

CONSIDERAÇÕES SOBRE MELANOMA MALIGNO EM CÃES: UMA ABORDAGEM HISTOLÓGICA

Roberto Martins Manzan¹, Arnaldo Rodrigues Santos Junior²,
Sonia Cristina Perinelli³, Milena de Fátima Bertoncelli³, Vanessa Pereira Zica³

RESUMO

O melanoma é um tipo de câncer proveniente dos melanócitos e o seu estabelecimento envolve diversas etapas, até a formação de um tumor invasivo e metastático. O melanoma é um dos tipos de câncer de pior prognóstico e com alta incidência de metástases. É mais comum em cães do que em gatos. Em caninos, a maior incidência é em raças com maior pigmentação, como Boxer, Cocker, dentre outras. Em felinos pode ocorrer em qualquer raça. Em ambos não ocorre predileção por sexo e a maior incidência é em animais mais velhos. O tratamento é feito por excisão cirúrgica local, porém a causa morte do animal geralmente está associada à formação de um tumor secundário que, na maioria dos casos, se forma nos pulmões, fígado, rins ou cérebro. Fizemos um levantamento da incidência de melanoma nos últimos 5 anos, no Hospital Veterinário da Unipinhal. Foi encontrado apenas um caso nesse período. Fizemos então uma análise histológica e citoquímica do tumor. Observamos que as células invasivas contém uma grande quantidade de proteínas, provavelmente relacionadas à invasão tumoral, e uma quantidade de glicosaminoglicanos e/ou RNA ligeiramente mais abundante do que as células normais. Estes achados apontam para a necessidade de um melhor conhecimento das características histológicas e histoquímicas do melanoma, que podem levar a formas mais eficientes e seguras de diagnóstico.

Palavras chave: melanoma, histologia, histoquímica.

ABSTRACT

The melanoma is cancer type originating from the melanocytes and his establishment involves diverse phases to formation of an invasive and metastatic tumor. The melanoma is one of the kinds of cancer of more worse prognostic and with high incidence of metastases. It is more common in dogs than in cats. In dogs, to higher incidence is in races with bigger pigmentation, as Boxer, Cocker, and other. In cats can occur in any races. In both not preference by sex and to bigger incidence occurs is in older animals. The treatment is done by local surgery, however the animal death generally is associated to the formation of a secondary tumor that, in the majority of the

¹ In memorian - Docente da UNIPINHAL

² Autor para envio de correspondência: Arnaldo Rodrigues Santos Jr, Curso de Ciências Biológicas, Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal, CEP 13990-000- Espírito Santo do Pinhal, SP. e-mail: arsanosjr@yahoo.com.br

³ Alunas do Curso de Ciências Biológicas da UNIPINHAL

cases, if form in the lungs, liver, kidneys or brain. We did an analysis of the melanoma incidence in the last 5 years in the Veterinary Hospital of the Unipinhal. It was found only one case in the period of our study. So, a histological and histochemical analysis was made. We observe that the invasive cells have a great quantity of proteins, probably related to the cancer invasion. We also found a great quantity of glycosaminoglycans and/or RNA slightly more abundant than the normal cells. These finds aim for the need of a better knowledge of the histological and histochemical characteristics of the melanoma, that can be used to more efficient forms and insurances of diagnosis.

Key words: melanoma, histology, histochemistry

INTRODUÇÃO

O Melanoma Maligno se origina a partir da transformação dos melanócitos, células responsáveis pela produção da melanina, um pigmento importante que atua no bloqueio endógeno dos raios ultravioletas da luz solar (Kumar et al., 2005). Isso ocorre porque os grânulos de melanina localizados na região supranuclear formam um capuz protetor para o DNA das células epiteliais (Junqueira e Carneiro, 2004). O estabelecimento do melanoma maligno é um processo que envolve várias fases, que progridem desde nevus benignos, que são manchas de pele, passando por intermediários apresentando proliferação celular e estruturas teciduais e celulares anormais conhecidas como displásicas, até a formação de um tumor invasivo e metastático. Em humanos, o melanoma é um dos tipos mais graves de câncer. Segundo informações do Instituto Nacional do Câncer, 35% das pessoas que desenvolvem melanoma no Brasil morrem (Borges, 2003). Apesar de raro, o melanoma teve, nos últimos 30 anos, um enorme aumento em sua ocorrência. Nos cães, as áreas mais comuns são a cavidade oral, a cabeça, os dedos, os membros e escroto; nos gatos, ocorrem com maior frequência na cabeça e no pescoço.

Nos cães, o melanoma maligno ocorre principalmente nas raças fortemente pigmentadas, normalmente na boca, onde pode haver forte pigmentação melânica. Ocorre também na cabeça, no tronco e membros, inclusive no leito ungueal e escroto. Pode originar-se também em membranas oculares que contém melanina, recebendo o nome de melanoma intra-ocular (Bostoch e Owen, 1975). A média de idade é de nove anos, não ocorrendo preferência por sexo. Em cães, as raças Terrier Escocês, Airedale, Boston Terrier, Cocker Spaniel, Springer Spaniel, Boxer, Golden Retriever, Setter Irlandês, Schnauzer miniatura, Doberman Pinscher, Chihuahua e Chow Chow, são as que apresentam maiores risco de desenvolver o melanoma (Scott et al., 1996). Nos gatos, as lesões geralmente aparecem na cabeça, principalmente na orelha, pálpebra, lábio e focinho, no pescoço e nos membros. Ocorrem na faixa etária média de 10 anos e, como nos cães, não há predileção por sexo, podendo também ocorrer em qualquer raça (Scott et al., 1996).

O melanoma é assintomático, embora o prurido possa constituir uma manifestação inicial (Kumar et al., 2005). O tratamento utilizado é a excisão cirúrgica radical. O reaparecimento de uma doença depois da recuperação aparentemente completa da saúde e a metástase são comuns. Em estudos de melanomas cutâneos em cães que foram tratados cirurgicamente, aqueles em

que a neoplasia era pequena apresentaram um tempo médio de sobrevivência de 12 meses e uma porcentagem de óbito de 54% dentro de dois anos; já aqueles em que a neoplasia era grande, apresentaram um tempo médio de sobrevivência de quatro meses e uma porcentagem de óbito de 100% dentro de dois anos. Os cães com melanomas orais tratados cirurgicamente apresentaram um tempo médio de sobrevivência de três meses.

Quando detectado um tumor secundário, o médico veterinário pode indicar o tratamento à base de quimioterapia ou radioterapia (Scott et al., 1996; Kümmel 1996).

Embora se tenha um conhecimento significativo sobre a patogenia do melanoma, abordagens histológicas que contemplem a comparação com o tecido sadio são raras, sendo este o objetivo do presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados todos os casos de melanoma maligno que deram entrada no Hospital Veterinário do Centro regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal - Unipinhal, Espírito Santo do Pinhal, SP, Brasil, nos últimos 5 anos. As amostras encontradas foram processadas para análise histopatológica por técnicas de rotina previamente. Os materiais foram corados com Hematoxilina e Eosina, Azul de Toluidina em pH 4,0 (AT), um corante basófilo que cora glicosaminoglicanos, DNA e RNA nesse pH, e Xylidene Ponceau em pH 2,5 (XP), um corante acidófilo que evidencia proteínas totais nesse pH (Lison, 1967; Mello, 1997). Imagens das lâminas foram obtidas em fotomicroscópio Olympus modelo CX40.

RESULTADOS

Na análise nos arquivos do Hospital Veterinário do Unipinhal foi encontrado apenas um caso de melanoma nos últimos 5 anos, registrado no prontuário 172/01. O caso estudado era um cão Poodle macho, de pelagem cinza e com cerca de 10 anos de idade, conforme dados do prontuário. O prontuário registra ainda que o animal apresentava nódulo com aproximadamente 5 cm de diâmetro, de consistência firme, não ulcerado, de coloração negra e superfície irregular e bem irrigado. O diagnóstico de melanoma foi confirmado por histopatologia. Foram feitas a documentação fotográfica de diferentes padrões de melanoma no animal estudado. A Figura 1A e 1B mostram o aspecto histológico da mucosa oral normal do cão avaliado em nosso estudo. Em 1A a figura focaliza o epitélio estratificado pavimentado queratinizado, com suas diversas camadas, todas elas de aspecto normal. Em um 1B é observado o tecido conjuntivo de preenchimento onde o epitélio se apóia, denominado lâmina própria, onde se nota um conjuntivo de natureza frouxa próximo ao tecido epitelial. As demais imagens (de 1C a 1F), ilustram aspectos microscópicos. Na figura 1C se observa visão panorâmica de uma região onde se encontra o início do processo invasivo das células provenientes do melanoma maligno. Em 1D é mostrado a mesma região em maior aumento. Note as células invasivas pigmentadas invadindo o estroma tecidual. Em 1E se observa a lâmina própria conjuntiva totalmente invadida por células cancerosas fortemente pigmentadas. Na figura 1F se nota tecido maligno invasivo fortemente pigmentado ao lado de tecido conjuntivo saudável no limite entre a massa tumoral invasora.

Fizemos então a análise histoquímica do material estudado. Observamos que quando coradas pelo XP, as células malignas invasivas apresentavam uma maior quantidade de proteínas em contraste ao estroma normal sendo invadido (figura 2A e 2B). Quando corado com AT, observamos uma basofilia discretamente mais intensa. Entretanto, algumas células malignas mostravam-se intensamente basófilas no estroma invadido (Figura 2C e 2D).

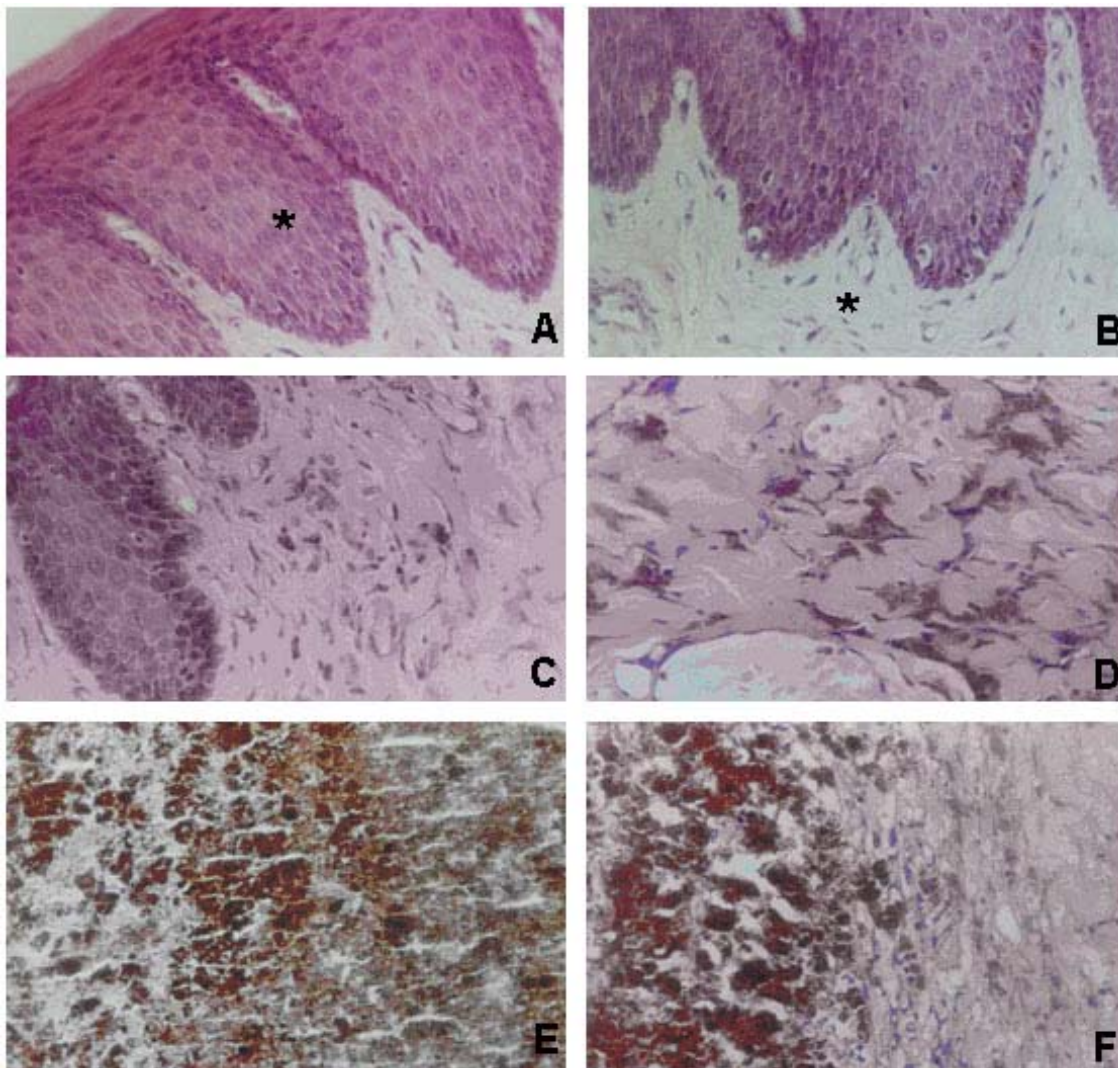


Figura 1. Análise histopatológica do melanoma estudado. (A) Visão da mucosa oral normal, enfocando o tecido epitelial de revestimento (*); (B) Também mucosa oral normal, em outra região, mostrando a lâmina própria de tecido conjuntivo (*) na qual o epitélio de revestimento se apóia; (C) Mucosa oral com células malignas pigmentadas invadindo o estroma tecidual; (D) Maior aumento da figura anterior; (E) Região onde a lamina própria de tecido conjuntivo se encontra totalmente invadida; (F) Limite entre o estroma tecidual normal e invadido. Aumento das figuras A, B, C e F= 200X; D e E = 400X.

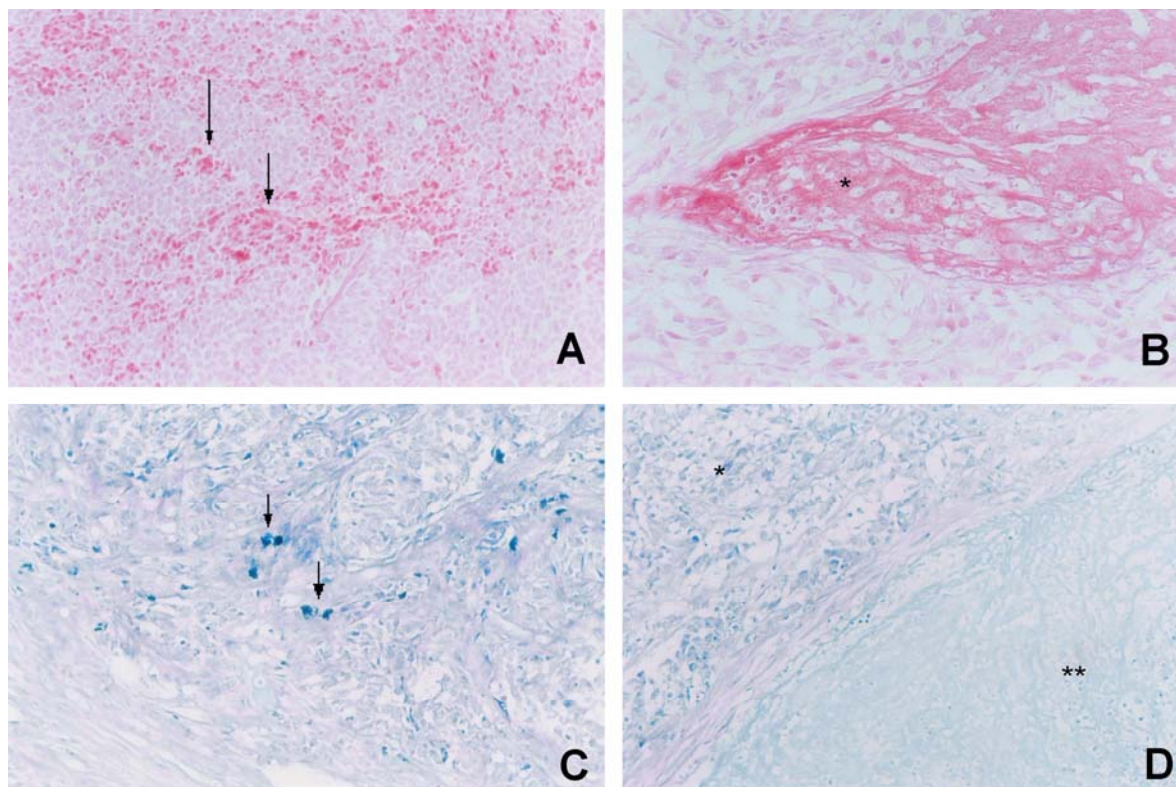


Figura 2. Análise citoquímica de melanoma estudado. Em (A) e (B) são visto coloração com Xylydine Ponceau, que evidencia proteínas. Pode-se observar em (A) as células cancerosas invasivas apresentam um padrão e coloração mais evidente que o tecido normal (setas). Em (B) pode ser visualizado uma região intensamente acidófila (*) corada pelo XP. Em (C) e (D) são vista células coradas com azul de toluidina em pH 4,0, que evidencia nesse pH DNA, RNA e glicosaminoglicanos. Em (C) se nota células invasivas mais pigmentadas (setas). Em (D) se observa o limite entre o tecido canceroso acima (*) e normal abaixo (**) com menor coloração. Aumento das figuras = 100X.

DISCUSSÃO

Pela análise nos arquivos do Hospital Veterinário do Unipinhal encontramos apenas um único caso de melanoma nos últimos 5 anos. Isto poderia indicar uma incidência baixa desse tipo de tumor na região. Estamos atualmente expandindo o período de análise dos protuários arquivados para confirmar esse dado. Nos cães, as lesões por melanoma variam de 0,5 a 10 cm de diâmetro e nos gatos variam de 0,5 a 4 cm de diâmetro. As ulcerações são freqüentes em ambos (Scott et al. 1996). No melanoma, as principais características histopatológicas são: assimetria da arquitetura névica, margens irregulares, variação no tamanho, variação na sua pigmentação, apresentando tonalidades de preto, castanho, vermelho, azul-escuro e cinza e em certas ocasiões são observadas zonas de hipopigmentação branca ou cor da pele, e aumento de um nevo preexistente. Estes dados são compatíveis com os achados em nosso trabalho. As células tumorais ora dispõem-se em estruturas, como nos epitélios, ora ao redor dos vasos, ora de maneira difusa. A

pigmentação varia de célula para célula, podendo encobri-la totalmente. (Scott et al. 1996; Willensen, 1998).

Os queratinócitos e os melanócitos mantêm-se unidos por proteínas de adesão celular produzidas por ambos os tipos celulares e enviadas para suas membranas plasmáticas envoltórias. Essas proteínas são as E-Caderinas, consideradas componentes-chave para a dominação dos melanócitos pelos queratinócitos. Recentemente foi descoberto que um dos primeiros passos no processo de transformação pelo qual passam os melanócitos para se tornarem cancerígenos envolve a diminuição da síntese de E-Caderinas e a produção de um outro tipo de molécula de adesão dessa mesma família, conhecida como N-Caderina. As N-Caderinas apresentam uma especificidade diferente de ligação: não se unem mais aos queratinócitos, mas a outras células do tecido epitelial. Observa-se, então, uma inversão no processo: os melanócitos antes controlados pelos queratinócitos passam a comandar o funcionamento dos fibroblastos, células endoteliais e inflamatórias (Pince et al., 1997; Liotta e Petricoin, 2000).

Do ponto de vista citológico, as células tumorais apresentam o núcleo com variações de tamanho, com alterações na sua proporção comparada com o citoplasma. O núcleo geralmente é hiper cromático. No entanto, alguns núcleos podem ser hipocromáticos, com aspecto vesiculoso e apresentar cromatina frouxa. Os nucléolos também podem variar em número e tamanho. Algumas células podem ser binucleadas e o número de mitoses é mais abundante. (Junqueira e Carneiro, 2000). O citoplasma das células cancerosas normalmente é basófilo, devido à maior quantidade de ribossomos, sendo uma característica das células em proliferação. O retículo endoplasmático e o complexo de Golgi são geralmente pouco desenvolvidos, e as mitocôndrias e lisossomos, pouco numerosos (Buick e Tannock, 1992; Junqueira e Carneiro, 2000). Observamos células provenientes do melanoma invasor ligeiramente mais basófilas que as células normais. Pode ser notada ainda uma quantidade de proteínas mais intensa ao redor das células em invasão. Estes dados são compatíveis com os descritos na literatura citada.

A célula cancerosa prolifera muito, perde a capacidade de aderência, secreta enzimas que atacam a matriz extracelular, invade os tecidos vizinhos, penetra nos vasos sanguíneos e linfáticos e se espalha pelo organismo, estabelecendo-se e proliferando em locais distantes de sua origem, onde produz tumores secundários: as metástases. As células malignas secretam moléculas que estimulam o crescimento dos vasos sanguíneos capilares, promovendo uma angiogênese (Pince et al, 1997). No caso do melanoma, são considerados dois tipos de crescimento da massa tumoral: o radial e o vertical. O crescimento radial indica a tendência do melanoma a crescer de modo horizontal no interior das camadas epidérmicas e dérmicas; ocorre na maioria das lesões por um tempo que pode ser longo. Nessa fase, as células do melanoma não têm a capacidade de se metastizar. Posteriormente, o padrão de crescimento assume um componente vertical, quando o melanoma cresce para baixo, penetrando nas camadas dérmicas mais profundas na forma de uma massa em expansão, porém sem maturação celular, sem tendência das células se tornarem menores à medida que descem para a derme reticular. A probabilidade de metástases nessas lesões pode ser prevista medindo-se simplesmente, em milímetros, a profundidade de invasão desse nódulo em fase de crescimento vertical abaixo da camada de células granulares da epiderme subjacente. (Kumar et al., 2005). As alterações histológicas observadas no tecido invasor e no tecido normal podem estar relacionadas com os eventos

descritos acima. Faz-se necessária uma maior compreensão das características histológicas e histoquímicas das células tumorais *in vivo*. Isso pode levar a melhor compreensão da biologia tumoral e formas mais rápidas e eficientes de diagnóstico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BORGES, J. Melanoma, a forma mais letal da doença. *Scientific American Brasil* **15**: 49-50, 2003.
- BOSTOCK, D.E.; OWEN, L.N. *Neoplasia in the cat, dog and horse*. Holland: Wolfe Medical Publications, 1975.
- BUICK RN, TANNOCK IF. Properties of malignant cells. In: Tannock IF, Hill RP, eds, *The Basic Science of Oncology*, 2nd. edition, McGraw-Hill, New York, 139-153, 1992
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Biologia Celular e Molecular*. 7ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 10ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.. *Robins e Contran - Patología : as Bases Patológica* Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- KUMMEL, B.A. *Dermatologia de pequenos animais*. Bela Vista: Manole, 1996.
- LIOTTA, L.; PETRICOIN, E. Molecular profiling of human cancer. *Nature Genetics* **1**: 48-56, 2000.
- LISON, L. *Histochemie et Cytochemie Animales – Principes et Methodes*. Paris: Gauthier Villars, 1960.
- MELLO, M.L.S. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. *Braz J Genet* **20**: 257-64, 1997.
- PRICE JT, BONOVIK MT, KOHN EC, 1997. The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **32**: 175-253.
- SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. *Dermatologia de pequenos animais*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. 1130p.
- WILLENSE, T. *Dermatologia Clínica de Cães e Gatos: guia para diagnóstico e terapêutica*. 2. ed. Bela Vista: Manole, 1998. 143p.