

Biomicroscopia Ultrassônica – Um aliado no diagnóstico da metástase no melanoma – estudo em animais

Ultrasonic Biomicroscopy- An Ally in the diagnosis of metastasis in melanoma – study in animals

Telma Lisbôa-Nascimento¹, Carolina Batista², Almair A. Ferreira³,
Bruno L. Diaz³, João C. Machado¹

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE,
Programa de Engenharia Biomédica, Rio de Janeiro, Brasil

²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biomédicas, Rio de Janeiro, Brasil

³Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Rio de Janeiro, Brasil

Resumo

O melanoma é o tipo mais agressivo de câncer de pele. A agressividade no melanoma se caracteriza por sua capacidade metastática, e esta agressividade está diretamente relacionada ao diagnóstico tardio. A técnica utilizada neste trabalho foi a biomicroscopia ultrassônica (BMU) – ultrassom de alta frequência - com o objetivo de diagnosticar, de forma não invasiva, em tempo real, o processo de metástase das células de melanoma do tumor primário para o linfonodo sentinela (LFS), em um estudo longitudinal. Neste estudo observou-se fenômenos biológicos ao longo do tempo, como a angiogênese, migração e invasão das células de melanoma no LFS. Concluímos que a BMU pode ser uma útil ferramenta, oferecendo antes da biópsia do LFS, relevantes informações quanto à metástase, possibilitando o início precoce do tratamento, podendo aumentar significativamente a sobrevida do paciente.

Palavras-chave: melanoma, biomicroscopia ultrassônica, linfonodo sentinela, metástase, angiogênese, camundongo.

Abstract

Melanoma is the most aggressive type of skin cancer. The aggressiveness in melanoma is characterized by its metastatic capacity, and this aggression is directly related to late diagnosis. Here, we used the ultrasonic biomicroscopy (UBM) - High-frequency ultrasound, in order to diagnose in a longitudinal study non-invasively, the process of metastasis of melanoma cells of the primary tumor to the sentinel lymph node (SLN). In this study we observed biological phenomena over time, such as angiogenesis, invasion and migration of melanoma cells on SLN in real time. We conclude that the UBM can be a useful tool, offering before the biopsy SLN, relevant information on the metastasis enabling the early initiation of treatment, and can significantly increase patient survival.

Keywords: melanoma, ultrasonic biomicroscopy, sentinel lymph node, metastasis, angiogenesis, mouse.

1. Introdução

A transformação maligna das células responsáveis pela pigmentação da pele – os melanócitos dão origem ao melanoma. O melanoma é o tipo mais agressivo de câncer de pele, e embora não esteja entre os cânceres de maior incidência, é um dos cânceres com maior índice de mortalidade^{1,2,3}. A agressividade do melanoma é caracterizada por sua alta capacidade metastática, sendo que nesta fase, geralmente este câncer não responde eficazmente às estratégias terapêuticas levando o paciente a óbito em poucos meses. Outro fator importante quanto à agressividade no melanoma está na alta recorrência do diagnóstico tardio⁴.

O padrão ouro de diagnóstico no melanoma é feito através da análise clínica de uma imagem dermatoscópica do nevus (“fotografia” da lesão com aumento tal que, possibilita a visualização com clareza alcançando a epiderme) seguindo a regra ABCDE, onde A = assimetria, B = Bordas, C = Cores, D = Diâmetro, E = Evolução da lesão,

quando a mesma vem sendo acompanhada pela clínica. Constatando ser um nevus suspeito, o paciente é encaminhado à biópsia excisional (retirada total da lesão), posteriormente esta lesão é histopatologicamente analisada, e por fim, tem-se o diagnóstico e prognóstico da doença⁵. É necessário um considerável tempo da análise clínica da lesão até seu diagnóstico e prognóstico, principalmente se considerarmos o Sistema Único de Saúde (SUS), onde esse tempo é ainda maior, e esses dias, semanas ou meses podem ser muito significativos para a evolução da lesão, implicando drasticamente na eficiência das estratégias terapêuticas.

Visando esta problemática, centros de pesquisa têm empenhado seus conhecimentos para validar o uso de equipamentos de alta tecnologia no diagnóstico precoce de lesões de melanoma em espaços de tempo cada vez mais curtos, contribuindo para a rapidez do diagnóstico e início do tratamento⁶. Dentre as técnicas atualmente utilizadas para esta finalidade, destacamos a

técnica da biomicroscopia ultrassônica (BMU) que é similar a um ultrassom convencional (clínico), entretanto, utiliza altas frequências (20 – 100 MHz), é utilizado para análises superficiais como pele e olhos, alcançando resoluções próximas da microscópica panorâmica^{7,8,9}. É uma técnica que fornece informações, em tempo real, de forma não invasiva, com excelente resolução. A BMU apresenta algumas vantagens com relação as outras técnicas para diagnosticar o melanoma, como por exemplo, não ser necessário utilizar contraste para visualizar com clareza a lesão e as modificações teciduais, não utilizar radiação ionizante, ser de fácil reprodutibilidade propiciando estudos e acompanhamentos longitudinais *in vivo*, com baixo custo.

Pacientes com melanoma eram rotineiramente expostos à linfadenectomia (retirada do linfonodo sentinela próximo da lesão). Entretanto, uma considerável percentagem desses pacientes apresentava resultado negativo para metástase no linfonodo, e o efeito colateral desse procedimento gera infecções, seromas, trombose venosa, dentre outras complicações¹⁰. A biópsia do linfonodo sentinela, foi introduzida na rotina clínica como um método menos invasivo e com menos efeitos colaterais, onde, verifica-se a necessidade ou não da linfadenectomia¹⁰. Neste trabalho, propomos verificar a metástase no linfonodo sentinela, antes da realização da biópsia, através de imagens ultrassônicas de alta resolução adquiridas pela BMU, com o objetivo principal de poupar o paciente de uma biópsia desnecessária, diminuir custos e possibilitar a antecipação de um possível tratamento.

O Linfonodo sentinela (LFS), é o primeiro gânglio a receber as células cancerígenas metastáticas, e a partir do LFS, estas células geralmente, caminham por vias linfáticas ou venosas, alcançando órgãos distantes do sítio primário gerando tumores secundários, caracterizando o processo de metástase^{11,12,13,14,15}.

Neste trabalho utilizou-se a BMU, em um estudo longitudinal para acompanhar o processo metastático do sítio primário do melanoma até o linfonodo sentinela, *in vivo*.

Nossos achados confirmam que a BMU tem sensibilidade para detectar a vascularização da lesão, a angiogênese entre o tumor e o LFS, migração e invasão das células de melanoma no LFS e a vascularização dentro do LFS, e estes resultados foram comprovados com análises histológicas das lesões e linfonodos.

Assim, inferimos que a BMU pode ser uma aliada na clínica dermatológica/oncológica no diagnóstico de metástase no LFS, de forma não invasiva, em tempo real, sem expor o paciente a riscos, e podendo evitar biópsias do linfonodo desnecessárias, auxiliando na eficácia do tratamento, e consequentemente podendo aumentar a curva de sobrevida do paciente.

2. Materiais e Métodos

Este trabalho foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisas Experimentais da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob o número LABCE 0809/13.

2.1. Linhagem Celular – A linhagem de melanoma B16F10 foi cultivada em meio DMEM alta glucose (Cultilab, São Paulo, Brasil), suplementada com soro fetal bovino (10%) (Cultilab, São Paulo, Brasil) e 150 U/ml de penicilina e 120 mg/ml de estreptomicina (Gibco, Invitrogen, CA).

2.2. Animais – Camundongos da linhagem C57Bl/6 foram utilizados. Animais de 3 meses de idade foram adquiridos do Laboratório de Animais Transgênicos (BIORIO) Universidade Federal do Rio de Janeiro, e alocados no biotério do Centro Nacional de Bioimagens (CENABIO) Universidade do Rio de Janeiro, tratados com ração comum e água pura, até o final do experimento. Foi utilizado um total de 20 animais – 10 animais tratados (inoculação de 5×10^5 células B16F10); 10 animais controle (inoculação de soro fisiológico estéril).

2.3. Injeções na região sub-plantar da pata de camundongos – Para realizar as inoculações todos os animais foram anestesiados com ketamina (Packe-Davis, USA) e xilasina (Bayer, USA) em uma concentração de 200 e 100 μ l respectivamente diluído em mais 700 μ l de soro fisiológico estéril, injetando-se 30 μ l/animal. A região sub-plantar da pata esquerda dos animais foi esterilizada com álcool 98%, e em seguida realizada a inoculação de 5×10^5 células B16F10/animal diluídas em um volume de 50 μ l de soro fisiológico – grupo tratado. O grupo controle recebeu apenas 50 μ l de soro fisiológico/animal, na mesma região.

2.4. Biomicroscopia Ultrassônica (BMU) – O equipamento utilizado neste estudo foi o ultrassom de alta frequência VEVO 770 (Visual Sonics, TO, Canada), instalado no CENABIO/UFRJ, operando em modo-B, com transdutor em frequência central de 40 MHz. O sistema é composto por uma plataforma que pode ser aquecida até 37°C, onde os animais são fixados para aquisição das imagens. Uma haste fixa o transdutor na posição desejada. O sistema possui um computador que aciona o transdutor emitindo sinais elétricos que se transformam em ondas sonoras ao passar pelo transdutor que atravessam as camadas da pele. O mesmo transdutor recebe as reflexões das ondas sonoras transmitidas, transformando-as novamente em sinais elétricos que passam por sistemas eletrônicos que selecionam e filtram estes sinais enviando-os ao computador que processa e apresenta, estes sinais como uma imagem no monitor.

2.5. Estudo Longitudinal – Após inoculação todos os animais foram monitorados diariamente. E aquisições de imagens ultrassônicas das lesões na pata e no LFS foram realizadas nos dias 0 (dia da injeção), 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15. Para aquisição das imagens ultrassônicas dos LFS, foi realizada a tricotomia de todo o abdômen até a região da pata esquerda do animal, e o gel a base de água foi

utilizado como interface entre o transdutor e a pele do animal. O procedimento de tricotomia foi realizado sempre que necessário ao longo do estudo.

2.6. *Histologia* – No último dia de aquisição das imagens (15° dia), os animais foram sacrificados e as patas e linfonodos retirados e embebidos em parafina¹⁶. Foram realizados cortes de 5µm dos tecidos que foram plaqueados em lâminas para marcação com hematoxilina e eosina (H&E). As análises foram realizadas em um microscópio de fluorescência com câmera acoplada (AxioCam HCR, Axioplan, Zeiss, Germany).

3. Resultados

Na (Figura 1), mostramos a capacidade da BMU em detectar o processo de metástase do tumor primário para o linfonodo sentinela, em um estudo longitudinal. (a) Ilustração da estrutura tecidual do LFS estudado. (b) Pata com melanoma na região sub-plantar. (c) LFS com metástase. (d) Pata com soro fisiológico na região sub-plantar- controle. (e) foto do LFS controle. (f) H&E - pata com melanoma. (g) H&E- LFS com metástase. (h) H&E – pata controle. (i) H&E – LFS controle. (j) angiogênese vista a olho nu, na região entre a pata com lesão e o LFS. (k) BMU do LFS controle – *insert* da pata controle. (l) BMU do LFS no 7° dia após injeção de B16F10 – *insert* da pata. (m) BMU do LFS no 11° dia após injeção de B16F10 – *insert* da pata. (n) BMU do LFS no 15° dia após injeção de B16F10 – *insert* da pata. (o) BMU detecta novo vaso no tecido adiposo circunvizinho ao LFS. (p) BMU num plano anterior ao LFS, mostrando claramente o novo vaso. (q) H&E do LFS com metástase mostrando a angiogênese no tecido adiposo do LFS (setas verdes). (r) vasos dentro do LFS com células de melanoma dentro e ao redor do vaso (migração e invasão). (s) vaso dentro do LFS, em detalhe, apresentando células de melanoma (coloração azul escuro – setas verdes). (t) LFS com metástase apresentando grande número de células de melanoma (vermelhas) (setas verdes) (u) migração e invasão das células de melanoma no tecido adiposo, circunvizinho ao LFS (setas verdes). Aumentos das sub-figuras q,r,s,t,u são 20x, 10x, 40x, 5x, 20x respectivamente.

Neste estudo observamos que o LFS aumenta proporcionalmente com o aumento da lesão. A BMU detecta o aumento longitudinal do linfonodo. A imagem ultrassônica do interior do LFS torna-se hiperecótica demonstrando a migração, invasão e instalação das células de melanoma dentro do LFS. Nestas regiões hiperecóticas é possível observar a presença de vasos, mostrando também um processo de angiogênese. A formação de vasos foi observada também nos arredores do linfonodo e dentro dele. A histologia mostra que após invasão das células de melanoma no linfonodo, não é possível visualizar células do sistema imune que são frequentemente visualizadas neste linfonodo. Observou-se

macrófagos fagocitando restos de células mortas, possivelmente células saudáveis do sistema imune. As células de melanoma ao migrarem para a região circunvizinha ao LFS destroem o tecido e toda a matriz. As patas dos animais controle voltaram ao seu tamanho normal, após 48 horas da injeção do soro fisiológico, e seus linfonodos apresentaram tamanho e morfologia normal durante todo o estudo.

4. Discussão

O melanoma quando diagnosticado tardiamente apresenta alta capacidade metastática e resistência às terapias existentes. A relevância do diagnóstico precoce no melanoma tem ganhado a atenção de diferentes centros de tecnologia, no intuito de utilizar técnicas que auxiliem e ofereçam mais rapidez ao diagnóstico e prognóstico no melanoma⁶.

Que a BMU detecta lesões de melanoma já é sabido pela literatura^{8,9}. Entretanto, a possibilidade de utilizar esta técnica para acompanhar fenômenos biológicos longitudinalmente *in vivo* tem sido uma forma inédita de analisar a capacidade da BMU pelo nosso grupo, com resultados animadores^{17,18}.

Neste projeto, avaliou-se a capacidade da BMU em detectar o início do processo de metástase entre o tumor primário na pata dos animais até o linfonodo sentinela. Foi possível acompanhar as lesões de melanoma precocemente e sua progressão, visualizando o aumento da vascularização na massa tumoral, responsável por levar nutrientes e oxigênio para as células cancerígenas, ao passo que esses mesmos vasos servem como rota migratória para as células com capacidade metastática. Estas células percorrem a matriz extracelular, se necessário, interagem com a parede dos vasos, intravasam, sobrevivem ao trauma circulatório, não são reconhecidas pelo sistema imune circulante, extravasam, chegando até o primeiro gânglio a receber estas células – o linfonodo sentinela (LFS). Por esta razão, o LFS tem sido avaliado em casos de melanoma e em diferentes tumores sólidos com diferentes estadiamentos^{14,15}. Atualmente a linfadenectomia só é realizada mediante a positividade para metástase, após biópsia do linfonodo sentinela. Este procedimento passou a ser adotado na rotina clínica, porque uma percentagem de LFS retirados de pacientes com melanoma apresentavam negatividade para metástase. Aqui, utilizamos a tecnologia da BMU para detectar metástase no LFS antes da biópsia, no intuito de não expor o paciente desnecessariamente, diminuir custos e possibilitar o aumento do sucesso das estratégias terapêuticas.

A (Figura 1), apresenta nossos resultados onde os animais com melanoma apresentaram no 7° dia após a injeção, aumento da vascularização na lesão da pata, mas não se observou modificação significativa no linfonodo sentinela. A partir do 11° dia, foi possível observar não só um aumento do

LFS como a formação de novos vasos na região do linfonodo e também na região entre a lesão e o linfonodo. Nos dias subsequentes em que foram feitas as aquisições das imagens ultrassônicas, os animais apresentaram rápido aumento do linfonodo, destruição do tecido adiposo que

envolve o gânglio, células de melanoma e vasos dentro e circunvizinho aos linfonodos. Esses resultados ultrassônicos foram comparados e comprovados com a histologia das lesões e dos linfonodos retirados no 15º dia do estudo.

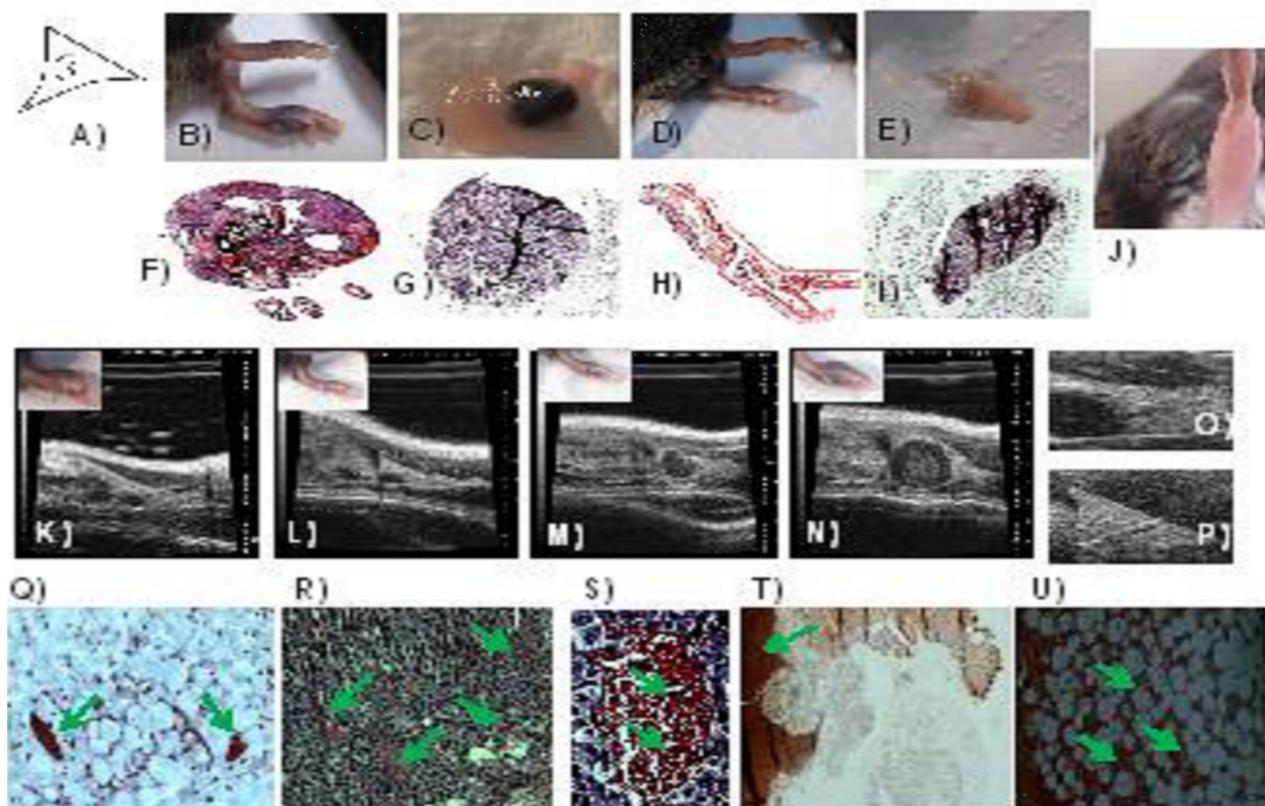


Figura 1 – Estudo longitudinal do processo de metástase através da BMU e Histologia Comparativa.

5. Conclusões

Nossos resultados nos permitem inferir que a BMU tem a capacidade de detectar o aumento da vascularização na lesão de melanoma e o início do processo de metástase destas células para o linfonodo sentinela, em tempo real, de forma não invasiva, e com isso podendo ser uma aliada no diagnóstico precoce de metástases no LFS, antes da biópsia, auxiliando no diagnóstico, prognóstico e tratamento do melanoma.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES E FAPERJ pelo apoio financeiro, e todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização dos experimentos aqui apresentados.

Referências

1. Maverakis, E., Cornelius, L.A., Bowen, G.M., Phan, T., Patel, F.B., Fitzmaurice, S. et al. Metastatic Melanoma - A Review of Current and Future Treatment Options. *Acta Derm Venereol.* 2014. doi: 10.2340/00015555-2035.
2. Sandru, A., Voinea, S., Panaitescu, E., Blidaru, A. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. *Journal of Medicine and Life.* 2014; (7):572-6.

3. Byrom, L., Olsen, C., Knight, L., Khosrotehrani, K., Green, A.C. Increased mortality for pregnancy-associated melanoma: systematic review and meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015. doi: 10.1111/jdv.12972.
4. Tsao, H., Olazagasti, J.M., Cordoro, K.M., Brewer, J.D., Taylor, S.C., Bordeaux, J.S. et al. Early detection of melanoma: Reviewing the ABCDEs. *J Am Acad Dermatol.* 2015. doi: 10.1016/j.jaad.2015.01.025.
5. Chernoff, K.A., Marghoob, A.A., Lacouture, M.E., Deng, L., Busam, K.J., Myskowski, P.L. Dermoscopic Finding in Cutaneous metastases. *JAMA Dermatol.* 2014; (4):429-33.
6. Kardynal, A., Olszewska, M. Modern non-invasions diagnostic techniques in the detection of early cutaneous melanoma. *J Dermatol Case Rep.* 2014; (1):1-8.
7. Foster, F.S., Zhang, M.Y., Zhou, Y.Q., Liu, G., Mehi, J., Cherin, E. et al. A new ultrasound instrument for in vivo microimaging of mice. *Ultrasound Med Biol.* 2002; (9):1165-72.
8. Turnbull, D.H., Ramsay, J.A., Shivji, G.S., Bloomfield, T.S., From, L., Sauder, D.N., et al. Ultrasound backscatter microscope analysis of mouse melanoma progression. *Ultrasound Med Biol.* 1996; (7):845-53.
9. Jasaitiene, D., Valiukeviciene, S., Linkeviciute, G., Raisutis, R., Jasiuniene, E., Kazys, R. Principles of high-frequency ultrasonography for investigation of skin pathology. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011; (4):375-82.
10. Phan, G.Q., Messina, J.L., Sondak, V.K., Zager, J.S. Sentinel lymph node biopsy for melanoma: indications and rationale. *Cancer Control.* 2009 Jul;16(3):234-9.

11. Pereira, E.R., Jones, D., Jung, K., Padera, T.P. The lymph node microenvironment and its role in the progression of metastatic cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2015; (38):98-105.
12. Nathanson, S.D., Shah, R., Rosso, K. Sentinel lymph node metastases in cancer: causes, detection and their role in disease progression. *Semin Cell Dev Biol.* 2015; (38):106-16.
13. Joyce, K.M., McInerney, N.M., Joyce, C.W., Jones, D.M., Hussey, A.J., Donnellan, P. et al. A review of sentinel lymph node biopsy for thin melanoma. *Ir J Med Sci.* 2015; (1):119-23.
14. Bennett, J.J. Sentinel Lymph Node Biopsy for Breast Cancer and Melanoma. 2006; (3):22-24.
15. Diller, M.L., Martin, B.M., Delman, K.A. Lymph node dissection for stage III melanoma. *Surg Oncol Clin N Am.* 2015; (2):261-77.
16. Abbas, O., Miller, D.D., Bhawan, J. Cutaneous malignant melanoma: update on diagnostic and prognostic biomarkers. *Am J Dermatopathol.* 2014; (5):363-79.
17. Peixinho, C.C., Martins, N.S., de Oliveira, L.F., Machado, J.C. Reliability of measurements of rat lateral gastrocnemius architectural parameters obtained from ultrasound biomicroscopic images. *PLoS One.* 2014; doi: 10.1371/journal.pone.0087691.
18. Petrella, L.I., Valle, H.A., Issa, P.R., Martins, C.J., Pereira, W.C., Machado, J.C. Study of cutaneous cell carcinomas ex vivo using ultrasound biomicroscopic images. *Skin Res Technol.* 2010; (4):422-7.

Contato:

Telma Lisbôa-Nascimento/Alice Teixeira Ferreira
Rua Botucatu, 862 – 2º e 7º andar – Biofísica
Vila Clementino – São Paulo – SP - Brasil

E-mail: telisnac@gmail.com