

APRECIEREA CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A LIMFANGIOGENEZEI ÎN MELANOMUL MALIGN AL FEȚEI

MIHAELA PAULA TOADER*, LAURA GHEUCĂ-SOLOVĂSTRU**, TATIANA ȚĂRANU*, ALICE
CHIRANA***, M. RAICA****

Iași*, **, ***, București****

Rezumat

Introducere. Melanomul malign este un neoplasm potential letal, cunoscut pentru tendința de metastazare precoce pe cale limfatică și hematogenă. Actualmente sunt studiați noi factori de prognostic precum vascularizația tumorală, invazia vasculară, infiltratul tumoral limfocitar, unii autori axându-se pe limfangiogenază, cu rezultate contradictorii. În acest context scopul nostru a fost aprecierea calitativă și cantitativă a limfangiogenezei în melanomul malign cu localizare facială, utilizând metode imunohistochimice pentru evidențierea endoteliului limfatic și metode morfometrice pentru evaluarea cantitativă.

Material și metode. În acest scop am examinat 14 piese de excizie biopsie reprezentând melanoame cutanate primitive avansate, stadializate după nivelul de invazie Clark (III-V). Pentru analiza imunohistochimică s-au realizat secțiuni seriate de câte 3 μm grosime. Endoteliul limfatic a fost marcat cu anticorpii monoclonali D2-40 iar secțiunile au fost examinate în microscopie optică (200X) pentru aprecierea calitativă a limfangiogenezei. Evaluarea morfometrică s-a realizat utilizând programul NIS-Elements.

Rezultate. Vasele limfatice peritumorale au fost în general vase dilatate, cu pereți subțiri, neregulați dispuse mai ales în zonele cu infiltrat inflamator peritumoral sau în septuri conjunctive penetrând nodulii tumorali. Limfaticile intratumorale au fost mai mici, cu aspect neregulat și pereți groși, unele cu lumen îngust sau colabă. Densitatea limfovasculară a fost semnificativ mai mare în regiunile peritumorale. Aria limfovasculară relativă (aria limfovasculară / aria totală a câmpului examinat X100) a fost ușor mai mare în regiunile peritumorale.

Concluzii. Evaluarea limfangiogenezei prin determinarea densității limfovasculare, a ariei vaselor limfatice și a ariei limfovasculare relative în melanomul malign cutanat se poate dovedi utilă în aprecierea progresiei tumorale. Sunt necesare studii suplimentare care să statueze limfangiogeneza ca factor de prognostic incontestabil.

Cuvinte cheie: melanom malign, limfangiogenază, imunohistochimie, morfometrie.

Summary

Background. Cutaneous malignant melanoma is a potentially lethal neoplasm known to metastasize via lymphatic and blood vessels. New potential prognostic factors such as: tumor vascularity, vascular invasion and tumor-infiltrating lymphocytes are yet insufficiently studied. Thus, some authors focused on lymphangiogenesis in malignant melanoma of the skin and results were contradictory. In this context, the aim of our study was to qualitatively and quantitatively assess the lymphangiogenesis in cutaneous melanoma of the face, using immunohistochemical methods to emphasize the lymphatic endothelium and a computer software for the quantitative evaluation.

Material and methods. We examined 14 formalin-fixed, paraffin-embedded excision pieces of cutaneous malignant melanoma of the face. All cases were advanced primary melanomas, with an anatomical level of invasion (Clark) between III and V. Serial sections of 3 μm thickness were prepared for immunohistochemical analysis. Lymphatic vessels were marked with D2-40 murin monoclonal antibody and examined in optic microscopy (x200) for qualitative assessment. Morphometric evaluation was made using NIS-Elements software.

Results. Peritumoral lymphatic vessels were generally dilated with a thin, irregular wall and were mainly found inside the inflammatory infiltrate, next to the tumor, or in connective septa penetrating tumoral nodules. Intratumoral lymphatics were smaller, with an irregular aspect and prominent walls, some of them with very small or even collapsed lumen. Lymphatic vessel density (LVD) was significantly higher in peritumoral areas. The relative lymphatic area (lymphatic area divided by total area of the examined field x 100) was slightly higher in peritumoral regions.

Conclusions. Evaluation of lymphangiogenesis by determination of lymphatic vessel density, average and relative lymphatic area in cutaneous malignant melanoma may prove to be a useful tool for the assessment of melanoma progression. Further research is needed in order to clearly establish these parameters as strong prognostic indicators.

Key words: malignant melanoma, lymphangiogenesis, immunohistochemistry, morphometry.

DermatoVenerol. (Buc.), 55: 7-12

* , ** , U.M.F. „Grigore T. Popa” Iași, Facultatea de Medicină Dentară, Disciplina Dermatologie.

*** Spitalul Clinic de Recuperare Iași, Laboratorul de Anatomie Patologică.

**** U.M.F. „Victor Babeș” Timișoara, Disciplina de Histologie.

Introducere

Melanomul malign cutanat este un neoplasm comun și frecvent letal, cu o incidență în creștere în Statele Unite după raportul SEER 17 (Surveillance, Epidemiology and End Results). Un procent de 10-20% dintre toate melanoamele se dezvoltă la nivelul capului și gâtului, majoritatea dintre acestea, la nivelul feței (47%).[1]

Melanomul malign cutanat este cunoscut pentru tendința de metastazare precoce pe cale hematogenă, dar mai ales limfatică. Progresia tumorală constă dintr-o serie de evenimente prin care celulele normale se transformă în celule tumorale metastatice. Evenimentele cruciale includ abilitatea tumorii de a crește, de a traversa barierele mecanice și moleculare ale invaziei, de a evita supravegherea imună și de a disemina [2]. Fazele precoce ale acestei progresii necesită proliferarea tumorală și formarea de noi canale vasculare pentru a furniza nutrimente și o cale de „evadare” din sediul primar. În melanom, angiogeneza asociată tumorii apare în faza radială de creștere (fără competență metastatică), având drept rezultat dezvoltarea fazei verticale de creștere cu competență metastatică și un prognostic clinic defavorabil.

Factorii de prognostic utilizați actualmente pentru melanoamele cutanate primitive sunt reprezentați de indicele Breslow, nivelul de invazie Clark, ulcerarea și diseminarea ganglionară. Totuși valoarea prognostică a indicelui Breslow este limitată deoarece un număr important de pacienți cu melanoame cu indice Breslow mic decedea din cauza metastazelor la distanță, pe când o parte dintre cei cu melanoame avansate, în faza de creștere verticală supraviețuiesc timp îndelungat fără dezvoltarea metastazelor [3]. De aceea studii recente se axează pe cercetarea altor posibili factori prognostici precum vascularizația tumorală, invazia limfo-vasculară și infiltratul limfocitar tumoral. Limfangiogeneza tumorală a fost puțin studiată, iar rezultatele din literatură sunt contradictorii: unii autori au raportat o corelație pozitivă între densitatea limfovasculară și prognosticul infaust [3, 5, 6, 7, 8], alții au descoperit o scădere a densității limfovasculare în melanoamele nodulare avansate, cu indice Breslow mai mare de 4 mm [4] sugerând o corelație inversă între LVD și progresia tumorală.

Diferențele se datorează probabil metodelor diferite de evaluare calitativă și cantitativă a limfangiogenezei.

În acest context studiul nostru s-a axat pe evaluarea limfangiogenezei în melanomul malign cutanat utilizând pentru aprecierea calitativă a vaselor limfatice un anticorp monoclonal D2-40 care reacționează specific cu un epitop rezistent la fixare de pe endoteliul limfatic. Evaluarea cantitativă a fost realizată utilizând un program de software care măsoară automat numărul de vase, aria limfovasculară și aria relativă limfovasculară (raportul procentual dintre aria vaselor limfatice și aria totală a câmpului examinat), metodă cu grad de obiectivitate ridicat.

Material și metode

Studiul a fost realizat pe un lot de 14 piese de excizie-biopsie reprezentând melanoame cutanate ale feței. Țesuturile au fost fixate în formaldehidă neutră tamponată și incluse în parafină. S-au realizat secțiuni seriate de câte 3 μm pentru colorația de rutină cu hematoxilină-eozină în vederea diagnosticului morfologic și stadializării.

Evidențierea vaselor limfatice a fost realizată utilizând anticorpul monoclonal recent descoperit, D2-40 (Dako Gastrup Denmark). Pentru studiul imunohistochimic s-au realizat secțiuni de 3 μm care au fost deparafinate prin imersie în băi succesive de benzen și etanol. Pentru blocarea peroxidazei endogene secțiunile au fost tratate cu peroxid de hidrogen 3% în apă distilată timp de 5 minute la temperatura camerei. Ulterior au fost încălzite la microunde în tampon citrat (pH 6) timp de 30 minute pentru demascarea antigenului. După incubare cu anticorpul la temperatura camerei timp de 30 minute am aplicat sistemul de lucru LSAB (Labelled Streptavidin-Biotin). Vizualizarea anticorpilor legați de endoteliul limfatic s-a realizat utilizând 3-3' diaminobenzidină (culoare brună). Pentru colorarea nucleilor s-a utilizat hematoxilina Lillie modificată. Toate lamele au fost procesate automat utilizând Dako Cytomation Autostainer, apoi examinate la microscopul optic Nikon Eclipse E600 (x200).

Studiul morfometric s-a realizat cu ajutorul programului NIS-Elements care folosește imaginea digitală preluată de la microscopul Nikon Eclipse E 600 cu ajutorul camerei digitale

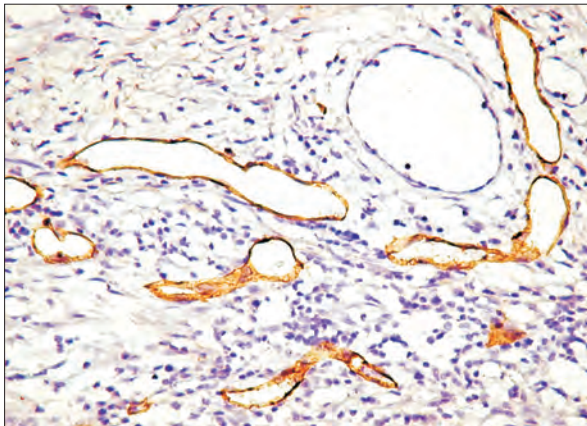


Fig. 1. Col. IHC 20x
M.M. nodular acromic, Clark IV – peritumoral, vase limfatice D2-40+ alături de vase sanguine

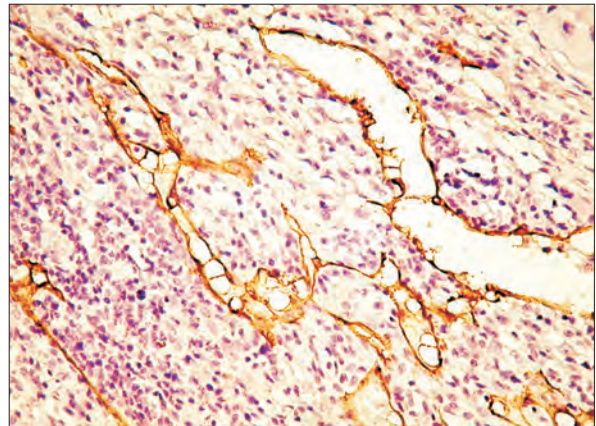


Fig. 2. Col. IHC 20x
M.M. nodular, Clark IV – vase limfatice D2-40+ dispuse la baza tumorii

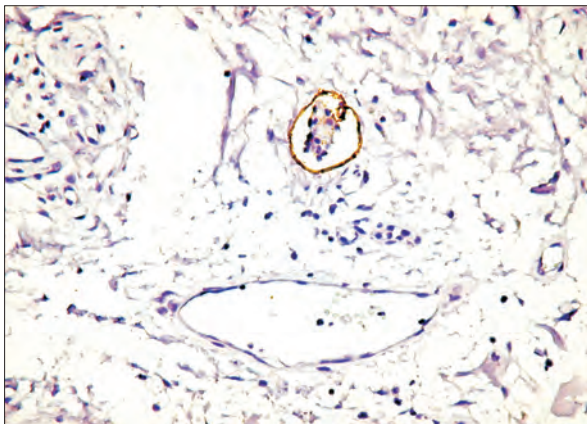


Fig. 3. Col. IHC 20x
M.M. cutanat – peritumoral, vas limfatic D2-40+ cu limfocite în lumen

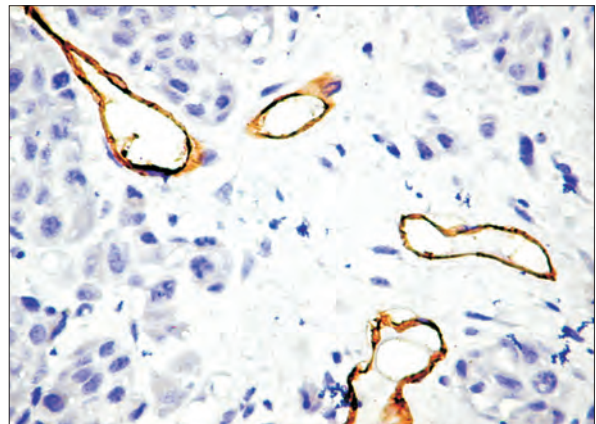


Fig. 4. Col. IHC 20x
M.M. nodular, Clark IV – vase limfatice D2-40+ dispuse la baza maselor tumorale

atașate. După marcarea manuală a structurilor de măsurat (endoteliul limfatic colorat în brun), au fost măsurate automat numărul de vase limfatice/câmp, ariile limfovaskulare (softul recunoaște automat magnificația și transformă aria măsurată efectiv în pixeli² în m²), precum și raportul dintre aria limfovaskulară și aria totală a câmpului examinat, după metoda "hot spot". Au fost examinate 3 câmpuri diferite pentru fiecare caz și pentru fiecare regiune (intratumorală, respectiv peritumorală) și au fost notate rezultatele medii.

Rezultate

Lotul de studiu a inclus 8 pacienți de sex masculin și 6 pacienți de sex feminin, cu vârste cuprinse între 38 și 85 ani, cu o mediană de 71.78

ani. Cele 14 cazuri au fost melanoame cutanate în stadiul de creștere verticală, clasificate după nivelul de invazie Clark astfel: Clark V (2 cazuri), Clark IV (6 cazuri) și Clark III (6 cazuri).

Studiul calitativ al limfangiogenezei

Peritumoral, vasele limfatice evidențiate prin pozitivare la D2-40 (colorare brună a endoteliului) au prezentat perete subțire, neregulat, în general cu lumene dilatate (Fig. 1, 2) dispuse în plin proces inflamator alături de vasele de sânge D2-40 negative (Fig. 1). În majoritatea cazurilor, numărul vaselor limfatice a fost mai mic decât a celor sanguine cu prezența de limfocite în lumen (Fig. 3). Vasele limfatice se distribuie relativ aproape de masele tumorale (Fig. 4), în septurile conjunctive ce despart nodulii tumorali, prezentând dimensiuni variate cu pereți neregulați (Fig. 5, 6).

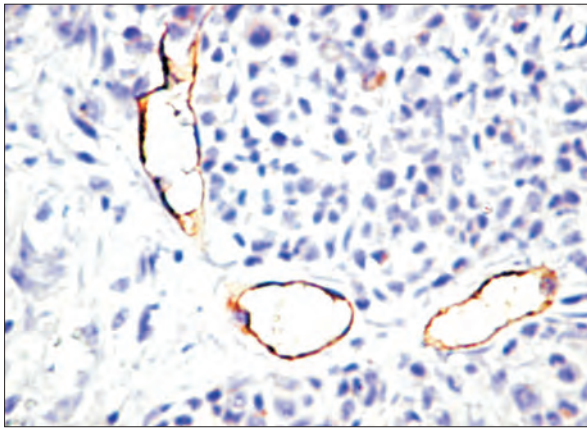


Fig. 5. Col. IHC 20x
M.M. nodular, Clark V – vase limfatice D2-40+ dispuse în septuri

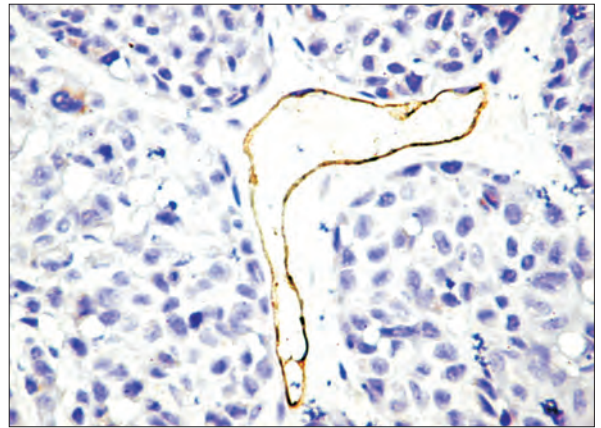


Fig. 6. Col. IHC 20x
M.M. nodular, Clark V – vas limfatic D2-40+ cu aspect neregulat

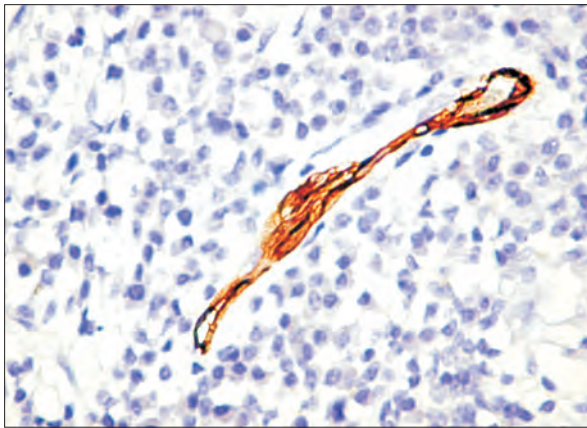


Fig. 7. Col. IHC 20x
M.M. cutanat, Clark IV – vas limfatic D2-40+ intratumoral

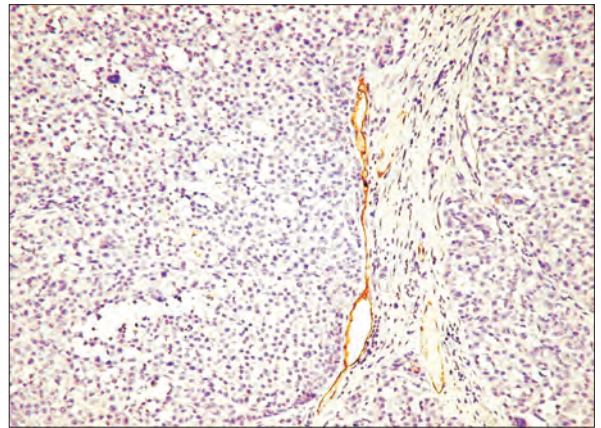


Fig. 8. Col. IHC 10x
M.M. nodular, Clark III – vase limfatice D2-40+ dispuse la marginea nodulilor tumorali

Intratumorale vasele limfatice sunt mici, neregulate cu pereți proeminenți și lumen îngust sau chiar colabat (Fig. 7, 10). Numărul vaselor limfatice intratumoral este mai mic decât a celor dispuse peritumoral, majoritatea fiind localizate la marginea nodulilor tumorali (Fig. 8) sau printre insulele tumorale (Fig. 9), rar în plină masă tumorală, printre celulele tumorale (Fig. 10).

Studiul morfometric

Valorile medii ale densității vaselor limfatice (LVD) și valorile medii ale ariilor sunt redată în tabelul nr. 1 și grafic în figura nr. 11.

Densitatea limfovaculară a fost semnificativ mai crescută în regiunile peritumorale (8.4 vase/câmp) comparativ cu cele intratumorale (3.86 vase/câmp).

Valoarea medie a ariei ocupată de vasele limfatice a fost mai mare în zonele peritumorale (9.76 m²) comparativ cu cele intratumorale (7.43 m²) în corelație cu raportul dintre aria limfovaculară și aria totală a câmpului examinat 6.22% peritumoral comparativ cu 4.33% intratumoral.

Rezultate

Aprecierea morfologiei și funcției vascularizației intratumorale este importantă în strategiile de diagnostic și tratament în numeroase tipuri de tumori maligne, melanomul malign fiind una din tumorile solide în care analiza neovascularizației atât cantitativ cât și

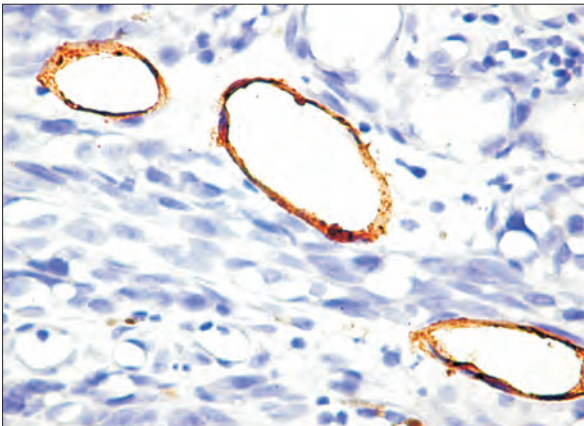


Fig. 9. Col. IHC 20x
M.M. cutant, Clark III – limfatice D2-40+ printre insule de celule tumorale

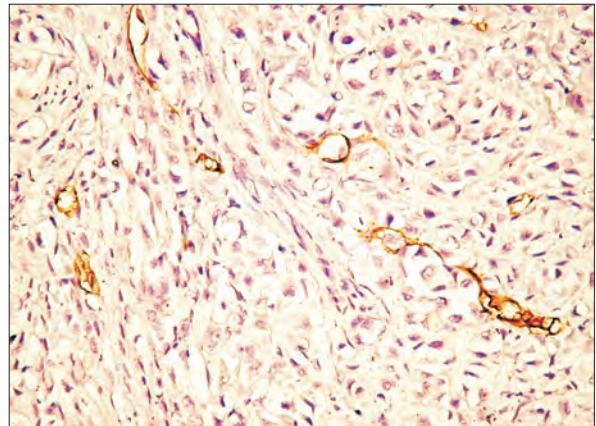


Fig. 10. Col. IHC 20x
M.M. cutanat, Clark IV – vase limfatice D2-40+ dispuse intratumoral

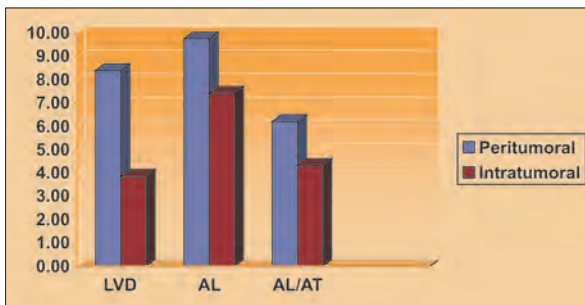


Fig. 11. Reprezentarea grafică a valorii medii a LVD și ariilor limfovaskulare medii și relative

Tabel I. Valoarea medie a densității limfovaskulare și a ariilor

	Densitatea limfovaskulară	Aria vasculară limfatică (AL) (μm^2)	Aria vasculară limfatică (AL) / Aria totală a câmpului (AT) (%)
Peritumoral	8,4	9,76	6,22
Intratumoral	3,86	7,43	4,33

calitativ poate constitui un ajutor în evaluarea prognosticului dar și a aplicării noilor metode terapeutice țintite (substanțe antagonice factorilor angiogenici).

Studiile din literatură privind densitatea limfovaskulară în melanomul malign cutanat arată rezultate contradictorii. Astfel, în 2003 Straume și colab. au realizat un studiu pe 175 cazuri de melanoame agresive, nodulare în faza de creștere verticală în care LVD crescută s-a corelat cu o rată de supraviețuire superioară. De asemenea, autorii au găsit o corelație semnificativă între LVD și infiltratul limfocitar

peritumoral, sugerând o relație între LVD și răspunsul imun antitumoral al gazdei (4). Pe de altă parte, în 2004 Valencak și colab. au studiat 120 melanoame și au descoperit o corelație între creșterea LVD și un prognostic infaust [5]. Dadras și colab. [3], Shields și colab. [6] au avut rezultate similare studiind melanoame metastatice comparativ cu melanoame nonmetastatice. Astfel, LVD a fost mai mare în lotul de melanoame metastatice, deși, LVD avea tendința de a descrește odată cu creșterea grosimii tumorii. Vamos și colab. [7], Massi și colab. [8] au ajuns la concluzia că limfangiogeneza în melanomul malign reprezintă un factor de predicție pentru dezvoltarea metastazelor ganglionare. Rezultatele studiilor pe animale de experiență sugerează faptul că o creștere a limfangiogenezei poate avea relevanță pentru frecvența crescută a metastazelor ganglionare [9].

Studiul nostru a relevat prezența vaselor limfatice cu lumene dilatate și perete subțire, neregulat în ariile peritumorale, precum și limfatice mai mici, neregulate, cu endoteliu proeminent în ariile intratumorale în 14 cazuri de melanom malign agresiv al feței cu un nivel de invazie Clark cuprins între III și V. Densitatea limfovaskulară s-a corelat cu aria limfatică, precum și cu aria procentuală a vaselor limfatice în zonele peritumorale, respectiv intratumorale la cazurile studiate. Rezultatele noastre completează datele din literatură [3, 5, 6, 7, 8], utilizând metode diferite de marcarea endoteliului vascular și de apreciere cantitativă a limfangiogenezei.

Concluzii

Melanomul malign este una din neoplaziile care prezintă o rată mare de curabilitate dacă este detectat în stadii precoce deși, într-un mic procentaj, melanomul precoce poate progresa înainte de a fi detectat. Din păcate, eficacitatea tratamentului în stadiile tardive este foarte limitată, ceea ce necesită investigații aprofundate pentru strategii terapeutice efective. Cercetările privind procesele moleculare ce controlează progresia melanomului reprezintă cheia reducerii impactului acestei maladii, dezvoltarea neo-vascularizației, atât sanguine, cât și limfatice, fiind o parte esențială a tumorogenezei multistadiale. Până în acest moment nu există studii suficiente de numeroase care să statueze ca markeri incontestabili de prognostic LVD, aria limfatică și aria procentuală limfatică.

Intrat în redacție: 4.12.2009

Bibliografie

1. Ries L A G, Eisner M P, Kosarz CL, et. al., eds. SEER Cancer statistics Review, 1975+2002. *National Cancer Institute*: Bethesda, Md. based on November 2004 SEER data submission, posted to the SEER website 2005. Available at <http://seer.cancer.gov>.
2. Dirk J Ruiters, Meenhard H – Melanoma-stroma interactions and melanoma progression, *J. der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 2003, vol. 1(10): 773-6.
3. Dadras S S, Paul T, Bertocini J, Brown L F, Muzikansky A, Jackson D G, Ellwanger U, Garbe C, Mihm M C, Detmar M – Tumor lymphangiogenesis. A novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival – *Am J Pathol*, 2003, 162: 1951-60.
4. Straume O, Jackson D G, Akslen L A – Independent prognostic impact of lymphatic vessel density and presence of low-grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma, *Clin. Cancer Res.*, 2003, 9: 250.
5. Valencak J, Heere-Ress E, Kopp T, Schoppmann S F, Kittler H, Pehamberger H – Selective immunohistochemical staining shows significant prognostic influence of lymphatic and blood vessels in patients with malignant melanoma, *Eur. J. Cancer*, 2004, 40: 358-364.
6. Shields J D, Borsetti M, Rigby H, Harper S J, Mortimer P S, Levick J R, Orlando A, Bates D O – Lymphatic density and metastatic spread in human malignant melanoma, *Br. J. Cancer*, 2004, 90: 693-700.
7. Ferenc Renyi-Vamos, Jozsef Tovari, Janos Fillinger, Jozsef Timar, Sandor Paku, Istvan Kenessey, Gyula Ostoros, Laszlo Agocs, Ibolya Soltesz, Balazs Dome - Lymphangiogenesis Correlates with Lymph Node Metastasis, Prognosis, and Angiogenic Phenotype in Human Non-Small Cell Lung Cancer, *Clinical Cancer Research October 15, 2005 11, 7344*.
8. D Massi, S Puig, A Franchi, J Malvehy, S Vidal-Sicart, M González-Cao, G Baroni, S Ketabchi, J Palou, M Santucci – Tumour lymphangiogenesis is a possible predictor of sentinel lymph node status in cutaneous melanoma: a case-control study, *Journal of Clinical Pathology* 2006;59:166-173.
9. Stacker S A, Caesar C, Baldwin M E, Thornton G E, Williams R A, Prevo R, Jackson D G, Nishikawa S, Kubo H, Achen M G – VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics, *Nat. Med.*, 2001, 7: 186-191.

Adresă de corespondență:

Toader Mihaela Paula
Sp. Cl. Univ. C. F. Iași, Str. G. Ibrăileanu nr. 1
E-mail: toaderpaula@gmail.com
Tel: 0722 61 51 21