC	*American Joint Commette on Cancer*
Col	Colaboradores
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FUNDECT	Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INEP	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
LAC	Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia
LDH	Lactato Desidrogenase
LMM	Lentigo Maligno Melanoma
MC	Melanoma Cutâneo
MES	Melanoma Expansivo Superficial
MIA	*Melanoma Inhibiory Activity*
MLA	Melanoma Lentiginoso Acral
MN	Melanoma Nodular
MS	Mato Grosso do Sul
PCNA	Antígeno celular de proliferação nuclear (*Proliferation Cellular Nuclear Antigen*)
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RNM	Ressonância Magnética
SEER	Vigilância, Epidemiologia e Resultados Finais (*Surveillance, Epidemiology and End results)*
TC	Tomografia Computadorizada
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
US	Ultrassom

RESUMO

A incidência de melanoma cutâneo (MC) vem aumentando nos últimos anos. A presença de metástase faz parte do estagiamento do MC e está relacionada com o prognóstico. As principais aplicações dos marcadores tumorais são o monitoramento de resposta à terapia e detecção precoce de doença recorrente no seguimento dos pacientes. *Melanoma Inhibitory Activity* (MIA) tem sido demonstrado ser um bom marcador tumoral para MC. Não existe nenhum estudo brasileiro sobre MIA e MC. O Objetivo do presente trabalho é o de avaliar o teste sangüíneo MIA em pacientes com MC do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, por meio de materiais e métodos específicos traduzidos pela participação voluntária de pacientes com MC diagnosticados no Laboratório de Patologia LAC, Campo Grande - MS, de abril de 2008 a outubro de 2009. Os oncologistas do citado município foram contatados e esclarecidos para convidar seus pacientes com MC a participarem do estudo. A mensuração dos níveis séricos de MIA foi feita pelo teste ELISA-MIA (Roche®). Cada paciente teve uma amostra colhida. Os resultados foram obtidos após terem sido feitas as coletas de amostras sangüíneas em 15 pacientes com MC sem metástese (grupo 1) e 10 pacientes com MC com metástese (grupo 2). Foram ainda coletadas amostras sangüíneas de cinco pessoas sadias (grupo controle). O grupo 1 foi composto de oito mulheres e sete homens, o grupo 2 por duas mulheres e oito homens, e o controle por três mulheres e dois homens. A média de idade do grupo 1 foi de 60,3 anos (28 a 80 anos), a do grupo 2 foi de 60,8 anos (39 a 59 anos). Os níveis séricos de MIA do grupo 1 variaram de 3,5 ng/ml a 11,1 ng/ml, com média de 6,78 ng/ml, do grupo 2 variaram de 5,8 ng/ml a 30,0 ng/ml com média de 21,21 ng/ml. Os níveis séricos do grupo controle variaram de 4,0 ng/ml a 8,6 ng/ml, com média de 5,64 ng/ml. Houve diferença estatística entre os níveis séricos dos grupos com e sem metástase e entre o grupo com metástase e o grupo controle. Não houve diferença entre os grupos sem metástase e o grupo controle. Assim, é possível concluir que os níveis séricos de MIA em pacientes sem metástase e/ou recidiva clínica foram significativamente menores que os de pacientes com metástase e/ou recidiva clínica. Não houve diferença estatística significante entre os níveis séricos de MIA sem metástase e o grupo controle. O teste MIA é de fácil execução, com custo viável, e poderia ser incluído no protocolo de acompanhamento de pacientes tratados com MC.

PALAVRAS- CHAVE: MIA. MELANOMA CUTÂNEO. VIABILIDADE DE EXECUÇÃO DE TESTE MIA. AVALIAÇÃO DE NÍVEIS SÉRICOS. PACIENTES DE MS

ABSTRACT

The incidence of cutaneous melanoma (CM) has increased in recent years. Metastasis is part of the staging of the CM and is related to the prognosis. The main application of tumor markers in monitoring response to therapy and early detection of recurrent disease in follow-up of CM patients. Melanoma Inhibitory Activity (MIA) has been shown to be a good tumor marker for CM. There is no Brazilian study about MIA and CM. Therefore, the objective of this study is to evaluate the blood test MIA in patients with CM of Mato Grosso do Sul, Brazil. To accomplish the objective, patients diagnosed with CM in the Laboratory of Pathology, LAC, Campo Grande - MS, from April 2008 to October 2009 were invited to participate in the study. Oncologists from this city were contacted and informed to invite their patients with CM to participate in the study. The measurement of serum MIA was made by the MIA-ELISA test (Roche ®). Each patient had 1 sample collected. As results, in total, blood samples from 15 CM patients without metastasis (*Group 1*) and 10 patients with metastasized CM (*Group 2*) were collected. For comparison, blood samples from 5 healthy persons (control group) were collected. *Group 1* was consisted of 8 women and 7 men, *Group 2* by 2 women and 8 men, and the *control group* by 3 women and 2 men. The average age of *Group 1* was 60.3 years (28 to 80 years), of *Group 2* was 60.8 years (39 to 59 years). Serum levels of MIA in *Group 1* ranged from 3.5 ng / ml to 11.1 ng / ml, with an average of 6.78 ng / ml; *Group 2* ranged from 5.8 ng / ml to 30.0 ng / ml with an average of 21.21 ng / ml. Serum levels of the *control group* ranged from 4.0 ng / ml to 8.6 ng / ml, with an average of 5.64 ng / ml. There was statistical difference between serum levels of the Groups with and without metastasis (*Groups 1* and *2*) and between the group with metastasis (*Group 2*) and the control group. There was no difference between the groups without metastasis and control group. Therefore, we concluded that serum levels of MIA in patients without metastasis and / or clinical relapse were significantly lower than those of patients with metastasis and / or clinical relapse. There was no statistically significant difference between serum levels of MIA without metastasis and control group. MIA test is easy, cost-feasible, and could be used in the follow-up of patients treated of CM.

KEY-WORDS: MIA. CUTANEOUS MELANOMA. FESEABILITY TO PERFORM THE MIA TEST. EVALUATION OF BLOOD LEVELS. PATIENTS OF MS

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RESUMO

1 INTRODUÇÃO 14

2 REVISÃO DE LITERATURA 17

2.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS 17

2.2 A PELE – ANATOMIA E HISTOLOGIA 18

2.3 MELANOMA CUTÂNEO 21

2.3.1 Epidemiologia 21

2.3.2 Fatores de Risco 23

2.3.3 Apresentação Clínica e Histopatológica 25

2.3.4 Estagiamento 30

2.3.5 Fatores Prognósticos 40

2.3.5.1 Fatores Prognósticos Clínicos 40

2.3.5.2 Fatores Prognósticos Histopatológicos 41

2.3.6 Metástases 44

2.4 *Melanoma Inhibitory Activity* (MIA) 49

3 OBJETIVOS 56

3.1 GERAL 56

3.2 ESPECÍFICOS 56

4 METODOLOGIA 57

4.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES E DO GRUPO CONTROLE 57

4.2 ACOMPANHAMENTO DOS PACIENTES 58

4.3 COLETA DE SANGUE 59

4.4 MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE MIA 60

4.4.1 Teste de ELISA do MIA 60

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 61

4.6 ORÇAMENTO FINANCEIRO 62

5 RESULTADOS 63

6 DISCUSSÃO 68

7 CONCLUSÃO 73

REFERÊNCIAS 74

ANEXOS 83

ANEXO 1 84

ANEXO 2 85

1 INTRODUÇÃO

Durante a segunda metade do Século XX, a incidência de câncer de pele aumentou, juntamente com a da sua mortalidade. A razão para este aumento provavelmente está relacionada à mudança nos hábitos de vida das pessoas, incluindo tipo de vestimenta e lazer (FERRARI JUNIOR *et al.*, 2008).

Melanoma Cutâneo (MC) corresponde a apenas 3% de todos os tumores cutâneos. Entretanto, o MC apresenta grande morbidade e alta taxa de mortalidade, correspondendo a 75% de todas as mortes relacionadas a tumores cutâneos malignos, representando, assim, um problema de saúde pública (PARKER, *et al.*, 1996).

O diagnóstico do melanoma se dá através do exame dermatoscópico e é confirmado pelo exame histopatológico (GARBE e EIGENTLER, 2007). A espessura do tumor, também conhecida como espessura de Breslow, é considerada o fator prognóstico mais importante no MC e serve de base para seu estagiamento.

Outros parâmetros histopatológicos importantes são a presença de ulceração e, para tumores finos (menor que 1 milímetro de espessura), o nível de invasão de Clark. Assim como em outras neoplasias malignas, a presença de metástases para linfonodos e para órgãos à distância também faz parte do estagiamento (BALCH, *et al.*, 2001). Três subgrupos de metástases à distância devem ser distinguidos: metástases para pele e partes moles, metástases pulmonares e metástases para outras vísceras. O primeiro subgrupo possui melhor prognóstico e o último o pior prognóstico (GARBE e EIGENTLER, 2007). A presença de valores de Lactato desidrogenase (LDH) nos primeiros dois grupos eleva o estagiamento para o último subgrupo. Assim, pela

primeira vez o valor de um exame laboratorial foi introduzido no sistema de estagiamento do MC (GARBE e EIGENTLER, 2007).

O monitoramento do MC é considerado por alguns autores como controverso (DICKER, *et al.*, 1999). Deve-se acompanhar os pacientes não só pela possível recorrência, mas também pela possibilidade do desenvolvimento de um segundo MC, o que ocorre em 3% a 6% dos pacientes. É mandatório um exame clínico completo com especial atenção à palpação das cadeias linfonodais suspeitas. Exames laboratoriais como dosagem de LDH possuem indicação por estar relacionada com o prognóstico. Além disso, recomenda-se radiografia de tórax em todos os pacientes; ressonância magnética de crânio e ultrasom e tomografia computadorizada abdominal nos pacientes com linfonodos histopatologicalmente acometidos, de acordo com o protocolo de cada instituição (MACHADO, et al., 2004).

A freqüência das avaliações clínicas e acompanhamento para pacientes com estádio II e III ainda não está bem estabelecida, porém, segundo o protocolo da Universidade Federal de Minas Gerais, é sugerido o seguinte cronograma: 1º ano: 2/2 meses; 2º ano: 3/3 meses; 4º e 5º anos: 6/6 meses; 5º ao 10º ano: anual; a partir do 10º ano: alta (MACHADO, et al., 2004).

Melanoma Inhibitory Activity-MIA é uma proteína descoberta recentemente que está relacionada ao desenvolvimento e à progressão do MC. Os níveis sangüíneos de MIA podem ser medidos facilmente por ELISA, e seu aumento tem sido correlacionado com o aparecimento de metástases e, por isto, está sendo estudada como um possível marcador tumoral do MC (BOSSERHOFF, *et al.*, 1997). Até o momento, não existe nenhum estudo brasileiro sobre o MIA e MC.

As principais aplicações de marcadores tumorais são o monitoramento de resposta à terapia e detecção precoce de doença recorrente no seguimento dos pacientes. Níveis sangüíneos de várias substâncias, incluindo a proteína S-100 e MIA, têm demonstrado estarem aumentados em estágios avançados de melanoma (MATSUSHITA, *et al.*, 2002).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os melanócitos são células dendríticas pigmentadas presentes normalmente na camada basal da epiderme, no trato uveal ocular, no revestimento epitelial da cavidade nasal, orofaringe, ânus, vagina, trato urinário e sistema nervoso central (CHANG, KARNELL e MENCK, 1998). A neoplasia maligna derivada dos melanócitos é denominada melanoma (LEVER e ELDER, 1997).

O melanócito é a célula madura que produz e contém melanina. A melanina é um pigmento sintetizado a partir do aminoácido tirosina e armazenado em vesículas chamadas melanossomos. Os melanócitos originam-se embriologicamente da crista neural e podem ser classificados, de acordo com sua localização anatômica, em epidérmicos, das mucosas, meníngeos e uveais (LEVER e ELDER, 1997). As células que dão origem ao melanócito cutâneo migram em direção ao epitélio da pele (HOGAN, ALVARADO e WEDDELL, 1971).

O MC representa a maioria dos casos de melanomas, 91%, enquanto o melanoma ocular é responsável por 5,3%. Os melanomas com sítio primário ignorado e de mucosas correspondem a 2,2% e 1,3% dos casos respectivamente (CHANG, KARNELL e MENCK, 1998). Apesar de mais prevalente, o MC apresenta uma taxa de mortalidade em geral menor que o melanoma ocular, sendo de 13,8% em 5 anos (TUCKER e GOLDSTEIN, 2003) e mais de 40% em 10 anos (HAWKINS, 2004), respectivamente.

2.2 A PELE – ANATOMIA E HISTOLOGIA

A pele é composta por duas camadas, epiderme e derme. Sua função engloba proteção mecânica e fotoproteção, funções fisiológicas, metabólicas e reparadoras. Abaixo da derme encontra-se o tecido adiposo. Em secções histológicas de pele normal, a junção entre a epiderme e a derme é irregular devido a numerosas papilas dérmicas que se estendem para dentro da epiderme. Estas duas camadas estão separadas por uma membrana basal de estrutura química complexa. A vascularização rica da derme leva os nutrientes necessários para as duas camadas, já que a epiderme não possui vasos sangüíneos (LEVER e ELDER, 1997).

A epiderme é composta por diversos tipos de células, das quais, mais de 90% são ceratinócitos e o restante compreende melanócitos, células de Langerhans, células de Merkel e axônios não mielinizados (LEVER e ELDER, 1997) (Figuras 1 e 2).

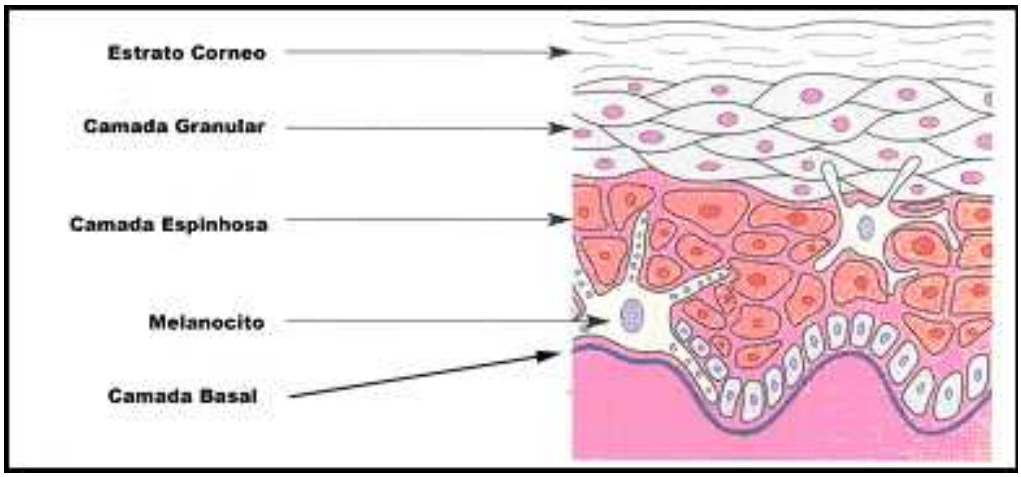


Figura 1 - Esquema representativo das camadas da epiderme da pele.
Fonte: LEVER E ELDER, 1997, p. 17.

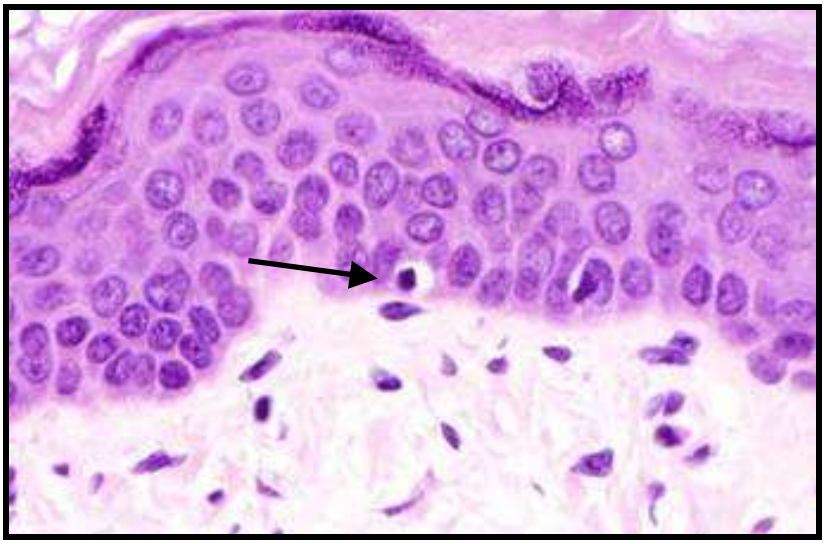


Figura 2 - Histologia da epiderme da Pele. Os melanócitos são células pequenas com núcleo escuro e escasso citoplasma, localizado na camada basal da epiderme (seta) [hematoxilina & eosina (H&E), 400x].

Os ceratinócitos estão dispostos em 4 camadas: camada de células basais, camada de células espinhosas, camada granular e camada córnea. A camada de células basais é formada por uma única camada de células colunares, que se dispõem perpendicularmente à linha divisória entre a epiderme e a derme. A quantidade de melanina presente nas células basais determina a cor da pele. Por exemplo, em pessoas de pele clara, as células basais contêm pouca quantidade de melanina, o inverso ocorrendo em pessoas de pele escura. A atividade mitótica, isto é, divisão nuclear e celular, é freqüentemente observada nesta camada da epiderme, já que é neste local que os ceratinócitos se dividem (LEVER e ELDER, 1997). Os ceratinócitos migram da camada basal para as subseqüentes camadas (camada de células espinhosas, camada granular e finalmente camada córnea) e levam de 26 a 42 dias para completar toda esta maturação (HALPRIN, 1972).

Os melanócitos, em secções histológicas convencionais coradas pela hematoxilina & eosina, aparecem como células de citoplasma claro e com núcleo pequeno e escuro. Eles são encontrados entre as células basais da epiderme. O número médio de melanócitos em relação ao número de ceratinócitos varia de acordo com a região anatômica do corpo e aumenta com a exposição solar repetida, sendo em geral de 1 para cada 10 ceratinócitos. O melanócito produz a melanina e, através dos seus processos dendríticos, a transfere para os ceratinócitos da camada basal. Por via de regra, existe uma maior quantidade de melanina nos ceratinócitos da camada basal que nos melanócitos propriamente ditos (LEVER e ELDER, 1997). Apenas 10% das células da camada basal são melanócitos, por isso cada um deles supre uma grande quantidade de ceratinócitos com melanina, formando então uma unidade de melanina epidérmica (FITZPATRICK, 1993). Normalmente, não existe diferença entre o número de melanócitos de uma pessoa de pele negra e de uma pessoa de pele caucasiana não exposta ao sol. Os melanócitos dos negros são mais reativos e produzem uma maior quantidade de melanina, se comparados aos melanócitos dos caucasóides. Por outro lado, existe diferença no número de melanócitos de acordo com o local do corpo, sendo a face e os genitais masculinos os locais com maior densidade de melanócitos, e o tronco, o local de menor densidade (STARICCO, 1957). Além disto, examinando-se a pele de áreas que são habitualmente expostas ao sol, encontrou-se nesta uma maior concentração de melanócitos quando comparada a áreas não expostas de uma mesma pessoa (QUEVEDO, *et al.*, 1965).

A derme é composta histologicamente por fibroblastos, vasos sangüíneos com suas células endoteliais, vasos linfáticos, células nervosas, monócitos, macrófagos e mastócitos, submersos em uma matriz de colágeno, glicosaminoglicanas e elementos

de sustentação. Além disto, são encontrados os anexos cutâneos representados pelos folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (LEVER e ELDER, 1997).

2.3 MELANOMA CUTÂNEO

2.3.1 Epidemiologia

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública mundial devido às altas taxas de incidência e letalidade. Ele é responsável por mais de 12% de todas as causas de óbito em todo o mundo, sendo que mais de 7 milhões de pessoas morrem anualmente da doença. Como a esperança de vida no planeta tem melhorado gradativamente, a incidência de câncer, estimada em 2002 em 11 milhões de casos novos, alcançará 15 milhões em 2020 (INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER, 2005).

A morbidade e mortalidade do câncer de pele têm aumentado na população caucasiana em ambos os sexos em diversas regiões do planeta. Recentemente, o MC tem recebido uma importante atenção devido ao aumento da sua incidência em vários países. Tanto a sua incidência quanto a sua distribuição quanto ao tipo histológico mostram grande diferença geográfica (ARMSTRONG e KRICKER, 1994).

A incidência e mortalidade do MC cresceram nos últimos 50 anos (BERWICK, *et al.*, 2005). A taxa anual de crescimento de mortalidade, avaliada em torno de 4% a 6% por ano (CHANG, KARNELL e MENCK, 1998), é maior do que a de qualquer outro câncer na população de raça branca e fica abaixo apenas do câncer de pulmão (KOH, *et al.*, 1995).

Sabe-se que a maior incidência registrada do MC ocorreu na Austrália entre os anos de 1980 a 1987, onde a incidência foi de 55,8 por 100.000 homens e de 42,9 por 100.000 mulheres (MACLENNAN, *et al.*, 1992). Altas taxas também foram encontradas na Nova Zelândia com 15,6 casos por 100.000 homens e 21,4 casos por 100.000 mulheres. Um aumento na taxa de MC em mulheres também foi encontrado na Escócia (MACKIE, *et al.*, 1992). Este tumor é um dos que mais crescem entre a população caucasiana nos Estados Unidos (EUA) (RIES, *et al.*, 2000). Segundo o SEER, (do inglês *Surveillance, Epidemiology and End results*), a taxa de incidência de MC entre a população caucasiana cresceu em 4% ao ano entre 1973 e 1991, sendo que os homens foram mais atingidos. Os registros revelam que, em 1991, a incidência era de 15,5 por 100.000 homens e de 11,5 por 100.000 mulheres. Em 1998, esta taxa cresceu para 18,3 e 13,0 por 100.000 homens e mulheres, respectivamente (DESMOND e SOONG, 2003). Este aumento da incidência de MC foi acompanhado pelo aumento da mortalidade por esta neoplasia. Nos Estados Unidos, a incidência anual de MC é de 18 casos novos por 100 mil habitantes e corresponde à quinta e à sexta neoplasia mais freqüente no homem e na mulher, respectivamente (JEMAL, *et al.*, 2005). Em 1979, o risco estimado durante a vida de um norte-americano caucasiano adquirir MC era em torno de 1:250. Atualmente, este risco está em torno de 1:64 (SCHAFFER, *et al.*, 2004).

A incidência de MC na população caucasiana tem aumentado em maiores proporções que qualquer outro tipo de neoplasia maligna (LEE, 1992; ELWOOD, 1993; GARLAND, GARLAND e GORHAM, 1993). Este aumento de incidência tem sido atribuído basicamente à mudança nos hábitos das pessoas em relação à exposição solar (SCOTTO, PITCHER e LEE, 1991). Mudanças no estilo de vida incluindo aumento das recreações ao ar livre e tendência ao uso de menos vestimentas contribuíram

significantemente ao aumento da incidência desta doença (SWERDLOW, 1990; THORN, *et al.*, 1990).

No Brasil, similarmente aos outros países, houve um aumento na incidência de MC. Segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o sul do Brasil tem o maior índice deste tumor e em 1999 apresentava 2,4 casos por 100.000 homens e 2,7 por 100.000 mulheres (BRASIL, 1999). Em um estudo feito entre 1978 e 1982, com populações das cidades de São Paulo, Porto Alegre, Recife e Fortaleza, a incidência variava de 1,3 a 4,0 por 100.000 pessoas (BRASIL, 1992).

Os dados do Ministério da Saúde indicaram uma estimativa para 2008 de 2950 casos novos de MC em homens e 2970 casos novos em mulheres. As maiores taxas estimadas encontram-se na região sul (INCA, 2005). Esta variação reflete incidência 13 vezes maior de MC na população de pele clara se comparada com a população de pele negra (ELDER, 1995). Os dados do Ministério da Saúde de 1996 indicam um número de 700 óbitos anuais causados por MC, o que corresponde a 0,7% dos óbitos anuais causados por todos os tipos de câncer (FLECK, 1998).

2.3.2 Fatores de Risco

A etiologia do MC ainda não está plenamente elucidada. Os vários fatores relacionados ao desenvolvimento deste tumor são chamados fatores de risco (LEVER e ELDER, 1997).

A exposição solar, principalmente a exposição intermitente e intensa, é o principal fator de risco conhecido do MC e pode interagir com outros fatores de risco importantes como o nevo (ARMSTRONG e KRICKER, 1993). A idade de início da exposição solar

tem participação fundamental no risco do desenvolvimento da doença. Desta forma, indivíduos que se expõem ao sol desde a infância têm uma chance maior de desenvolver MC na idade adulta. Assim, hoje está bem estabelecido que o número de queimaduras devido à exposição solar na infância e na adolescência está associado ao aparecimento de MC na idade adulta, o que torna a proteção contra radiações solares extremamente importantes nessa fase da vida (LIM e COOPER, 1999). É importante ressaltar que, segundo o censo do Brasil de 2000, o número de indivíduos entre 0 e 19 anos corresponde a 40,2% da população total brasileira, sendo que 38,8% deles vivem em áreas urbanas (BRASIL, 2006).

Traços fenotípicos como pele, cabelos e olhos claros, dificuldade em bronzear e tendência a efélides identificam os indivíduos propensos ao desenvolvimento do MC (CARLI, *et al.*, 1999).

A presença de nevos melanocíticos também é considerada um fator de risco para o MC (SNELS, *et al.*, 1999). Dentre as lesões névicas descritas como associadas ou precursoras do MC, destacam-se o Nevo Melanocítico Gigante Congênito, o Nevo Spillus, o Nevo de Ota e, principalmente, o Nevo Displásico (SNELS, *et al.*, 1999). A presença de nevos melanocíticos também está diretamente relacionada à exposição solar em idade jovem (crianças) (GARBE e EIGENTLER, 2007).

O nevo atípico ou displásico é um dos principais fatores independentes para o risco aumentado de MC. Ele pode ocorrer em forma múltipla e está presente em metade dos casos de MC sem história familiar, podendo também estar associado a história familiar de MC, a chamada Síndrome do Nevo Displásico, onde a carga genética do indivíduo parece participar na fisiopatogenia do MC (SNELS, *et al.*, 1999).

Cerca de 10% dos casos de MC possuem associação com a Síndrome familiar do melanoma múltiplo mole atípico (SLOMINSKI, *et al.*, 2001).

Outra doença na qual a genética exerce influência sobre a incidência de MC é o xeroderma pigmentoso, doença hereditária autossômica recessiva caracterizada por hipersensibilidade cutânea e celular à radiação ultravioleta e deficiência no mecanismo de reparação do DNA lesado pela radiação. As pessoas afetadas têm um risco de até 2.000 vezes maior de adquirir MC do que a população em geral (SPATZ, *et al.*, 2001).

Existe uma vasta literatura sobre a associação de exposição solar e o desenvolvimento de melanoma (HOCKER e TSAO, 2007). Sendo assim, de grande importância são os dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INEP, Ministério da Ciência e Tecnologia), mostrando que Campo Grande-MS possui um dos maiores índices de incidência raios ultravioletas-B no verão, quando comparada a outras cidades brasileiras (BRASIL, 2009).

2.3.3 Apresentação Clínica e Histopatológica

O MC é classificado, de acordo com sua morfologia clínica e histopatológica, em 4 grupos: Lentigo Maligno Melanoma (LMM), Melanoma Expansivo Superficial (MES), Melanoma Nodular (MN) e Melanoma Lentiginoso Acral (MLA) (Lever e Elder, 1997). O reconhecimento clínico destas lesões, com exceção do melanoma nodular, pode ser facilitado pela identificação de assimetria, irregularidade das bordas, variação de cor e diâmetro maior que 6 mm. Tais aspectos são ressaltados na regra do A, B, C, D, onde o A corresponde à assimetria; o B, ao contorno das bordas da lesão; o C, à cor; e o D, ao diâmetro (NACHBAR, *et al.*, 1994).

Em homens, os locais mais comuns de ocorrência são cabeça, pescoço e tronco, enquanto nas mulheres o MC é mais freqüente nos membros inferiores (VENEGAS, *et al.*, 1992).

De acordo com os patologistas, os critérios mais utilizados para o diagnóstico histológico de lesões melanocíticas (malignas *versus* benignas) são 12: 1) tamanho, 2) simetria, 3) delimitação lateral, 4) maturação, 5) disseminação pagetóide, 6) necrose/ulceração, 7) infiltrado inflamatório, 8) sinais de regressão, 9) atipias celulares, 10) mitoses, 11) melanização e 12) proliferação de células isoladas. (VERONESE e MARQUES, 2004).

O LMM parece estar relacionado à intensidade do dano actínico, particularmente em indivíduos de pele clara que vivem em clima tropical. Surge principalmente nas áreas expostas da cabeça e do pescoço, com predileção pela região malar (COHEN, 1995). Este tipo de tumor é praticamente exclusivo da raça branca, com um leve predomínio do sexo feminino e surge após os 40 anos de idade, com um pico de incidência na sétima e oitava década de vida (COHEN, 1995). Histopatologicamente, existe um aumento no número de melanócitos da camada basal da epiderme, e alguns apresentam hipercromasia nuclear (coloração mais intensa do núcleo devido à maior carga genética) e pleomorfismo (núcleos de formatos variados) (LEVER e ELDER, 1997). A epiderme geralmente está adelgaçada. Observa-se abundante degeneração elastótica na derme, conseqüência do dano actínico. Em lesões mais avançadas, freqüentemente são encontrados ninhos de melanócitos atípicos e migração pagetóide (células atípicas envolvendo camadas da epiderme). O envolvimento de estruturas anexais e pilosas também é freqüente. Apenas 5% dos LMMs apresentarão um crescimento vertical em sua evolução (LEVER e ELDER, 1997).

O MES representa cerca de 70% dos casos de melanoma cutâneo e também está associado ao dano actínico. No tronco, é mais comum no sexo masculino e nos membros inferiores, no sexo feminino. Tem como um dos primeiros sinais clínicos a variação na cor, fato atribuído à presença de melanócitos nas diferentes camadas da epiderme, além de melanófagos na derme (LEVER e ELDER, 1997). A assimetria e irregularidade das bordas observadas ao exame clínico traduzem-se histopatologicamente por um limite mal definido da tumoração, com células isoladas mesclando-se imperceptivelmente à epiderme normal (HEASLEY, TODA e MIHM JR, 1996). Microscopicamente, as lesões demostram melanócitos grandes e arredondados (epitelióide) em um padrão pagetóide em toda a extensão da epiderme. A epiderme geralmente está espessada, diferentemente do LMM. Na derme, geralmente há melanófagos e um infiltrado linfocitário regular. O crescimento vertical na invasão da derme assemelha-se ao melanoma nodular (HEASLEY, TODA e MIHM JR, 1996).

O MLA surge a partir dos 50 anos de idade e é a forma mais comum em negros e asiáticos. Acomete principalmente as palmas, plantas e regiões subungueais. O sinal de Hutchinson – pigmentação da prega subungueal – tem valor semiológico importante. O MLA não é reconhecido somente pela sua localização característica, mas também pelo seu curto período de crescimento *in situ* antes de se tornar invasivo. Histopatologicamente apresenta-se com ninhos de células melanocíticas atípicas na junção dermoepidérmica, sendo a epiderme normal ou hiperplásica. O quadro histopatológico lembra muito o do LMM, exceto pela presença da acantose irregular. As células atípicas podem ter um formato fusiforme. Nota-se ausência de elastose na derme, diferentemente dos outros tipos de melanoma. A progressão do tumor é

semelhante à do melanoma nodular (LEVER e ELDER, 1997; BYERS e BHAWAN, 1998).

O MN é o segundo tipo de melanoma cutâneo mais freqüente. Em geral, encontram-se lesões maiores que 5 mm, com crescimento rápido, invadindo a derme desde o princípio. Clinicamente, o MN apresenta-se como uma lesão exofítica, papulosa ou nodular, onde a regra do A, B, C, D não se aplica. Sangramento e ulceração são achados comuns. Venegas e colaboradores estudaram 101 casos de MC em Porto Alegre. O tipo mais freqüente foi o melanoma nodular, representado por 36,6% de todos os casos (VENEGAS, *et al.*, 1992).

Existe um subtipo de MC chamado de melanoma desmoplásico, que histopatologicamente é composto por células fusiformes. É uma variante incomum, descrita primeiramente por Conley e colaboradores em 1971 (CONLEY, LATTES e ORR, 1971). Ocorre mais comumente em pessoas idosas em áreas de grande exposição solar como a cabeça, pescoço e parte superior do tórax, estando freqüentemente associado a dano actínico extenso (KUCHER, *et al.*, 2004). Clinicamente, as lesões são despigmentadas e não aparentam agressividade, o que pode causar problemas no diagnóstico. Histologicamente, os melanomas desmoplásicos são compostos por agrupamentos pouco circunscritos de células fusiformes e hipercromáticas, presentes na derme, com um infiltrado de linfócitos.

Em geral, o diagnóstico do MC se dá através do exame dermatoscópico e é confirmado pelo exame histopatológico. Recomenda-se uma margem cirúrgica de segurança de, pelo menos, 1,0 e 2,0 cm em tumores menores e maiores que 2,0 milímetros de espessura, respectivamente (GARBE e EIGENTLER, 2007).

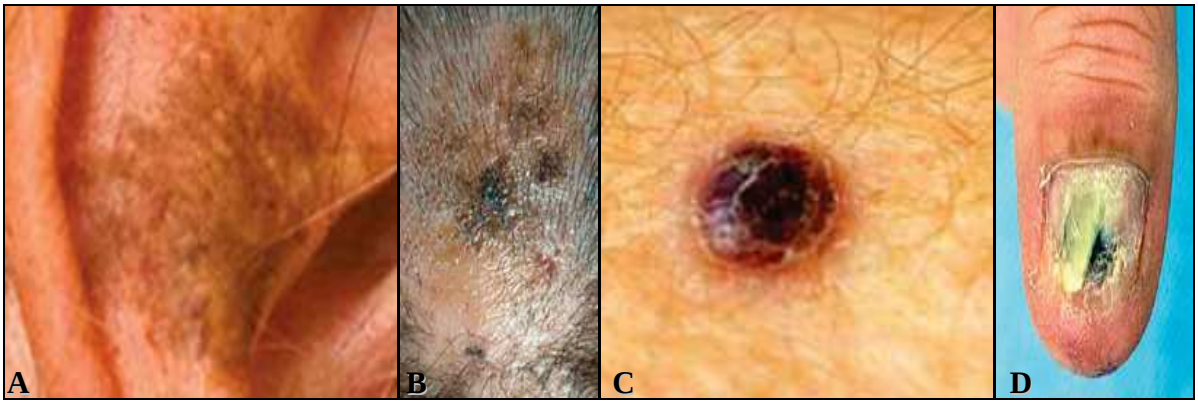


Figura 3 – Aspectos clínicos dos MC. A:LMM; B:MES; C:MN; D:MLA.

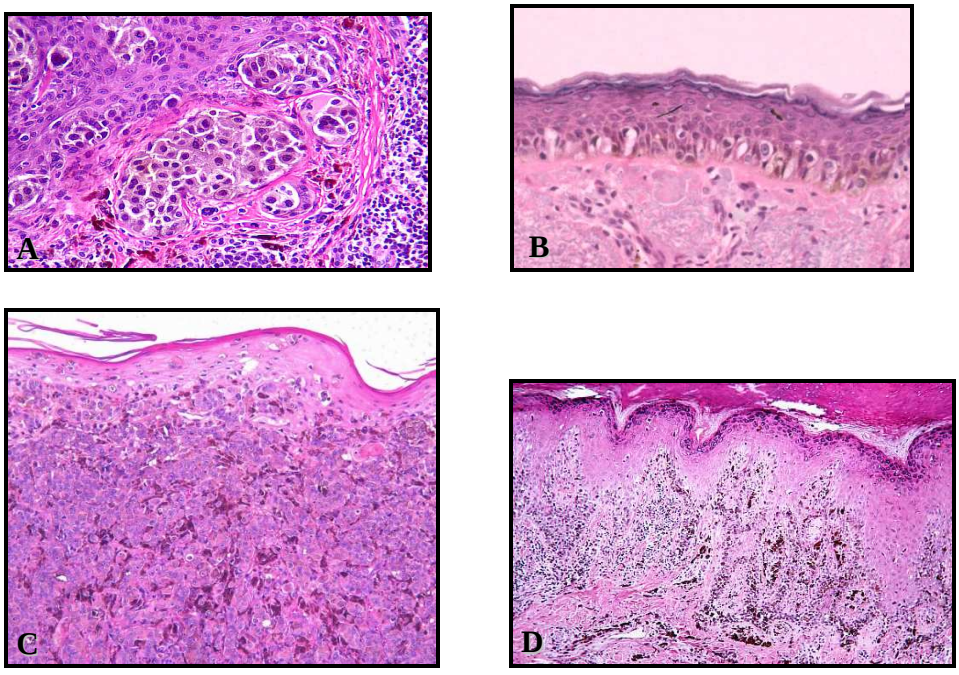


Figura 4 – Aspectos histopatológicos dos MC. A: LMM; B: MES; C: MN; D: MLA.

2.3.4 Estagiamento

Um sistema de estagiamento para o MC, assim como para outras neoplasias malignas, é importante porque proporciona: 1) nomenclatura de definições e termos consistentes baseada no prognóstico; 2) uma maneira de agrupar os pacientes em grupos definidos em relação ao risco de metástase e sobrevida; 3) critérios que proporcionam estratificação e para reportar resultados de estudos clínicos; 4) um componente crítico para comparar resultados de tratamentos entre diferentes centros e 5) uma poderosa ferramenta para decisão de opções clínicas de tratamento (BALCH, *et al.*, 2003).

O atual sistema de estagiamento para o MC é apresentado nas tabelas 1 e 2, de acordo com o “American Joint Comitee on Cancer” (AJCC) (BALCH, *et al.*, 2009).

Tabela 1 – Estagiamento do Melanoma.

Classificação T	Espessura	Ulceração
Tis	NA	NA
T I	≤ 1.0 mm	a: sem ulceração e mitoses <1mm^2 b: com ulceração ou mitoses ≥ 1mm^2
T2	1.01 – 2.0 mm	a: sem ulceração b: com ulceração
T3	2.01 – 4.0 mm	a: sem ulceração b: com ulceração
T4	>4.0 mm	a: sem ulceração b: com ulceração

Classificação N	No. De nódulos metastáticos	Massa nodular metastática
N0	0	NA
N1	1 nódulo	a: micrometastase *† b: macrometastase †
N2	2 ou 3 nódulos	a: micrometastase *† b: macrometastase † c: metástase(s) em trânsito(s)/satélite(s) sem nódulos metastáticos
N3	**4** ou mais nódulos metastáticos, ou nódulos confluentes, ou metástases em trânsito)/satélites com nódulos metastáticos	

Classificação M	Sítio	LDH Sérico
M0	Sem metástase à distância	NA
MIa	Pele à distância ou metástases nodais	Normal
M 1b	Metástases pulmonares	Normal
M 1c	Todas as outras metástases viscerais Qualquer metástase à distância	Normal Elevado

* † Micrometástases são diagnosticadas depois do linfonodo sentinela.
† Macrometástases são definidas como metástases nodais clinicamente detectáveis confirmadas por exame histopatológico.

NA: não aplicável.
Fonte: BALCH *et al.*, 2009 p.6200

Tabela 2 – Grupos de Estágio para Melanoma Cutâneo.

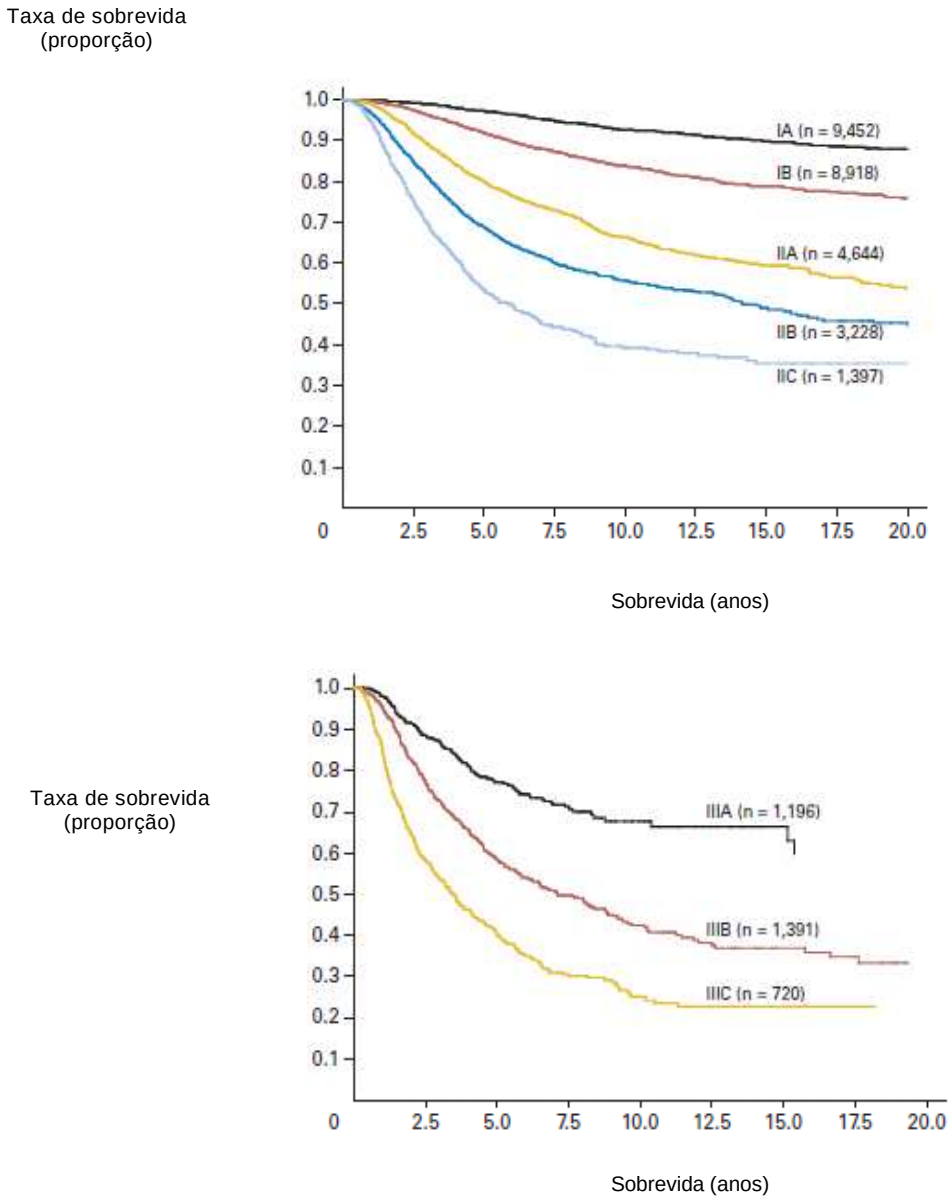
	Estagiamento Clínico[a]				Estagiamento Patológico[b]		
	T	N	M		T	N	M
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0		T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0		T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0		T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0
III	Qualquer T	N > N0	M0	IIIA	T1-4a	N1a	M0
					T1-4a	N2a	M0
				IIIB	T1-4b	N1a	M0
					T1-4b	N2a	M0
					T1-4a	N1b	M0
					T1-4a	N2b	M0
					T1-4a	N2c	M0
				IIIC	T1-4b	N1b	M0
					T1-4b	N2b	M0
					T1-4b	N2c	M0
					Qualquer T	N3	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1	IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

[a] Estagiamento clínico inclui microestagiamento do melanoma primário e avaliação clínica/radiológica para metástases. Por convenção, ela deve ser utilizada após excisão completa do melanoma primário com avaliação clínica para metástases regionais e à distância.

[b] Estagiamento patológico inclui microestagiamento do melanoma primário e informação patológica sobre os linfonodos regionais após linfadenectomia parcial (ex. linfonodo sentinela) ou completa. Pacientes com estagiamento patológico 0 ou Estágio IA são exceção; eles não necessitam de avaliação patológica dos linfonodos.

Fonte: BALCH, BUZAID *et al.*, 2009 p.6200

As taxas de sobrevida em 15 anos para pacientes nos diferentes estágios foram publicadas por Balch e colaboradores em 2009 (BALCH *et al.*, 2009), e estão representadas na Figura 5.



n: número de pacientes da base de dados da AJCC de pacientes com melanoma, utilizado para calcular as taxas de sobrevida.

Figura 5 - Curva de sobrevida do sistema de estagiamento de melanoma, comparando doença localizada (estágios I e II) e metástases regionais (estágio III).
Fonte: BALCH *et al.*, 2009 p.6201.

O estagiamento do MC publicado em 2001 (BALCH, *et al.*, 2000; BALCH, *et al.*, 2001) coloca a espessura de Breslow (espessura tumoral) como o mais importante parâmetro para a subclassificação do tumor primário. Outros parâmetros histopatológicos importantes são a presença de ulceração e, para tumores finos (menor que 1 milímetro de espessura), o nível de invasão de Clark. Os níveis de corte na espessura tumoral são definidos como 1, 2 e 4 milímetros. A presença de ulceração eleva o estagiamento em cada categoria de espessura tumoral. Isto também é válido para os melanomas cutâneos finos com níveis de Clark IV e V. A nova versão do estagiamento publicado por Balch e col. em 2009 (BALCH, *et al*., 2009) manteve esses parâmetros como os principais indicadores prognósticos no MC.

O critério primário para a classificação do T é a espessura tumoral (medida em mm) e a presença ou não de ulceração (determinada histopatologicamente). A espessura do melanoma tem sido o mais forte fator associado ao prognóstico do paciente em virtualmente todos os estudos que analisam, através de investigação de regressão por COX, o prognóstico em pacientes de melanoma com estágio I e II, (BALCH, *et al.*, 2003; BALCH, *et al*., 2009).

A ulceração tumoral é definida como a ausência de epiderme intacta sobre a maioria do melanoma primário ao exame microscópico. A freqüência da presença de ulceração aumenta com a espessura tumoral. Além disto, ela ainda se correlaciona com altas taxas mitóticas no melanoma primário (BALCH, *et al.*, 2003). A ulceração significa lesão avançada localmente e é um fator prognóstico dominante para os estágios I, II e III (BALCH, *et al*., 2009)

A contagem mitótica foi recentemente incluída como um parâmetro para o estagiamento do MC (BALCH, *et al*., 2009). A taxa mitótica é avaliada microscopicamente em mm^2, sendo utilizada para categorização do melanoma T1. Um MC com taxa mitótica ≥ 1/mm^2 é categorizado como estágio T1b.

A metástase microscópica é definida como metástase nodal não detectada por exame clínico, enquanto que a metástase macroscópica é aquela determinada no exame clínico e confirmada histopatologicamente (BALCH, *et al.*, 2003).

O nível de invasão do melanoma na pele, definido pelo Dr. Wallace Clark, era usado como um fator prognóstico *"gold standart"* na década de 1960. O nível I significa melanoma *in situ*, não infiltrando através da camada basal. Nível II significa tumor infiltrando a derme papilar; nível III passando a derme papilar, mas não acometendo a derme reticular. Nível IV significa tumor infiltrando a derme reticular e finalmente nível V, infiltrando o tecido subcutâneo (DE BRAUD, *et al.*, 2003).

Uma crítica consistente a esse método é que ele não leva em conta as diferentes espessuras de pele que existem nas diferentes partes do corpo. (Exemplo: pele do dorso e pele da face) (BALCH, *et al.*, 2000). Outro problema associado ao método de Clark é a falta de uniformidade entre patologistas na interpretação dos vários níveis, particularmente na distinção dos níveis II, III e IV (CLARK, *et al.*, 1989; MASSI, *et al.*, 1999). Os limites histológicos entre a derme papilar e derme reticular são freqüentemente de difícil visualização, especialmente na pele danificada pelo sol (VILMER, *et al.*, 1996; MASSI, *et al.*, 1999).

Tem sido demonstrado que ocorrem variações significativas na mensuração do melanoma cutâneo e que o nível de Clark é mais subjetivo que o índice de Breslow. (COLLOBY, WEST e FLETCHER, 1991). Quando há discrepâncias entre a medida da

espessura tumoral e o nível de invasão na pele, (exemplo: um melanoma fino com nível IV, ou um melanoma espesso com nível III), a espessura tumoral é mais fidedigna para se predizer o prognóstico do paciente (BALCH, *et al.*, 2000). O exame do grau de variação observacional do índice de Breslow e nível de Clark mostra uma variação intra e inter-observacional significativa, provavelmente devido à subjetividade da interpretação da célula mais profunda do tumor (COLLOBY, WEST e FLETCHER, 1991; VILMER, *et al.*, 1996). Além disto, o índice de Breslow é mais reprodutível que o índice de Clark, já que métodos morfométricos são dotados de grande objetividade (COLLOBY, WEST e FLETCHER, 1991; VILMER, *et al.*, 1996).

Nos melanomas considerados finos (<1,0mm), o nível de invasão era considerado um fator bastante preditivo da sobrevida no passado (BALCH, *et al.*, 2003). Porém, observou-se que a taxa mitótica e a ulceração são fatores mais pontentes para predizer a sobrevida que o nível de invasão. Assim, o Comitê de Estagiamento do Melanoma recomenda que a taxa mitótica substitua o nível de Clark como critério primário para definir estágio T1b no melanoma (BALCH, *et al*., 2009).

Metástases locorregionais compreendem metástases satélites, em trânsito e para linfonodos regionais. Metástases satélites são definidas como o desenvolvimento de nódulos metastáticos até 2 centímetros de distância do tumor primário. Metástases em trânsito desenvolvem-se na área da drenagem metastática (linfáticos da pele ou do tecido subcutâneo), antes da primeira cadeia linfonodal (LEITER, *et al.*, 2004).

As metástases macro e microscópicas para linfonodos são subclassificadas diferentemente. Além disto, o número de linfonodos comprometidos também influencia o estagiamento do tumor. Entretanto, o sistema de estagiamento é mais complicado ainda, pois leva em conta a presença ou não de ulceração do tumor primário. Isto torna

o sistema de estagiamento um pouco confuso. Nos estudos do Registro de Melanoma Alemão Central não houve confirmação de que a ulceração do tumor primário possui impacto no prognóstico no estagiamento de metástases locorregionais (EIGENTLER, *et al.*, 2004). O novo estagiamento do melanoma inclui a utilização de imunohistoquímica para a detecção de melanoma mestatático para linfonodo. A imunohistoquímica é aceita quando o diagnóstico de metástase é baseado na positividade para um dos marcadores (HMB45, Melan- A / MART 1) e quando a célula positiva tem características morfológicas malignas que podem ser observadas nos tecidos corados pela imunohistoquímica (BALCH, *et al*. 2009). Além disto, células tumorais isoladas ou depósitos tumorais <0.1mm, que possuem os critérios morfológicos e imunohistoquímicos para detecção do melanoma, devem ser classificados como N+ (BALCH, *et al*. 2009).

Três subgrupos de metástases à distância devem ser distinguidos: metástases para pele e partes moles, metástases pulmonares e metástases para outras vísceras. O primeiro subgrupo possui melhor prognóstico e o último, o pior prognóstico (GARBE e EIGENTLER, 2007; BALCH, *et al*., 2009). A presença de valores de LDH nos primeiros dois grupos eleva o estagiamento para o último subgrupo. Assim, pela primeira vez o valor de um exame laboratorial foi introduzido no sistema de estagiamento do melanoma (GARBE e EIGENTLER, 2007). As taxas de sobrevida em 10 anos para pacientes com metástases para diferentes locais foram publicadas por Balch e colaboradores em 2009 (BALCH *et al.*, 2009), e estão representadas na Figura 6.

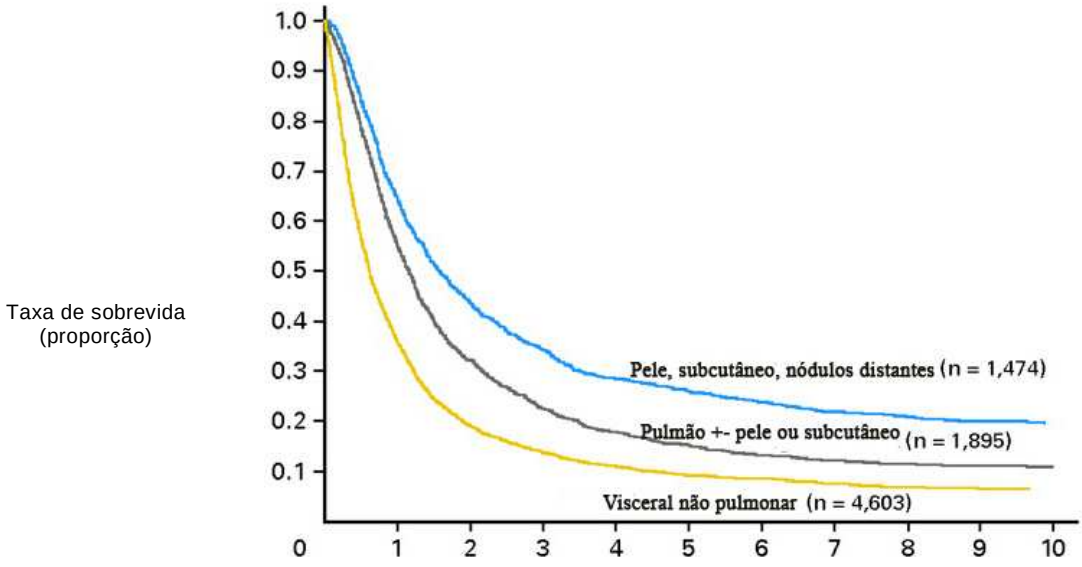


Figura 6 - Curva de sobrevida de 7635 pacientes com melanoma mestastático para sítios distantes (estágio IV) subagrupado por sítio da metástase à distância.
Fonte: BALCH *et al.*, 2009 p.6202.

Em pacientes com metástase à distância, o(s) sítio(s) da(s) metástase(s) e os níveis séricos elevados de desidrogenase lática (LDH) são usados para delinear a categoria M em três grupos (M1a, M1b e M1c), com a taxa de 1 ano de sobrevida variando de 40-60% (BALCH, *et al.*, 2001). Pacientes com metástase distante na pele, tecido subcutâneo ou para linfonodos à distância são categorizados como M1a quando o LDH está normal. Pacientes com metástase pulmonar e LDH normal são categorizados como M1b e têm um prognóstico intermediário em termos de 1 ano de sobrevida. Pacientes com metástase para qualquer outra víscera ou qualquer paciente com M1 e LDH anormal têm um prognóstico relativamente pior e são categorizados como M1c. Apesar disto, todos os pacientes com M1 possuem prognóstico reservado.

O nível sérico de LDH foi incluído na classificação, apesar de ser incomum em uma classificação de estagiamento levar-se em conta fatores séricos. Quando o nível

sérico de LDH está acima do limite considerado normal no tempo do estagiamento do paciente com metástase à distância, ele é categorizado como M1c independente do local das metástases à distância. As taxas de sobrevida em 10 anos para pacientes com metástases à distância, de acordo com a avaliação de LDH, foram publicadas por Balch e colaboradores em 2009 (BALCH *et al.*, 2009), e estão representadas na Figura 7.

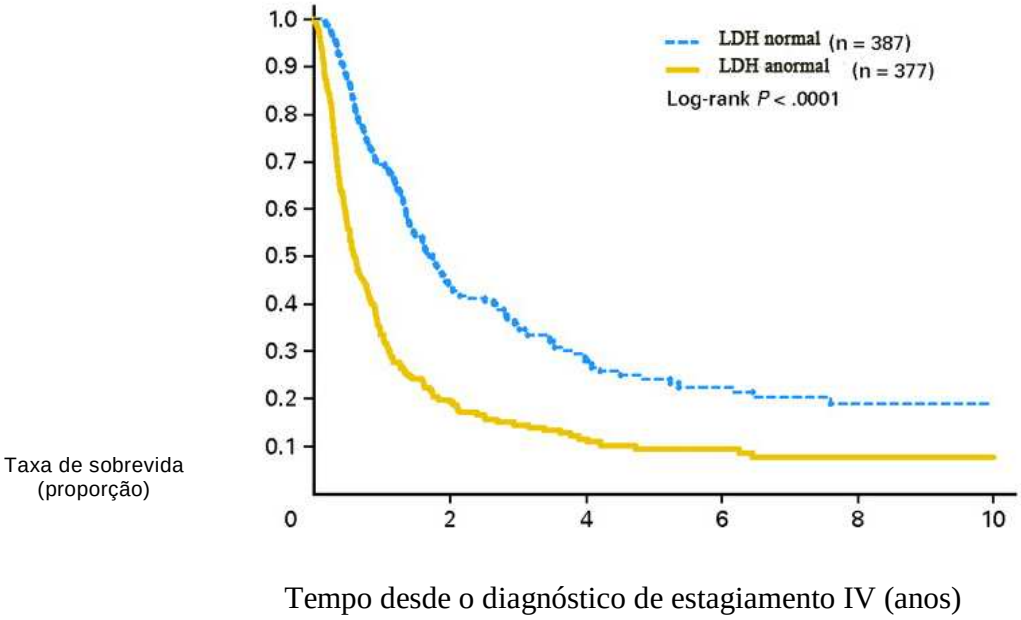


Figura 7 - Curva de sobrevida de pacientes com melanoma mestastático para sítios distantes (estágio IV) subagrupado por níveis séricos de LDH.
Fonte: BALCH *et al.*, 2009 p.6202.

Como as diferenças de sobrevida entre as categorias M são pequenas, não há subgrupos para o estágio IV do melanoma.

2.3.5 Fatores Prognósticos

2.3.5.1 Fatores Prognósticos Clínicos

O estágio clínico da doença ao diagnóstico é o fator prognóstico mais importante no MC (LEITER, *et al.*, 2004). A taxa de sobrevida em 10 anos é de 71% para pacientes nos estágios I e II (AJCC), e entre 20-30% para pacientes no estágio III (BALCH, 1992). Algumas variáveis têm sido identificadas como participantes na progressão e no comportamento biológico do MC. Foi demonstrado que o sexo masculino apresenta pior prognóstico comparado ao feminino, com sobrevida em 5 anos de 83,5% para homens e 90,5% para mulheres nos estágios I e II, e 32,7% para homens e 43,7% para mulheres nos estágios III e IV. Pacientes da raça branca possuem um melhor prognóstico comparado com pacientes da raça negra (CHANG, KARNELL e MENCK, 1998).

O melhor prognóstico visto nas mulheres pode ser explicado pelo fato de os tumores que expressam estradiol terem sido reportados como de melhor prognóstico. Sarti e colaboradores estudaram *in vitro* os efeitos do ß-estradiol e tamoxifen nas células de MC, e demonstraram que o ß-estradiol inibiu em 30% a proliferação celular (SARTI, VISCONTI e CASTRUCCI, 2004).

Outra característica clínica associada ao prognóstico é o sítio anatômico da lesão primária. As localizações apontadas como desfavoráveis são cabeça, dorso, tórax e braços. As regiões com melhor prognóstico são abdômen, membros inferiores e porção distal dos membros superiores (GARBE, *et al.*, 1995). Leiter e colaboradores levantaram a hipótese de que o comprimento da drenagem linfática poderia ser

responsável pela diferença no prognóstico entre pacientes com melanoma primário de diferentes localizações. O comprimento do trato linfático e o número de linfonodos a serem passados antes que o fluido linfático alcançasse a circulação sangüínea no ângulo venoso do tórax superior poderiam ser fatores decisivos para a defesa do sistema imune do hospedeiro contra as células metastatizantes do tumor (LEITER, *et al.*, 2004).

2.3.5.2 Fatores Prognósticos Histopatológicos

Para tumores nos estágios I e II, além do índice de Breslow, outros fatores têm forte associação com o prognóstico dos pacientes como a presença de ulceração, intensidade da infiltração linfocitária, tipo histológico, regressão tumoral, índice mitótico, microssatelitose, tipo celular predominante, marcadores imunohistoquímicos e índices morfométricos (GARRISON e NATHANSON, 1996).

Conforme citado anteriormente, a presença de ulceração é definida como a interrupção microscópica da superfície epitelial envolvida pelo tumor e tem sido descrita como o melhor indicativo da probabilidade de envolvimento linfonodal (AHMED, 1997). Estudos norte-americanos e australianos apontam para uma sobrevida de 50% em 10 anos na presença de ulceração contra 75% em pacientes sem lesão ulcerada (AHMED, 1997). Um melanoma não ulcerado T4a possui sobrevida de 71% em 5 anos. Já em um melanoma ulcerado T4b a sobrevida em 5 anos é de 53% (BALCH, *et al.* 2009). Apesar de estar fortemente associada com a espessura do tumor, a ulceração tem sido relatada como um forte fator prognóstico independente nos estudos de análise de multivariável (BYERS e BHAWAN, 1998).

A intensidade da resposta inflamatória que é a resposta imunocelular do hospedeiro contra o tumor também tem sido relatada como um fator prognóstico histopatológico independente (CLEMENTE, *et al.*, 1996).

O tipo histológico (LMM, MES, MN e MLA) parece ser um fator independente no prognóstico do melanoma. A sobrevida em 5 anos é de 91,6% no MES, 66,4% no MLA e 64,6% no MN (CHANG, KARNELL e MENCK, 1998).

A regressão tumoral ainda é um fator controverso entre os autores em relação ao seu valor prognóstico (FONTAINE, *et al.*, 2003). Histopatologicamente, a regressão evolui de um infiltrado linfocítico na fase inicial para uma fase de cicatricial tardia. Segundo Shaw e colaboradores, uma hipótese seria a de que a presença de melanoma metastático para um linfonodo poderia estimular uma resposta imune resultando em regressão da lesão primária (SHAW, MCCARTHY *et al.*, 1989). Alguns trabalhos confirmam o pior prognóstico do paciente quando existe a regressão (BLESSING e MCLAREN, 1992), enquanto outros não confirmam estes resultados (FONTAINE, *et al.*, 2003).

Valor prognóstico também tem sido atribuído à atividade mitótica. A sobrevida em tumores sem mitoses chega a 90%, em contraste com sobrevida menor que 40% para os pacientes com número maior que 6 mitoses/mm^2. O número de mitoses também está associado à espessura tumoral (CLARK, *et al.*, 1989). Em uma análise multifatorial de 10.233 pacientes com MC localizado, a atividade mitótica foi o segundo fator mais potente para predizer metástase, atrás apenas da espessura tumoral (BALCH, *et al*., 2009).

No MC, agregados de células tumorais na derme, tecido subcutâneo ou parede de vasos não contíguos e nitidamente separados da massa tumoral são denominados de

microssatelitose (GERSHENWALD, BUZAID e ROSS, 1998). Os pacientes no estágio I e II com microssatelitose adquirem prognóstico semelhante ao estágio III (GERSHENWALD, BUZAID e ROSS, 1998).

O predomínio de células fusiformes foi relatado como indicador de melhor prognóstico (HEENAN, *et al.*, 1991). Porém este resultado não foi confirmado por outros autores, provavelmente devido ao pleomorfismo encontrado em grande parte dos casos (CLARK, *et al.*, 1989; AHMED, 1997).

Os marcadores imunohistoquímicos são anticorpos direcionados contra antígenos celulares presentes na membrana citoplasmática, nas organelas, na membrana nuclear ou em seu conteúdo. Anticorpos para antígenos expressados durante fases de proliferação celular como Antígeno Nuclear da Célula em Proliferação (PCNA) e MIB-1, cujo alvo é o antígeno Ki-67, também expressado durante a mitose, têm apresentado resultados conflitantes (REDDY, *et al.*, 1995; BYERS e BHAWAN, 1998). O valor da proteína p53 tem sido relatado. A proteína p53 exerce importante papel no controle da proliferação celular, tendo sua expressão aumentada durante a fase “S” da mitose. Apesar de o aumento da expressão da proteína p53 mutante estar associado ao tamanho nuclear nos melanomas, sua correlação com o prognóstico destes tumores ainda não foi bem estabelecida (HIEKEN, *et al.*, 1999).

Na busca de novos e mais fidedignos indicadores de prognóstico para o melanoma, o estudo da morfometria nucleolar demonstrou grande correlação com o prognóstico nos melanomas cutâneos (BURNIER PEREIRA, *et al.*, 2001).

2.3.6 Metástases

A presença de metástase é um sinal de mau prognóstico para o paciente, e a sobrevida após o diagnóstico da metástase é usualmente limitada. A taxa de sobrevida em 5 anos após metástase para linfonodos é, em geral, de 20-50% (BALCH, 1992), e a taxa em 2 anos após metástases viscerais à distância é de apenas 1-2% (DE BRAUD, *et al.*, 2003). Pacientes com metástases cerebrais e/ou hepáticas raramente sobrevivem mais que 6-8 meses após o diagnóstico (DE BRAUD, *et al.*, 2003).

A metástase do MC pode ocorrer de três maneiras: 1) metástases satélites ou em trânsito, 2) metástase para linfonodos regionais ou 3) metástases à distância diretamente (Figura 8) (LEITER, *et al.*, 2004).

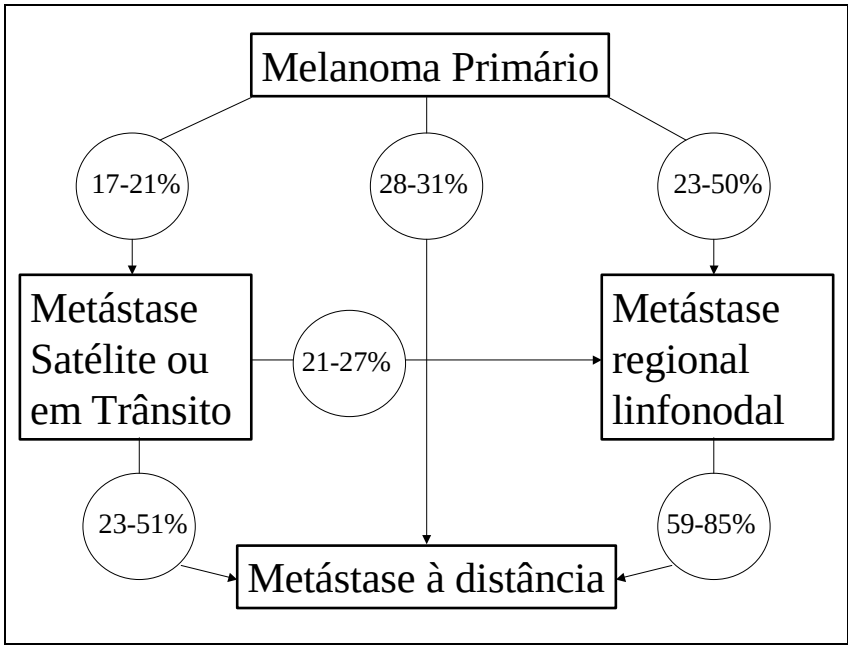


Figura 8 - Esquema representando as diversas possíveis vias de metástases do MC e suas respectivas porcentagens de ocorrência.
Fonte: Leiter, Meier et al., 2004.

O período de ocorrência das metástases após o diagnóstico do tumor primário difere nos 3 tipos de metástase, pois a metástase à distância direta ocorre em um período maior (após 24-25 meses) comparado à metástase direta para linfonodos regionais (após 16-19 meses) e metástases em trânsito ou satélites (após 17 meses) (MEIER, *et al.*, 2002).

Portanto, o período de dormência das células tumorais metastáticas parece ser diferente para as metástases à distância e as metástases loco-regionais, antes da detecção de crescimento tumoral. Até hoje, ainda não há uma explicação razoável para o fenômeno da dormência das células tumorais e para esta diferença no período entre as metástases à distância e as loco-regionais (LEITER, *et al.*, 2004).

Metástases satélites, em trânsito e para linfonodos regionais, podem ser resultantes do semeamento das células tumorais através de vasos linfáticos, enquanto que metástases à distância podem ocorrer simultaneamente por semeamento através de vasos hematogênicos. Esta hipótese é suportada por achados recentes indicando uma regulação coordenada entre linfangiogênese e angiogênese de vasos sangüíneos na progressão do MC (SKOBE, *et al.*, 2001).

Uma outra hipótese é a de que as metástases à distância inicialmente viajam através dos linfonodos, mas apenas uma pequena proporção delas vai desenvolver-se em metástases à distância clinicamente aparentes (Figura 9) (LEITER, *et al.*, 2004).

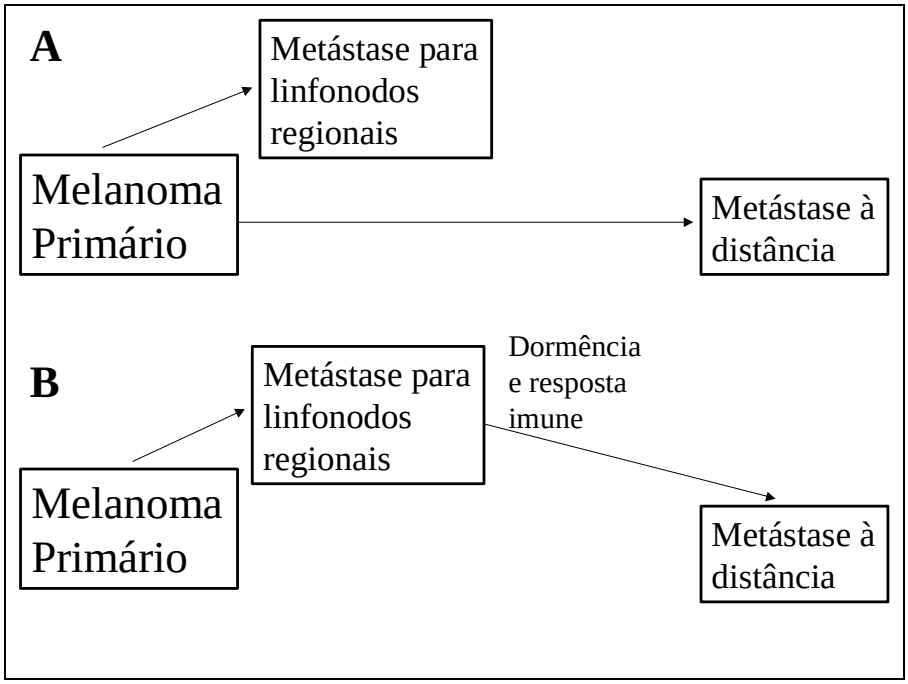


Figura 9 - Esquema mostrando as hipóteses da relação entre o tumor primário e as metástases para linfonodos regionais e à distância.
Fonte: Leiter, Meier et al., 2004.

As metástases à distância de MC podem afetar virtualmente qualquer órgão ou tecido. Os locais mais afetados são: pele (13-38%), linfonodos à distância (5-34%), tecido subcutâneo à distância (32%), pulmão (18-36%), fígado (14-20%), sistema nervoso central (2-20%), ossos (4-17%), trato gastrointestinal (1-8%), pleura (3%) e adrenais (1-11%) (LEITER, *et al.*, 2004).

Araújo e colaboradores estudaram 13 casos de metástases cerebrais de MC em Campinas. O intervalo de tempo entre o diagnóstico do tumor primário e o desenvolvimento das metástases foi de 6 a 60 meses, e a sobrevida média dos pacientes após a cirurgia foi de 14 meses (variando de 2 a 55 meses). (ARAUJO, *et al.*, 1997).

Uma importante questão é quando um exame de estagiamento deve ser rotina no monitoramento e seguimento dos pacientes com MC. O monitoramento do MC é considerado por alguns autores como controverso já que, segundo eles, a maioria dos pacientes com MC detecta a sua própria recorrência (WEISS, *et al.*, 1995; DICKER, *et al.*, 1999). Alguns destes trabalhos derivam de estudos retrospectivos pequenos onde não houve um grande esforço para o monitoramento do MC (GARBE e EIGENTLER, 2007). Logicamente, se não há um sistema para monitoramento do MC, os pacientes irão detectar as metástases por eles mesmos mais cedo ou mais tarde.

Garbe e colaboradores (GARBE, *et al.*, 2003) realizaram um estudo prospectivo de seguimento do MC empregando uma escala amplamente utilizada na Alemanha. Exames de seguimento eram escalados a cada 3 meses durante os primeiros 5 anos e a cada 6 meses do quinto ao décimo ano. O exame físico era acompanhado de exames de sangue e, uma vez ao ano, exames de imagem eram planejados. Dois mil pacientes nos estádios I a III entraram no estudo. Os mais importantes resultados indicaram que 83% de todas as recorrências foram detectadas durante estes exames de seguimento e, em apenas 17% dos casos, o paciente se queixava de algo que poderia ser uma recorrência do tumor. Aproximadamente 50% de todas as recorrências foram detectadas em uma fase tão precoce que a remoção cirúrgica completa foi possível. A detecção de recorrência em uma fase precoce foi associada com sobrevida prolongada significativa (GARBE, *et al.*, 2003). Isto indica que a detecção precoce das recorrências e conseqüente remoção cirúrgica é muito importante na vigilância do MC. Escalas de seguimento deveriam ser otimizadas para melhora a detecção precoce de recorrências. A análise deste estudo prospectivo também demonstrou que esta escala pode ser reduzida em sua intensidade. Pacientes com tumores com espessura < 1 milímetro

parecem não precisar exames técnicos e o exame físico pode ser realizado a cada 6 meses. Em pacientes com MC com espessura > 1 milímetro, deve-se realizar ultrassom do linfonodo e marcador sorológico para proteína S100. Para pacientes com estagio III, uma escala mais intensa é recomendada (Tabela 3).

Tabela 3 – Recomendações para seguimento dos pacientes com MC:

Estágio[a]	Exame físico 1-5 anos	Exame físico 6-10 anos	Linfonodo do ultrassom 1-10 anos	Exames de imagem[b] 1-10 anos	Exames de sangue[c] 1-10 anos
I: <1 mm em espessura	6	12	Nenhum	Nenhum	Nenhum
I+II: >1 mm em espessura	3	6	6	Nenhum	6
III	3	6	3-6	6	3-6
IV	Individual				

[a]: estagiamento I e II inclui tumores primários, estágio III compreende metástases em trânsito ou para nódulos regionais.
[b]: ultrassom abdominal e RX de tórax, ou tomografias.
[c]: Lactato desidrogenase (LDH), fosfatase alcalina e proteína S-100.
Obs: O intervalo dos exames de seguimento estão em meses.
Fonte: GARBE, *et al.*, 2003

É obrigatório um exame clínico completo com especial atenção à palpação das cadeias linfonodais suspeitas. Exames laboratoriais como hemograma, transaminases, fosfatase alcalina são inespecíficos, porém dosagem de LDH possui indicação por estar relacionada com o prognóstico. Além disso, recomenda-se radiografia de tórax [Tomografia Computadorizada (TC) de preferência] em todos os pacientes; Ressonância Magnética (RNM) de crânio e ultrassom (US) e TC abdominal nos pacientes com linfonodos histopatologicamente acometidos, de acordo com o protocolo da instituição (MACHADO, et al., 2004).

A freqüência das avaliações clínicas e acompanhamento para pacientes com estádio II e III ainda não estão bem estabelecidos, porém, segundo o protocolo da

Universidade Federal de Minas Gerais (MACHADO, et al., 2004), é sugerido o seguinte cronograma:

- 1º ano: 2/2 meses.
- 2º ano: 3/3 meses.
- 4º e 5º anos: 6/6 meses.
- 5º ao 10º ano: anual
- A partir do 10º ano: alta

Se a espessura do tumor for menor que 1 mm não precisa ser acompanhado por mais de 12 a 24 meses. E pacientes com lesões < 0,6mm não necessitam de acompanhamento. Todos os pacientes com MC e parentes de primeiro grau devem ser acompanhados por dermatologistas com dermatoscopias periódicas.

2.4 *Melanoma Inhibitory Activity* (MIA)

O crescimento e expansão das células tumorais, incluindo o melanoma, são modulados por uma rede complexa de fatores de crescimento que regula a proliferação e a interação célula-matriz através de uma variedade de diversas vias de transdução de sinais. Blesch *et al.* (BLESCH, *et al.*, 1994) purificaram uma proteína que eles denominaram MIA (do inglês *Melanoma Inhibitory Activity*), que é secretada por células do melanoma e que permite a inibição do crescimento das células do melanoma *in vitro*. Bosserhoff *et al*. (BOSSERHOFF, HEIN *et al.*, 1996) clonaram o gen responsável pela formação do MIA e descreveram a sua organização genômica. O gen compreende 4 éxons e codifica o aminoácido-131 preprolipeptídeo com uma seqüência peptídea de

secreção resídual-24. Os autores identificaram o sítio do gen que inicia a transcrição e estudaram as características de expressão do gen promotor em células de melanoma humano, células epiteliais e células indiferenciadas. Eles demonstraram através de análise por *Northern blot* que o gen MIA estava expresso em todas as linhagens de melanoma testadas e não era expresso em fibroblastos ou linhagens de células epiteliais (BOSSERHOFF, *et al.*, 1996).

Em tecidos não neoplásicos, o MIA é fortemente expresso em condrócitos. Isto explica a alta expressão de MIA em mulheres grávidas devido ao crescimento da cartilagem do feto, assim como em crianças e adolescentes até os 17 anos de idade (BOSSERHOFF, KUSTER e HEIN, 2004).

Em neoplasias, a expressão de MIA foi detectadas em MC, em condrossarcomas e em menor freqüência em diversos tipos de adenocarcinomas incluindo de mama e cólon (BOSSERHOFF e BUETTNER, 2002).

Koehler e col (KOEHLER, *et al.*, 1996), através da hibridização *in situ* por fluorescência, mapearam o gen MIA no cromossomo 19q13.32-q13.33.

Vários estudos de diferentes laboratórios avaliaram o MIA como um marcador altamente sensível e específico, clinicamente útil para seguimento e monitoramento de terapia em pacientes com melanoma (BOSSERHOFF e BUETTNER, 2002; MATSUSHITA, *et al.*, 2002). Diferentemente de outros marcadores tumorais, a elevação repetida dos níveis séricos de MIA pode predizer a presença de metástases clinicamente não detectáveis (ocultas) em pacientes que já operaram de melanoma (MATSUSHITA, *et al.*, 2002).

Em outro estudo, Bosserhoff e col. (BOSSERHOFF, *et al.*, 1997) estabeleceram como resultado positivo nível de MIA acima do nível de 97 percentil (6,5ng/ml)

determinado através de 72 controles normais. Os níveis de MIA em pacientes com melanoma metastático foram significantemente acima do nível de 97 percentil (6,5 ng/ml) (BOSSERHOFF, *et al.*, 1997) .

Em um ensaio clínico cego e multicêntrico, Bosserhoff e col. (BOSSERHOFF, *et al.*, 2000) analisaram os níveis séricos de MIA por ELISA em 259 pacientes com metástase de melanoma, em estágios III e IV. Os níveis de MIA foram elevados em ambos os grupos e diminuíram significantemente após a cirurgia. Os níveis de MIA aumentaram subseqüentemente em 29 dos 34 pacientes que tiveram rápida progressão da doença e diminuíram em 5 pacientes que responderam à imunoquimioterapia (BOSSERHOFF, *et al.*, 2000).

Vucetic e col. compararam os níveis séricos de MIA em 2 grupos de pacientes com MC, pacientes com e sem doença metastática para linfonodo sentinela. Compararam ainda estes níveis séricos com 2 grupos controles, pacientes com nevos displásicos e pacientes com carcinoma basocelular. Os níveis de MIA em pacientes com metástase para linfonodo sentinela foram significantemente maior que dos pacientes sem metástase e dos 2 grupos controles. Os autores concluíram que a medição dos níveis séricos de MIA é um teste ideal para rastreamento de metástase em linfonodo sentinela (VUCETIC, *et al.*, 2008).

Hoffman e col. avaliaram os níveis séricos de MIA em 1079 pacientes consecutivos com melanoma em estágios I e II. Destes, 137 tiveram metástase e a sensibilidade do MIA foi de 67.6% em pacientes em estágio I e 65,6% em pacientes em estágio II. A especificidade foi de 76,9% e 66,7% para pacientes em estágio I e II, respectivamente. (HOFMANN, *et al.*, 2009).

As principais aplicações de marcadores tumorais são o monitoramento de resposta à terapia e detecção precoce de doença recorrente no seguimento dos pacientes. Níveis sangüíneos de várias substâncias, incluindo a proteína S-100 e MIA, têm demonstrado estarem aumentados em estágios avançados de MC. Entretanto, atualmente, muitas destas substâncias não têm papel na prática clínica de rotina, enquanto que marcadores convencionais como LDH e proteína C-reativa ainda são importantes pela sua disponibilidade e sensitividade, especialmente após o desenvolvimento de metástases (MATSUSHITA, *et al.*, 2002).

Tas e col. (TAS, *et al.*, 2004) compararam os níveis séricos de MIA e S-100 em 48 pacientes com MC em diferentes estágios de doença. A sensibilidade do MIA foi maior em pacientes com extensa doença metastática e em pacientes não responsivos à quimioterapia. Estes autores concluíram que o MIA foi mais sensível e possui maior potencial como marcador prognóstico que o S-100.

Bosserhoff e col. também compararam MIA e S-100 como marcadores tumorais para MC. Os autores demonstraram que o MIA possui especificidade comparada ao S-100 como marcador sérico para melanoma sistemicamente avançado. Entretanto, um aumento no nível sério de MIA representa um parâmetro significativamente mais sensível quando comparado com os valores de S-100 em todos os estágios do melanoma (BOSSERHOFF, *et al.*, 1997).

Faries e col. compararam 3 marcadores séricos em pacientes com melanoma estádio III: MIA, TA901C e S100β. Os soros de 75 pacientes foram colhidos antes do início da imunoterapia e em outros 6, tempos após o início da terapia. Uma análise multivariada regressiva dos resultados revelou que o MIA foi fator independente que previu sobrevida quando os valores aumentavam em 4-6 meses após início da terapia,

enquanto que o TA901C foi fator que previu sobrevida quando este aumento se dava entre 2 semanas e 3 meses. Na coorte de pior prognóstico, os valores de MIA e S100β aumentaram progressivamente. Os autores concluíram que MIA e TA901C foram complementares, e que a elevação dos níveis destes marcadores aumentou em pacientes que desenvolveram metástase (FARIES, *et al.*, 2007).

Já Garbe e col. compararam MIA, S100β, LDH, fosfatase alcalina e tirosinase/MART-1 em 296 pacientes com estágio clínico II e III sem metástases clínicas. Durante o experimento, 46 pacientes desenvolveram metástase. A sensibilidade para detecção de novas metástases foram 29% para S100β, 22% para MIA, 2% para LDH e 17% para fosfatase alcalina. A acurácia diagnóstica foi melhor no MIA (86%) e S100β (84%), enquanto que na fosfatase alcalina foi de 79% e no LDH 77%. Os autores concluíram que os níveis de S100β e MIA demonstraram uma maior sensibilidade, especificidade e acurácia no diagnóstico de novas metástases comparado com os outros marcadores tumorais (GARBE, *et al.*, 2003).

Baseados em alguns estudos prévios, os níveis séricos de MIA possuem aplicações clínicas como estadiamento de lesões primárias de melanoma, detecção da progressão de doença localizada para doença metastática e monitoramento de terapia em casos avançados.

Evidências obtidas através de experimentos *in vitro* e *in vivo* indicaram que o MIA possui um papel funcional importante nos mecanismos de metástase e invasão do melanoma (BOSSERHOFF e BUETTNER, 2002). Recentemente, tem sido sugerido que a expressão de MIA promove a progressão do melanoma através da indução de outros gens melanoma-associados (POSER, *et al.*, 2004). Outros dados, também recentes, descrevem a interação direta da proteína MIA com receptores de adesão

celular integrina α4β1 e integrina α5β1 e moléculas de matriz extracelular. Por modular a atividade das moléculas de integrinas, a proteína MIA medeia o “desprendimento” das células do melanoma das estruturas ao seu redor, resultando em aumento no potencial de invasão e migração das células do melanoma (SCHMIDT e BOSSERHOFF, 2009).

Em continuidade à sua pesquisa, Schmidt e Bosserhoff mostraram que após a ligação da proteína MIA com a integrina α5β1, ela é internalizada na célula junto com um receptor de adesão celular. Este mecanismo permite à célula tumoral a migração em uma direção definida, propiciando a metástase. O tratamento de células de melanoma com inibidores de *pkc* inibe fortemente a internalização da proteína MIA, o que poderia ser uma estratégia de tratamento do melanoma, para diminuir a formação de metástases (SCHMIDT e BOSSERHOFF, 2009). Além disto, foi demonstrada também a interação de MIA e caderina 7, uma molécula de adesão celular clássica, que está muito menos expressa em células de melanoma metastática que nas primárias, o que infere a interferência destas duas proteínas no mecanismo de migração das células do melanoma. (WINKLMEIER *et al.*, 2009).

Como foi exposto anteriormente, a proteína MIA é expressa em outros tipos de tumores. Assim, Sasahira e col. (SASAHIRA, *et al.*, 2008) estudaram a expressão de MIA em 62 carcinomas epidermóides da cavidade oral. Eles concluíram que a expressão de MIA está significantemente associada à presença de metástase para linfonodos. Alguns genes relacionados ao MIA foram estudados em carcinoma hepatocelular e, preliminarmente, parecem estar relacionados com o potencial metastático desta neoplasia (HELLERBRAND, *et al.*, 2008).

Diante do exposto, desenvolvemos um estudo clínico com o objetivo de determinar se os níveis séricos de MIA são aplicáveis na prática clínica do seguimento dos pacientes com MC.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o teste sangüíneo ELISA-MIA em pacientes com MC do Estado do Mato Grosso do Sul.

3.2 ESPECÍFICOS

Comparar os níveis séricos de MIA entre pacientes com e sem metástase e/ou recidiva de MC.

Comparar os níveis séricos de MIA entre pacientes com MC e com pessoas sem MC.

Avaliar a viabilidade de execução do teste MIA em pacientes com MC no Estado do Mato Grosso do Sul.

4 METODOLOGIA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa / CEP / Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob o protocolo N^0 1038 (Anexo). Trata-se de um estudo observacional transversal.

4.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES E DO GRUPO CONTROLE

Todos os pacientes diagnosticados de MC pelo exame histopatológico no LAC – Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia, entre o período de abril de 2008 e outubro de 2009, foram convidados a participar do projeto de pesquisa. Pacientes com o diagnóstico de MC provenientes do Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário da UFMS, que possuíam acompanhamento regular, também foram selecionados. Critérios de inclusão: estar em acompanhamento com seu médico (clínico ou cirurgião) na cidade de Campo Grande – MS.

Todos os pacientes foram averiguados pelos seus respectivos médicos para a presença ou não de doença metastática, de acordo com o protocolo de seguimento de melanoma que inclui: exame físico completo e exames de imagens ou laboratoriais quando pertinentes (MACHADO et al. 2004).

Quinze médicos (dermatologistas, oncologistas clínicos e cirúrgicos e cirurgiões gerais) da cidade de Campo Grande – MS foram contatados e esclarecidos sobre a pesquisa. Seus pacientes com MC metastático em acompanhamento e/ou tratamento foram convidados a participar do estudo.

O grupo controle consistiu de voluntários sadios sem diagnóstico de MC, funcionários do LAC – Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia.

Após contato por telefone com os pacientes que aceitavam participar da pesquisa, foi agendado um dia e horário para comparecimento ao LAC – Laboratório de Anatomia Patológica, onde era apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e solicitada a assinatura do mesmo pelo voluntário. Para os pacientes impossibilitados de locomoção, a apresentação do TCLE foi realizada em local de melhor conveniência ao voluntário, bem como a coleta de sangue.

Os pacientes foram rotulados com números cardinais consecutivos de acordo com a coleta.

Todas as lâminas histopatológicas onde o diagnóstico de MC foi feito foram revisadas por um patologista (pesquisador principal) para confirmação diagnóstica.

4.2 ACOMPANHAMENTO DOS PACIENTES

O acompanhamento dos pacientes foi realizado de acordo com o estadiamento dos mesmos com, pelo menos, 3 visitas ao ano, com exceção dos pacientes em estágio I com melanomas menores que 1 mm de espessura, seguindo o protocolo previamente estabelecido na literatura (Tabela 4):

Tabela 4 – Recomendações para seguimento dos pacientes com MC:

Estágio[a]	Exame físico	Linfonodo do ultrassom	Exames de imagem[b]	Exames de sangue[c]
I: <1 mm em espessura	6	Nenhum	Nenhum	Nenhum
I+II: >1 mm em espessura	3	6	Nenhum	6
III	3	3-6	6	3-6
IV	Individual			

Obs: O intervalo dos exames de seguimento está em meses.
[a]: estagiamento I e II inclui tumores primários, estágio III compreende metástases em trânsito ou para nódulos regionais.
[b]: ultrassom abdominal e RX de tórax, ou tomografias.
[c]: Lactato desidrogenase (LDH), fosfatase alcalina e proteína S-100.
Fonte: GARBE, *et al.*, 2003

4.3 COLETA DE SANGUE

As amostras de sangue foram obtidas por venopunção de 10 ml de sangue em um tubo estéril contendo heparina-lítio (BD, Brasil), em temperatura ambiente, por um profissional habilitado para tal procedimento. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 90,000 ver/min (Omega, Labor line, Brasil). O soro foi removido e injetado em outro tubo estéril (*ependorf*, BD, Brasil), previamente rotulado com o número do respectivo paciente. A quantidade de plasma coletado variou de coleta para coleta, porém não foi menor que dois tubos e não foi maior que quatro tubos de *ependorf*. As amostras de soro foram armazenadas em um freezer a menos 20ºC no Departamento de Farmácia do Hospital Universitário da UFMS para serem analisadas em grupos.

Foi realizada somente uma coleta de cada paciente.

4.4 MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE MIA

A mensuração dos níveis séricos de MIA foi feita por meio do kit de ensaio disponível comercialmente (Roche, MIA-ELISA). Os níveis de MIA séricos foram determinados por ensaios de ELISA (Boehringer, Mannheim, Alemanha). O responsável pela análise laboratorial não tinha informações clínicas do paciente.

A realização da reação foi feita no Laboratório do Departamento de Farmácia e Bioquímica – Laboratório de Imunologia da UFMS.

4.4.1 Teste de ELISA do MIA

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi utilizado para quantificar o nível sérico de MIA (MIA-Elisa, Roche, Mannheim, Alemanha). O ensaio ELISA foi realizado conforme descrito no manual do fabricante. Brevemente, foram utilizados 2 anticorpos monoclonais, direcionados contra o terminal NH2 (clone 2F7) conjugado a *horseradish* peroxidase e contra a região terminal COOH (clone 1A12) conjugado à biotina, respectivamente. Dez microlitros do soro ou do padrão (Roche, incluído no ELISA-MIA, MIA purificado recombinante derivado de células ovarianas de hamster chinês transfectado) foram incubados com 200 µl do reagente, contendo os 2 anticorpos, em uma placa de 96 aros, revestida por estreptavidina, por 45 minutos, com movimentação. Após 3 lavagens com tampão de lavagem (Roche, parte do kit ELISA-MIA, 200 µl de 2.2 azino-de-(3-etilbenzo-tiazolsulfonato), Roche) foram incubados nos aros por 30 minutos e medidos colorimetricamente a 504 nm. Utilizando-se de concentrações

padrões indicadas, foram medidos os sinais lineares a concentrações de MIA entre 0,1 ng/ml e 50 ng/ml. A reprodutibilidade deste ELISA foi demonstrada previamente (BOSSERHOFF, *et al.*, 1997).

Figura 10 – Kit MIA ELISA em sua embalagem original.

Cada kit MIA-Elisa custou R$2800,00 (comprados diretamente da empresa Roche) e em condições ideais realiza, aproximadamente, 90 testes.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise estatística com teste *Student-Newman-Keuls* entre os dados obtidos nos pacientes com metástase, sem metástase e pacientes saudáveis.

Os dados foram coletados e analisados com ajuda de computador e programas Microsoft Excel e SPSS 11.0 para Windows.

4.6 ORÇAMENTO FINANCEIRO

A Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul (FUNDECT), através do edital Chamada MS/CNPq/Fundect 04/2007 – SAÚDE, financiou a compra de todos os Kits MIA-Elisa, MIA-Elisa, Roche, Mannheim, Alemanha.

5 RESULTADOS

Todos os pacientes com MC que foram contatados aceitaram participar da pesquisa. Porém, dois pacientes que foram diagnosticados de MC no Laboratório LAC não puderam ser contatados.

Todos os pacientes, com metástase ou não, se dirigiram ao Laboratório LAC para a coleta de sangue, não havendo nenhum problema relacionado à coleta.

Ao total, houve 15 pacientes com MC sem metástase (grupo 1) e 10 pacientes com MC com metástase (grupo 2). Foram ainda coletadas amostras sangüíneas de cinco pessoas sadias (grupo controle).

Todos os pacientes do grupo 2 possuíam metástase comprovada por exames clíncos e/ou radiológicos, sendo que apenas 4 dos 10 pacientes estavam em tratamento quimioterápico no momento da coleta. Nenhum paciente do grupo 1 estava em tratamento quimioterápico. Cinco pacientes com metástases tiveram ressecção cirúrgica da metástase, porém possuíam algum foco de metástase comprovada no momento da coleta de sangue.

Os dados clínicos de todos os pacientes e do grupo controle, bem como os níveis séricos do MIA estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5 – Dados clínicos e níveis séricos de MIA nos pacientes e no grupo controle:

Número do paciente	Idade	Sexo	Presença de metástase	Em regime de quimioterapia	Nível sérico de MIA (ng/ml)
1	41	M	S	S	12
2	47	M	N	-	11,1
3	52	M	S	N	>30
4	55	M	S	N	>30
5	60	M	S	N	>30
6	39	M	S	S	17,6
7	52	M	N	-	8,4
8	28	F	N	-	8,7
9	48	M	S	N	18,8
10	80	F	N	-	7,1
11	65	F	N	-	6,4
12	69	F	N	-	7,9
13	55	M	N	-	5,4
14	60	M	N	-	6,1
15	46	M	N	-	8,6
16	65	F	N	-	6,2
17	55	M	S	N	>30
18	64	F	N	-	8,1
19	67	F	N	-	3,9
20	57	M	S	S	5,8
21	59	F	S	S	7,9
22	70	M	N	-	6,4
23	61	F	S		>30
24	76	M	N	-	4,3
25	68	F	N	-	3,5
Controles					
A	66	M			4,0
B	32	M			5,1
C	31	F			6,4
D	48	F			4,1
E	24	F			8,6

Sublinhado: grupo 2 (com metástase).
Não sublinhado: grupo 1 (sem metástase).
Controle: voluntários sadios sem MC.

O grupo 1 foi composto de oito pessoas do sexo feminino e sete do sexo masculino. O grupo 2 foi composto por duas pessoas do sexo feminino e oito do sexo masculino. O grupo controle foi composto por três pessoas do sexo feminino e duas do sexo masculino. A média de idade do grupo 1 foi de 60,3 anos, variando de 28 a 80 anos. A média de idade do grupo 2 foi de 60,8 anos, variando de 39 a 59 anos. Estes dados estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6 – Descrição dos dados clínicos de todos os participantes, quanto ao sexo e idade.

Grupos	Sexo Fem	Sexo Masc	Idade mínima-máxima (média)
Grupo 1 (n=15)	8	7	28-80 (60,8)
Grupo 2 (n=10)	2	8	39-59 (52,7)
Grupo controle (n=5)	3	2	24-66 (40,2)

Todos os pacientes com MC eram da raça branca. No grupo controle, os voluntários letras A e B eram da raça amarela, C e D da raça branca e E da raça negra (Vide Tabela 8).

Os níveis séricos de MIA do grupo 1 variaram de 3,5 ng/ml a 11,1 ng/ml, com média de 6,78 ng/ml; do grupo 2 variaram de 5,8 ng/ml a 30,0 ng/ml com média de 21,21 ng/ml. Os níveis séricos do grupo controle variaram de 4,0 ng/ml a 8,6 ng/ml, com média de 5,64 ng/ml. Estes dados estão resumidos na Tabela 7.

Tabela 7 – Estatística descritiva dos valores séricos de MIA (ng/ml) para os grupos.

Grupos	Mediana	Média ± desvio padrão	Mínimo	Máximo
Grupo 1	6,4	6,8 ± 2,1	3,5	11,1
Grupo 2	24,4	21,2 ± 10,0	5,8	30,0
Grupo controle	5,1	5,6 ± 1,9	4,0	8,6

Comparando os valores séricos de MIA entre os grupos sem e com metástase (grupos 1 e 2), pelo teste de Student-Newman-Keuls, houve uma diferença estatística significativa (p=0.002).

Comparando os valores séricos de MIA entre os grupos com metástase e o grupo controle (grupos 2 e controle), pelo teste de *Student-Newman-Keuls*, houve uma diferença estatística significativa (p=0.002).

Comparando os valores séricos de MIA entre os grupos sem metástase e o grupo controle (grupos 1 e controle), pelo teste de *Student-Newman-Keuls*, não houve uma diferença estatística significativa (p=0.443).

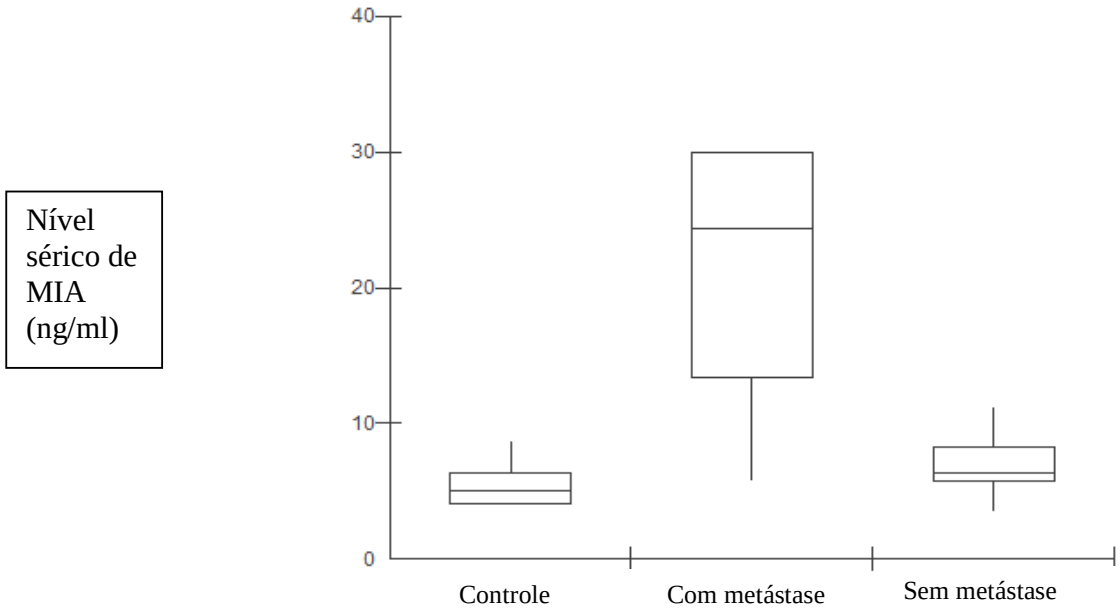


Figura 11 – Mediana e *quartis* dos valores de MIA, segundo os grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo sem metástase (*p*=0,443). Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo com metástase (*p*=0,002) e o grupo sem metástase e o grupo com metástase (*p*=0,002).

No grupo controle, houve diferenças entre os níveis séricos de MIA entre as raças (Tabela 8), sendo que o voluntário da Raça Negra (letra E) teve maiores níveis séricos de MIA que os demais.

Tabela 8 – Descrição dos dados do grupo controle quanto ao nível de MIA e raça:

Controle	Nível sérico de MIA (ng/ml)	Raça
A	4,0	Amarela
B	5,1	Amarela
C	6,4	Branca
D	4,1	Branca
E	8,6	Negra

Cada amostra foi realizada em triplicata, e no total, somando-se os testes preliminares, foram utilizados 3 kits MIA-Elisa.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, encontramos diferenças significativas entre os níveis séricos de MIA entre pacientes com e sem metástase, porém não houve diferença entre pacientes sem metástase e os voluntários sem MC (grupo controle). Por contato prévio com um dos principais pesquisadores sobre o assunto, Dra Bosserhoff, sabemos que os níveis séricos de MIA estão sendo utilizados de forma rotineira em pacientes com MC em hospitais da Alemanha e Estados Unidos, entre outros países. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo brasileiro sobre os níveis séricos de MIA em pacientes com MC.

A principal aplicação dos marcadores tumorais é o monitoramento da resposta à terapia e detecção precoce de recorrência e/ou metástase no acompanhamento dos pacientes (MATSUSHITA, *et al.*, 2002).

Atualmente, em geral a sobrevida em 10 anos de pacientes com melanoma metastástico é pobre, menor que 10%, independente da modalidade de tratamento. (BHATIA, *et al.*, 2009). Porém, hoje, novas modalidades de tratamento estão surgindo com resultados mais promissores, como a bioimunoquimioterapia (GONZALEZ, *et al.*, 2009). Além disto, alguns estudos mostram que a detecção de recorrência em uma fase precoce parece estar associada com sobrevida prolongada significativa (GARBE, *et al.*, 2003). Isto indica que a detecção precoce das recorrências e conseqüente remoção cirúrgica é muito importante na vigilância do MC. Sendo assim, talvez o início precoce de um tratamento adjuvante em pacientes com recidiva e/ou metástase poderia aumentar a sobrevida destes pacientes e os marcadores séricos seriam fundamentais para isto. Além disto, o custo do tratamento do MC em estágios avançados é muito

maior que o dos estágios iniciais. Souza e col. (SOUZA, *et al.*, 2009) avaliaram o custo do tratamento do MC no Estado de São Paulo e demonstraram que os estágios inciais (O, I e II) da doença compreendem aproximadamente 4,2% (SUS) e 1,3% (convênios) do custo total, e os estágios III e IV consomem 95,8% (SUS) e 98,7% (convênios) do custo total.

O nível sérico de PSA (*prostate specific antigen*) é um marcador tumoral amplamente utilizado para rastreamento e seguimento dos pacientes com câncer de próstata (TOLEDANO, *et al.*, 2008). Porém, diferentemente do câncer de próstata, o diagnóstico definitivo do MC geralmente se dá após a retirada total do tumor. Sendo assim, a avaliação sérica do MIA pré-retirado do tumor pode não ser possível em muitos casos. Porém, a medida do MIA pós-retirada do MC, assim como foi feito no presente trabalho, pode ter grande importância para a detecção da presença de metástases assim como para o acompanhamento destes pacientes a longo prazo para monitorar possível recorrência (BOSSERHOFF, *et al.*, 1997). Além disto, pode ocorrer que o MIA não sirva como um teste de rastreamento para o MC e sim como um marcador altamente sensível e específico, clinicamente útil para seguimento e monitoramento de terapia em pacientes com MC (BOSSERHOFF e BUETTNER, 2002; MATSUSHITA, *et al.*, 2002), além de predizer a presença de metástases ocultas em pacientes que já operaram de MC (MATSUSHITA, *et al.*, 2002).

No presente estudo, encontramos uma diferença estatística significativa nos níveis séricos de MIA entre pacientes com e sem doença metastática. Bosserhoff e col. também encontraram diferenças estatísticas significantes entre estes 2 grupos (BOSSERHOFF, *et al.*, 1997). Neste mesmo trabalho, de 350 pacientes sem doença metastática, havia 32 com níveis elevados de MIA. Destes 32, 16 desenvolveram

metástases clínicas logo após a colheita do sangue. Porém, nenhum dos outros pacientes sem níveis elevados de MIA desenvolveram metástase clínica. Isto demonstra a grande especificidade do teste MIA para a detecção de metástase. No nosso estudo, encontramos apenas 1 paciente sem metástase (número 2) que apresentou níveis de MIA maior que 9 (11,1ng/ml).

Um aumento da proteína MIA sérica durante o acompanhamento de um paciente com melanoma é um marcador de grande impacto para predizer uma progressão da doença (BOSSERHOFF, *et al.*, 1997). Matsushita e col. corroboram que níveis séricos elevados de MIA em exames repetidos pode predizer a presença de metástases clínicas ocultas (MATSUSHITA, *et al.*, 2002). Apesar de todos os pacientes com metástase do nosso estudo apresentarem metástases clínicas (e não ocultas), nossos resultados foram condizentes com a literatura mostrando níveis séricos de MIA significantemente maiores em pacientes com que nos pacientes sem metástase.

No presente estudo, dos 10 pacientes com metástase, observamos baixos níveis séricos de MIA em 2 (pacientes 23 e 24), ambos em tratamento quimioterápico no momento da coleta. Mühlbauer e col. (MUHLBAUER, *et al.*, 1999) também demonstraram níveis séricos menores de MIA em pacientes com tratamento quimioterápico e relacionaram isto à diminuição do número de células malignas sistêmicas nestes pacientes. Sendo assim, a medição repetida dos níveis séricos de MIA em pacientes metastáticos pode indicar melhor ou pior resposta terapêutica.

Borssehoff e col. (BOSSERHOFF, *et al.*, 1999) demonstraram que o MIA é fortemente expresso e secretado por células de melanoma e em baixos níveis por alguns nevos melanocíticos, porém não é secretado por melanócitos normais da pele (BOSSERHOFF, 2005). Um dos voluntários sadios (grupo controle) era da raça negra e

apresentou níveis de MIA sérico maior (8,6) que os outros voluntários que eram brancos e amarelos (4,0 – 6,4). Assim, postulamos que são necessários outros estudos mais específicos para estabelecer os níveis séricos de MIA em pacientes negros. Felizmente, a presença de MC em pacientes da raça negra é incomum (KABIGTING, *et al.*, 2009).

Além do MIA, existem outros marcadores tumorais para MC como S-100 e LDH. Alguns estudos mostram que o MIA revelou ter maior sensibilidade e um potencial prognóstico melhor que o S-100 (SCHMITZ, BRENNER *et al.*, 2000; LOPPIN, *et al.*, 2007). A maioria dos trabalhos faz a medição do S-100 por ensaios imunoradiométricos (TAS, *et al.*, 2004), ou ensaios imunoluminescentes (FARIES, *et al.*, 2007) ou PCR (GARBE, *et al.*, 2003). Sabemos que o teste Elisa é realizado rotineiramente em diversos laboratórios clínicos do país e do Estado do Mato Grosso do Sul, pois sua aplicação clínica é muito ampla, não só no ramo da oncologia, mas principalmente para doenças infecto-contagiosas (FIGUEIRO-FILHO, *et al.*, 2007; OLIVEIRA, *et al.*, 2008). Já o PCR e outros tipos de ensaio podem ser mais especializados e talvez com dificuldade um pouco maior para serem realizados, dependendo do local.

No presente experimento, não houve dificuldades técnicas quanto à realização do teste ELISA-MIA. Todas as amostras foram avaliadas em 3 ocasiões distintas e não houve diferenças entre as medidas.

O teste ELISA-MIA é vendido comercialmente pela empresa Roche®, e facilmente adquirido. O condicionamento do kit é feito em ambiente refrigerado (5-10^{0}C) e pode ser armazenado em qualquer refrigerador comum, conforme especificação do fabricante, por até 1 ano e 6 meses. O custo do Kit de ELISA-MIA é de R$ 2.850,00, com capacidade para 96 testes, sendo o custo unitário por cada avaliação menos de R$ 30,00. Porém, devemos acrescentar o custo dos materiais da coleta sangüínea como

seringas, agulhas, tubos de ensaio, *ependorf*, etc. Para facilitar a execução do trabalho e realizar o máximo de testes com cada kit, as amostras foram agrupadas e realizadas em conjunto. Para armazenamento do soro antes da realização do teste, foi necessário um freezer de -20^{0}C, gentilmente cedido pelo Departamento de Patologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/UFMS.

Porém, caso este teste seja incorporado à rotina do acompanhamento dos pacientes com MC, ele pode ser realizado com amostra única, assim como outros testes Elisa, o que pode encarecer o custo do teste.

O nosso projeto foi realizado em triplicata, além de testes preliminares para testar o kit, o que aumentou os custos do exame de cada amostra. Porém, se realizado em grupos de diversas amostras, o custo de cada teste em relação ao kit sairia em torno de R$ 30,00 por amostra (cotação realizada em agosto/2008). Porém, deve-se somar a isto o custo de outros materiais de consumo para a colheita de sangue e armazenamento do soro. Sendo assim, o teste MIA-Elisa mostrou ser um teste com custo viável a ser realizado na rotina dos pacientes com MC.

7 CONCLUSÃO

1) Houve diferença estatística significante entre os níveis séricos de MIA em pacientes com e sem metástase.

2) Não houve diferença estatística significante entre os pacientes sem metástase e indivíduos sadios (grupo controle), porém houve diferença estatística significante entre pacientes com metástase e indivíduos sadios.

3) O teste MIA é de fácil execução, com custo viável, e pode ser realizado em pacientes com MC no Estado do Mato Grosso do Sul.

REFERÊNCIAS

AHMED, I. Malignant melanoma: prognostic indicators. **Mayo Clin Proc,** v.72, v.4, 1997,p.356-61.

ARAUJO, J.F., et al. [Brain metastasis of malignant melanoma. Analysis of 13 cases]. **Arq Neuropsiquiatr,** v.55, n.2, 1997, p.292-7.

ARMSTRONG, B.K.; KRICKER, A. How much melanoma is caused by sun exposure? **Melanoma Res,** v.3, n.6, 1993, 395-401.

ARMSTRONG, B.K.; KRICKER, A. Cutaneous melanoma. **Cancer Surv**, n.19-20, 1994, p.219-40.

BALCH, C.M. Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide. **Semin Surg Oncol,** v.8, n.6, 1992, p.400-14.

BALCH, C.M., et al. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. **Cancer**, v.88, n.6, 2000, p.1484-91.

BALCH, C.M., et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. **J Clin Oncol**, v.19, n.16, 2001, p.3635-48.

BALCH, C.M., et al. New TNM melanoma staging system: linking biology and natural history to clinical outcomes. **Semin Surg Oncol**; v.21, n.1, 2003, p.43-52.

BALCH, C.M., et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. **J Clin Oncol**; v.19, n.16, 2001, p.3622-34.

BERWICK, M., et al. Sun exposure and mortality from melanoma. **J Natl Cancer Inst,** v.97, n.3, 2005, p.195-9.

BHATIA, S.; TYKODI, S.S.; THOMPSON, J.A. Treatment of metastatic melanoma: an overview. **Oncology** (Williston Park); v.23, n.6, 2009, p.488-96.

BLESCH, A. et al. Cloning of a novel malignant melanoma-derived growth-regulatory protein, MIA. **Cancer Res**; v.54, n.21, 19945, p.695-701.

BLESSING, K.; MCLAREN, K.M. Histological regression in primary cutaneous melanoma: recognition, prevalence and significance. **Histopathology**; v.20, n.4, 1992, p.315-22.

BOSSERHOFF, A.K.; BUETTNER, R. Expression, function and clinical relevance of MIA (melanoma inhibitory activity). **Histol Histopathol,** v.17, n.1, 2002, p.289-300.

BOSSERHOFF, A.K.Melanoma inhibitory activity (MIA): an important molecule in melanoma development and progression. **Pigment Cell Res,** v.18, n.6, 2005, p.411-6.

BOSSERHOFF, A.K. et al. Elevated MIA serum levels are of relevance for management of metastasized malignant melanomas: results of a German multicenter study. **J Invest Dermatol**, v.114, n.2, 2000, p.395-6.

BOSSERHOFF, A.K.et al. Melanoma-inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. **Cancer Res,** v.57, n.15, 1997, p.3149-53.

BOSSERHOFF, A.K.; HEIN, R., BOGDAHN,U.; BUETTNER, R. Structure and promoter analysis of the gene encoding the human melanoma-inhibiting protein MIA. **J Biol Chem**, v.271, n.1, 1996, p.490-5.

BOSSERHOFF, A.K.; KUSTER, H.; HEIN, R.Elevated MIA levels in the serum of pregnant women and of children. **Clin Exp Dermatol**, v.29, n.6, 2004, p.628-9.

BOSSERHOFF, A.K.; MOSER, M.; HEIN, R.Landthaler M, Buettner R. In situ expression patterns of melanoma-inhibiting activity (MIA) in melanomas and breast cancers. **J Pathol** , v.187, n.4, 1999, p.446-54.

BRASIL, Ministério da Ciência e Tecnologia. **INEP, Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira.** Disponível em: http://www.dge.inpe.br/ozonio/radiauvb.htm. Acesso em: 13 nov 2009.

_____. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil.** Brasília (DF) 1999.

_____. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **A situação do Câncer no Brasil.** Brasília (DF) 2006.

_____. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Oncologia Hoje.** Rio de Janeiro. Brasília (DF) 1992:5-28.

BURNIER PEREIRA, F,.;BURNIER, MN, J.R.; SHIBATA, H.; WANG, B.; CAREY, W. Cytomorphometric parameters and the metastatic potential of cutaneous and uveal melanoma: a comparison with prognostic factors. **Am J Dermatopathol**, v.23, n.4, 2001;304-7.

BYERS, H.R.; BHAWAN, J. Pathologic parameters in the diagnosis and prognosis of primary cutaneous melanoma. **Hematol Oncol Clin North Am**, v.12, n.4, 1998, p.717-35.

CARLI, P. e tal. Cutaneous melanoma histologically associated with a nevus and melanoma de novo have a different profile of risk: results from a case-control study. **J Am Acad Dermatol,** v.40, n.4, 1999, p.549-57.

CHANG, A.E.; KARNELL, L.H.; MENCK, H.R. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. **Cancer**, v.83, n.8, 1998, p.1664-78.

CLARK, W.H. Jr., et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. **J Natl Cancer Inst**, v.8, n.24, 1989, p.1893-904.

CLEMENTE, C.G., et al. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. **Cancer,** v.77, n.7, 1996, p.1303-10.

COHEN, L.M. Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. **J Am Acad Dermatol** v.33, n.6, 1995, p.923-36; 937-40.

COLLOBY, P.S.; WEST, K.P.; FLETCHER, A. Observer variation in the measurement of Breslow depth and Clark's level in thin cutaneous malignant melanoma. **J Pathol**, v.163, n.3245-50.

CONLEY, J.; LATTES, R.; ORR, W. Desmoplastic malignant melanoma (a rare variant of spindle cell melanoma). **Cancer**, v.28, n.4, 1971, p.914-36.

DE BRAUD, F. et al. Malignant melanoma. **Crit Rev Oncol Hematol,** v.47, n.1, 2003, p.35-63.

DESMOND, R.A.; SOONG, S.J. Epidemiology of malignant melanoma. **Surg Clin North Am**, v. 83, n.1, 2003; p.1-29.

DICKER, T.J. et al. A rational approach to melanoma follow-up in patients with primary cutaneous melanoma. Scottish Melanoma Group. **Br J Dermatol**, v.140, n.2, 1999; p.249-54.

EIGENTLER, T.K.; BUETTNER, P.G.; LEITER, U.; GARBE, C. Impact of ulceration in stages I to III cutaneous melanoma as staged by the American Joint Committee on Cancer Staging System: an analysis of the German Central Malignant Melanoma **Registry. J Clin Oncol**, v.22, n.21, 2004, p.4376-83.

ELDER, D.E. Skin cancer. Melanoma and other specific nonmelanoma skin cancers. **Cancer**, v.75, n.1 Supl, 1995, p.245-56.

ELWOOD, J.M. Recent developments in melanoma epidemiology, 1993. **Melanoma Res**, v.3, n.3, 1993, p.149-56.

FARIES, M.B. et al. A Comparison of 3 tumor markers (MIA, TA90IC, S100B) in stage III melanoma patients. **Cancer Invest,** v.25, v.5, 2007, p.285-93.

FERRARI JUNIOR, N.M. et al. Cutaneous melanoma: descriptive epidemiological study. **Sao Paulo Med J**, v.126, n.1, 2008, p.41-7.

FIGUEIRO-FILHO, E.A. et al. [Frequency of HIV-1, rubella, syphilis, toxoplasmosis, cytomegalovirus, simple herpes virus, hepatitis B, hepatitis C, Chagas disease and HTLV I/II infection in pregnant women of State of Mato Grosso do Sul]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.40, n.2, 2007, p.181-7.

FITZPATRICK, T.B. **Dermatology in general medicine**. 4.ed. New York: McGraw-Hill Health Professions Division; 1993.

FLECK, J. Melanoma. A Neoplasia do século XXI. **An bras Dermatol,** v.73, supl. 1, 1998, p.29-31.

FONTAINE, D. et al. Partial regression of primary cutaneous melanoma: is there an association with sub-clinical sentinel lymph node metastasis? **Am J Dermatopathol** v.25, n.5, 2003, p.371-6.

GARBE, C.; EIGENTLER, T.K. Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: state of the art 2006. **Melanoma Res,** v.17, n.2, 2007, p.117-27.

GARBE, C. et al. Diagnostic value and prognostic significance of protein S-100beta, melanoma-inhibitory activity, and tyrosinase/MART-1 reverse transcription-polymerase chain reaction in the follow-up of high-risk melanoma patients. **Cancer**, v.97, n.7, 2003, p.1737-45.

GARBE, C. et al. Primary cutaneous melanoma. Prognostic classification of anatomic location. **Cancer**, v.75, n.10,1995, p.2492-8.

GARBE, C. et al. Prospective evaluation of a follow-up schedule in cutaneous melanoma patients: recommendations for an effective follow-up strategy. **J Clin Oncol** v.21, n.3, 2003, p.520-9.

GARLAND, C.F.; GARLAND, F.C.; GORHAM, E.D. Rising trends in melanoma. An hypothesis concerning sunscreen effectiveness. **Ann Epidemiol**, v.3, n.1, 1993, p.103-10.

GARRISON, M.; NATHANSON, L. Prognosis and staging in melanoma. **Semin Oncol** v.23, n.6, 1996, p.725-33.

GERSHENWALD, J.E.; BUZAID, A.C.; ROSS, M.I. Classification and staging of melanoma. **Hematol Oncol Clin North Am**, v.12, n.4, 1998, p.737-65.

GONZALEZ ASTORGA B. et al. Biochemotherapy in the treatment of metastatic melanoma in selected patients. **Clin Transl Oncol,** 11, n.6, 2009, p.382-6.

HALPRIN, K.M. Epidermal "turnover time"--a re-examination. **Br J Dermatol,** v.86, n.1, 1972, p.14-9.

HAWKINS, B.S. The Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS) randomized trial of pre-enucleation radiation of large choroidal melanoma: IV. Ten-year mortality findings

and prognostic factors. COMS report number 24. **Am J Ophthalmol**, v.138, n.6, 2004, p.936-51.

HEASLEY, D.D.; TODA, S. MIHM JR, M.C. Pathology of malignant melanoma. **Surg Clin North Am**, v.76, n.6, 1996, p.1223-55.

HEENAN, P.J. et al. Survival among patients with clinical stage I cutaneous malignant melanoma diagnosed in Western Australia in 1975/1976 and 1980/1981. **Cancer,** v.68, n.9, 1991, p.2079-87.

HELLERBRAND, C. et al. The novel gene MIA2 acts as a tumour suppressor in hepatocellular carcinoma. **Gut**, v.57, n.2, 2008, p.243-51.

HIEKEN TJ, et al. Molecular prognostic markers in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. **Cancer,** v.85, n.2, 1999, p.375-82.

HOCKER, T.; TSAO, H. Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. **Hum Mutat,** v.28, n.6, 2007, p.578-88.

HOFMANN, M.A. et al. Diagnostic value of melanoma inhibitory activity serum marker in the follow-up of patients with stage I or II cutaneous melanoma. **Melanoma Res,** v.19, n.1, 2009, p.17-23.

HOGAN, M.J.; ALVARADO, J.A.; WEDDELL, J.E. **Histology of the human eye; an atlas and textbook.** Philadelphia: Saunders; 1971.

INCA: Instituto Nacional do Câncer. **Câncer de pele: melanoma.** In:_____. Câncer. Rio de Janeiro: INCA, c1996-2005. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335>. Acesso em: 12 dez. 2009.

INTERNATIONAL UNION AGAINST **Cancer: Introduction UICC Global Câncer Control.** Geneve, Switzerland, UICC, 2005.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics, 2005. **CA Cancer J Clin**, v.55, n.1, 2005, p.10-30.

KABIGTING, F.D. et al. Malignant melanoma in African-Americans. **Dermatol Online J,** v.15, n.2, 2009, p.3.

KOEHLER, M.R. et al. Assignment of the human melanoma inhibitory activity gene (MIA) to 19q13.32-q13.33 by fluorescence in situ hybridization (FISH). **Genomics** 1996;35(1):265-7.

KOH, H.K. et al. The early detection of and screening for melanoma. International status. **Cancer,** v.75, 2 Supl., 1995, p.674-83.

KUCHER, C. et al. Expression of Melan-A and Ki-67 in desmoplastic melanoma and desmoplastic nevi. **Am J Dermatopathol**, v.26, n.6, 2004, p.452-7.

LEE, J.A. Trends in melanoma incidence and mortality. **Clin Dermatol**, v.10, n.1, 1992, p.9-13.

LEITER, U. et al. The natural course of cutaneous melanoma. **J Surg Oncol**, v.86, n.4, p.172-8. 2004.

LEVER, W.F.; ELDER, D.E.**Lever's histopathology of the skin.** 8.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997.

LIM, H.W.; COOPER, K. The health impact of solar radiation and prevention strategies: Report of the Environment Council, American Academy of Dermatology. **J Am Acad Dermatol,** v.41, n.1, p.81-99, 1999.

LOPPIN, M et al. [Protein S100 beta and Melanoma Inhibitory Activity (MIA): a prospective study of their clinical value for the early detection of metastasis in malignant melanoma]. **Ann Dermatol Venereol,** v.134, n.6-7, p.535-40, 2007.

MACHADO, A.T. et al. Conduta para o Melanoma Cutâneo Maligno. **Rev Med Minas Gerais**, v.14, n.3, p.173-9. 2004.

MACKIE, R., et al. Cutaneous malignant melanoma, Scotland, 1979-89. The Scottish Melanoma Group. **Lancet,** v.339, n.8799, p.971-5.1992.

MACLENNAN, R., et al. Increasing incidence of cutaneous melanoma in Queensland, Australia. **J Natl Cancer Inst**, v.84, n.18, p.1427-32. 1992.

MASSI, D. Franchi A, Borgognoni L, Reali UM, Santucci M. Thin cutaneous malignant melanomas (< or =1.5 mm): identification of risk factors indicative of progression. **Cancer,** v.85, n.5, p.1067-76. 1999.

MATSUSHITA, Y. et al. Melanoma inhibitory activity (MIA) as a serum marker for early detection of post-surgical relapse in melanoma patients: comparison with 5-S-cysteinyldopa. **Melanoma Res,** v.12, n.4, p.319-23. 2002.

MEIER, F. et al. Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma. **Br J Dermatol**, v.147, n.1, p.62-70. 2002.

MUHLBAUER, M. et al. Detection of melanoma cells in the blood of melanoma patients by melanoma-inhibitory activity (MIA) reverse transcription-PCR. **Clin Cancer Res** v.5, n.5, p.1099-105. 1999.

NACHBAR, F.et al. The ABCD rule of dermatoscopy. High prospective value in the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. **J Am Acad Dermatol**, v.30, n.4, p.551-9. 1994.

OLIVEIRA, A.L. et al. Asymptomatic infection in family contacts of patients with human visceral leishmaniasis in Tres Lagoas, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Cad Saúde Pública,** v.24, n.12, p.2827-33. 2008.

PARKER, S.L. et al. Cancer statistics, 1996. **CA Cancer J Clin**, v.46, n.1, p.5-27, 1996.

POSER, I. Functional role of MIA in melanocytes and early development of melanoma. **Oncogene,** v.23, n.36, p.6115-24. 2004.

QUEVEDO, W.C. et al. Melanocyte populations in UV-irradiated human skin. **J Invest Dermatol,** 45, n.4, p.295-8. 1965.

REDDY, V.B et al. Cell proliferation markers in predicting metastases in malignant melanoma. **J Cutan Pathol**, v.22, n.3, p.248-51. 1995.

RIES, L.A. et al. The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. **Cancer**, v.88, n.10, p.2398-424. 2000.

SARTI, M.S. VISCONTI, M.A.; CASTRUCCI, AM. Biological activity and binding of estradiol to SK-Mel 23 human melanoma cells. **Braz J Med Biol Res**, v.37, n.6, p.901-5. 2004.

SASAHIRA, T., et al. High mobility group box-1-inducible melanoma inhibitory activity is associated with nodal metastasis and lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Sci,** 2008; v.99, n.9, p.1806-12. 2008.

SCHAFFER JV, et al. Cutaneous melanoma-past, present, and future. **J Am Acad Dermatol**, v.5, n.1(Suppl), p.65-9. 2004.

SCHMIDT, J.; BOSSERHOFF, A.K. Processing of MIA protein during melanoma cell migration. **Int J Cancer**, v.125, n.7, p.1587-94. 2009.

SCHMITZ, C. et al. Comparative study on the clinical use of protein S-100B and MIA (melanoma inhibitory activity) in melanoma patients. **Anticancer Res**, v.20, n.6D, p.5059-63. 2000.

SCOTTO, J.; PITCHER, H.; LEE, J.A. Indications of future decreasing trends in skin-melanoma mortality among whites in the United States**. Int J Cancer,** v.49, n.4, p.490-7. 1991.

SHAW, H.M. et al. Thin regressing malignant melanoma: significance of concurrent regional lymph node metastases. **Histopathology,** v.15, n.3, p.257-65. 1991.

SKOBE, M. et al. Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. **Am J Pathol,** v.159, n.3, p.893-903.2001.

SLOMINSKI, A. et al. Malignant melanoma. **Arch Pathol Lab Med,** v.125, n.10, p.1295-306. 2001.

SNELS, D.G. et al. Risk of cutaneous malignant melanoma in patients with nonfamilial atypical nevi from a pigmented lesions clinic. **J Am Acad Dermatol,** v.40, n.5, p.686-93. 1999.

SOUZA, R.J. et al. [An estimate of the cost of treating melanoma disease in the state of Sao Paulo - Brazil]. **An Bras Dermatol**, v.84, n.3, p.237-43. 2009.

SPATZ, A. et al. Association between DNA repair-deficiency and high level of p53 mutations in melanoma of Xeroderma pigmentosum. **Cancer Res**; v.61, n.6, p.2480-6. 2001.

STARICCO, R.J. Qualitative and quantitative data on melanocytes in human epidermis treated with thorium X. **J Invest Dermatol,** v.29, n.3, p.185-95. 1957.

SWERDLOW, A.J. International trends in cutaneous melanoma. **Ann N Y Acad Sci,** v.60, n.9, p.235-51. 1990.

TAS, F. et al. Clinical value of protein S100 and melanoma-inhibitory activity (MIA) in malignant melanoma. **Am J Clin Oncol**, v.27, n.3, p.225-8. 2004.

THORN, M. Trends in the incidence of malignant melanoma in Sweden, by anatomic site, 1960-1984. **Am J Epidemiol,** v.132, n.6, p.1066-77. 1990.

TOLEDANO, A. et al. Elevation of PSA after prostate radiotherapy: rebound or biochemical recurrence?. **Prog Urol,** v.8, n.9, p.557-61. 2008.

TUCKER, M.A.; GOLDSTEIN, A.M. Melanoma etiology: where are we? **Oncogene,** v.22, n.20, p.3042-52. 2003.

VENEGAS, L.F.; et al. Cutaneous malignant melanoma in Rio Grande do Sul, Brazil: study of 101 cases. **Rev Assoc Med Bras,** v.38, n.3, p.122-6. 1992.

VERONESE, L.A.; MARQUES, M.E.A. Critérios anatomopatologicos para o melanoma cutâneo maligno: análise qualitativa de sua eficácia e revisão da literatura. **J Bras Patol Med Lab**, v.40, n.2, p.99-112. 2004.

VILMER, C. et al. Thin melanomas with unusual aggressive behavior: a report on nine cases. Melanoma Group of French Federation of Cancer Centers. **J Am Acad Dermatol,** v.34, n.3, p.439-44. 1996.

VUCETIC, B. et al. Biological value of melanoma inhibitory activity serum concentration in patients with primary skin melanoma. **Melanoma Res,** v.18, n.3, p.201-7. 2008.

WEISS, M. et al. Utility of follow-up tests for detecting recurrent disease in patients with malignant melanomas. **Jama,** v.274, n.21, p.1703-5. 1995.

WINKLMEIER, A. eta al. Cadherin-7 interacts with melanoma inhibitory activity protein and negatively modulates melanoma cell migration. **Cancer Sci,** n.100, n.2, p.261-8. 2009.

ANEXOS

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS.

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS

Carta de Aprovação

A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1038 do Pesquisador Maçanori Odashiro intitulado "Avaliação do MIA (Melanoma Inhibitory Activity) no acompanhamento clínico dos pacientes com Melonoma Cutâneo no Estado do Mato Grosso do Sul", e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião extraordinária no dia 13 de março de 2008, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Prof. Odair Pimentel Martins
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 13 de março de 2008.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/
bioetica@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187

ANEXO 2 - NORMAS ADOTADAS

Associação Brasileiras de Normas Técnicas. NBR 6023: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

_____. NBR 10520: informação e documentação – citações em documentos – apresentação. Rio de janeiro, 2000.

_____. NBR 14724: informação e documentação – trabalhos acadêmicos – apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

Conselho Nacional de Saúde – Resolução n0 01/88: Normas de Pesquisa em Saúde. Bioética 1995; 3:137-54.

DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. 3 ed. São Paulo, Bireme, 1996. p.1146.

Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. International Committee of Medical Journal Editors. Ann Intern Med 1997; 126:36-47.