

ESTUDIO DEL GANGLIO CENTINELA

DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DEL MELANOMA MALIGNO CUTANEO, ESTADIOS I Y II*

VALERIA DENNINGHOFF¹, JORGE FALCO², H. PABLO CURUTCHET², BORIS ELSNER¹¹Servicio de Patología, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas (CEMIC); ²División de Cirugía Oncológica, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Resumen La sobrevida a cinco años de los casos con melanoma maligno primario localizado es de aproximadamente un 80%, comparada con un 35% cuando los ganglios están comprometidos. Se estudió el/los ganglio/s centinela/s mediante hematoxilina-eosina (HE), inmunohistoquímica (IHQ) y biología molecular (BM) de individuos con diagnóstico de melanoma maligno estadio I o II. La población se dividió en tres grupos: HE-/IHQ+/BM+: 67% fallecieron; HE-/IHQ-/BM+: 57% fallecieron y HE-/IHQ-/BM-: el 100% de los individuos viven sin linfadenectomía, con una mediana de seguimiento de 60 meses. Los individuos que mostraron negatividad con los tres métodos tuvieron un índice de recurrencia nulo. Los datos de este estudio sugieren una nueva estadificación oncológica a nivel molecular que permitiría seleccionar a los individuos que presenten metástasis submicroscópicas para un tratamiento completo, pero también evitar linfadenectomías en muchos individuos que no tienen metástasis ganglionares, permitiendo que éstos no sufran sobretratamiento.

Palabras clave: melanoma maligno cutáneo, ganglio centinela, tirosinasa

Abstract *Study of the sentinel lymph node. Diagnosis and treatment of cutaneous malignant melanoma stages I and II.* Survival at 5 years of patients with localized primary malignant melanoma is about 80%, compared with a 35% survival in case of lymph nodes involvement. Sentinel lymph node(s) from 45 subjects with diagnosis of malignant melanoma stage I or II was/were studied with hematoxylin-eosin (HE), immunohistochemistry (IHC) and molecular biology (MB) techniques. The population was divided into three groups: HE-/IHC+/MB+, where 67% patients died; HE-/IHC-/MB+, where 57% died; and HE-/IHC-/MB-, where 100% of the patients are alive, with no lymphadenectomy and a median follow-up of 60 months. Those subjects who showed negativity with all the three methods had a null recurrence rate. Data herein obtained suggest a new molecular oncological staging, which would allow the selection of patients with submicroscopic metastases for a complete treatment. Moreover, several patients with no lymph node metastases should not undergo lymphadenectomies, and overtreatment could therefore be avoided.

Key words: malignant cutaneous melanoma, sentinel lymph node, tyrosinase

En los últimos años se ha incrementado progresivamente el interés acerca del melanoma maligno (MM), un tipo altamente agresivo y potencialmente letal de cáncer de piel. Entre un 85 y un 90 % de los individuos con MM se presentan en estadios tempranos y curables¹. Su incidencia va en aumento en gran número de países. La sobrevida a cinco años de los casos con melanomas primarios localizados recientemente diagnosticados (AJCC estadios I y II) es de aproximadamente un 80%, comparada con un 35% de sobrevida cuando los ganglios linfáticos están comprometidos (AJCC estadio III). Cuando

existen metástasis a distancia la sobrevida a cinco años desciende al 10%^{2,3}. En estos casos, el tratamiento convencional de los individuos con metástasis linfática consiste en la extirpación del tumor primario y en la disección ganglionar o linfadenectomía. Por lo tanto, el diagnóstico precoz y la detección de micrometástasis ganglionar son esenciales para la curación del melanoma.

Entre agosto de 1994 y abril de 2004, fueron estudiados en forma prospectiva los ganglios centinelas de individuos con melanoma maligno cutáneo. La población estudio de nuestro trabajo quedó constituida por individuos que cumplían con los siguientes criterios de inclusión: porción de GC fijado en formol e incluido en parafina para estudio histopatológico, porción de GC criopreservado para estudio molecular, que fuese amplificable (GAPD positivo) y diagnóstico de la lesión primaria de

*Este trabajo fue distinguido con el Premio Cossio en la reunión anual de la SAIC (Sociedad Argentina de Investigación Clínica) en Mar del Plata, noviembre 2005.

melanoma maligno estadio I o II, con un seguimiento mayor a 2 años. Como controles positivos se incluyeron en el estudio: una biopsia de piel con diagnóstico de melanoma maligno cutáneo, un ganglio con metástasis masiva de melanoma, siete ganglios centinelas correspondientes a individuos con metástasis de melanoma maligno cutáneo, estadio III (positividad histológica), un ganglio centinela correspondiente a individuo con metástasis de melanoma maligno cutáneo amelanótico, estadio III (positividad histológica). Como controles negativos se incluyeron en el estudio: un ganglio linfático con diagnóstico de hiperplasia linfoide (individuo sin melanoma), tres ganglios centinelas correspondientes a individuos con melanoma maligno cutáneo estadio II que histológicamente tenían células dendríticas y filetes positivos con S-100, un ganglio centinela correspondiente a individuo con melanoma maligno cutáneo estadio II con una imagen histológica que presentaba células névicas intracapsulares, dos biopsias de nervio.

Para determinar la existencia de micrometástasis se identificó en forma preoperatoria (por linfocentelografía) e intraoperatoria el primer ganglio del drenaje del melanoma (ganglio centinela). Se extirpó y evaluó anatomopatológicamente. Una lonja central del ganglio linfático, representando un tercio de la muestra aproximadamente, fue conservada en nitrógeno líquido. El material restante se fijó con formol e incluyó en parafina. Se realizó el estudio anatomopatológico mediante cortes seriados para hematoxilina-eosina (HE) e inmunohistoquímica (IHQ) para la proteína S-100 y HMB-45, a partir del material fijado e incluido⁴ y se estudió mediante técnicas de biología molecular (BM) el material criopreservado, sometiéndolo a una Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa (RT-PCR) anidada (*nested*) para la tirosinasa como marcador molecular de micrometástasis⁵.

Con BM fueron positivos 22.2% de los GC examinados. En todas las muestras se obtuvo material amplificable (RT-PCR *nested* de la GAPDH). Todos los controles dieron los resultados esperados. De estos datos se desprende una división poblacional en tres grupos. En el grupo 1 (HE-/IHQ+/BM+) 67% individuos fallecieron. En el segundo grupo (HE-/IHQ-/BM+) 57% individuos fallecieron. La totalidad de los pacientes que conforman el último grupo (HE-/IHQ-/BM-) viven sin vaciamiento ganglionar con una mediana de seguimiento de 60 meses. Se calcularon los indicadores estadísticos para las técnicas utilizadas en los individuos que no sufrieron vaciamiento ganglionar, para poder correlacionar con el fallecimiento de los mismos como *gold standard*. Para la IHQ fueron: sensibilidad (Sens): 0.33; especificidad (Esp): 1.00; tasa de falsos positivos (TFP): 0.00; tasa de falsos negativos (TFN): 0.67; exactitud (Ex): 0.90; valor predictivo positivo (VPP): 1.00; valor predictivo negativo

(VPN): 0.9. Para la RT-PCR *nested* fueron: Sens: 1.00; Esp: 0.97; TFP: 0.03; TFN: 0.00; Ex: 0.98; VPP: 0.86; VPN: 1.00 y *Likelihood Ratio Positive* (LRP): 33, que determina el incremento en la probabilidad de morir de un individuo si el test es positivo para la RT-PCR *nested* TYR. La sobrevida global estimada a 60 meses es de 33% para el grupo 1 (HE-IHQ+PCR+), 43% para el grupo 2 (HE-IHQ-PCR+) y 100% para el grupo 3 (HE-IHQ-PCR-) como se puede observar en la curva de sobrevida. Los resultados de seguimiento definieron tres poblaciones: 1) individuos fallecidos, 2) individuos que viven con linfadenectomía terapéutica y 3) individuos que viven sin linfadenectomía terapéutica. El número de individuos fallecidos decrece a medida que se van negativizando las determinaciones que pueden realizarse en un GC. Por el contrario, el número de individuos vivos sin linfadenectomía aumenta. La sobrevida de los individuos que no sufrieron vaciamiento ganglionar confirma esta división poblacional, con un índice de *Fisher's exact* = 0.000.

El predictor más importante de sobrevida del melanoma y otros tumores sólidos es el *status* tumoral de los ganglios linfáticos regionales^{5, 6}. Cuando aparecen metástasis ganglionares, los factores pronóstico basados en el tumor primario poco ayudan para predecir la recurrencia o la sobrevida. Como la detección de micrometástasis es un factor pronóstico que influye sobre la terapéutica (linfadenectomía) y el pronóstico de la enfermedad, es de fundamental importancia la optimización de los métodos de pesquisa de micrometástasis para la disminución de la incidencia de falsos negativos⁷. En un trabajo previo hemos postulado que los GC con RT-PCR *nested* positiva representan en la mayoría de los casos un verdadero depósito metastásico y que la aplicación de la RT-PCR permitiría detectar metástasis submicroscópicas⁸. En esta nueva serie de individuos y con este seguimiento, demostramos el impacto epi-demiológico del estudio incompleto de un GC en individuos con melanoma maligno cutáneo estadios I y II. Si un GC se estudia solo con HE, el 14% de los individuos estarían subtratados, ya que no serían sometidos a un vaciamiento ganglionar y tendrían una mayor probabilidad de recurrencias y una menor sobrevida global. En cambio, si el GC se estudia con HE e IHQ el porcentaje de individuos subdiagnosticados desciende al 10%. Pero si se estudia el GC con HE, IHQ y técnicas moleculares se optimiza la estadificación de tumores sólidos con patrón de diseminación ganglionar, y se direcciona el tratamiento para que sean operados solamente individuos con metástasis ganglionares comprobadas.

En conclusión, la utilización de HE e IHQ conjuntamente aumenta en forma significativa la sensibilidad del estudio y mejora el asesoramiento sobre el pronóstico de sobrevida global. El agregado de técnicas de BM es

de gran utilidad para la detección de micrometástasis en ganglios centinela en individuos con MM, optimizando la estadificación y el tratamiento de los individuos con estadio I y II. La técnica RT-PCR *nested* desarrollada para la tirosinasa es específica y sensible. El uso de la IHQ aumenta la sensibilidad en un 19% con respecto al método convencional, y la RT-PCR *nested* la aumenta en un 33%. En nuestra serie, los individuos que mostraron negatividad con los tres métodos tuvieron un índice de recurrencia nulo, por lo tanto esta triple negatividad podría ser considerada como un factor pronóstico positivo para la sobrevida global. De allí la importancia clínica y terapéutica de determinar la más mínima infiltración microscópica en los ganglios regionales. Dado el tiempo de seguimiento y la cantidad de individuos, los datos de este estudio sugieren la modificación de la estadificación y por ende del tratamiento. Esta nueva estadificación oncológica a nivel molecular permitiría seleccionar a los individuos que presenten metástasis submicroscópicas para un tratamiento completo (vaciamiento ganglionar y una eventual terapéutica adyuvante), pero también evitar linfadenectomías en individuos que no tienen metástasis ganglionares, evitando sobretratamiento.

Bibliografía

1. Cochran AJ, Wen DR, Morton DL. Management of the regional lymph nodes in patients with cutaneous malignant melanoma. *Word J Surg* 1992;16:214-21.
2. Elder D, Elenitas R. Lesiones pigmentadas benignas y melanoma maligno. En: Elder D, Elenitas R, Jaworsky C, Johnson B(h). *Lever's Histopatología de la piel*. 8ª ed. Buenos Aires: Editorial Inter Médica, 1999, pp 549-94.
3. Milton GW, Shaw HM, McCarthy WH, Pearson L, Balch CM, Soong SJ. Prophylactic lymph node dissection in clinical stage I cutaneous malignant melanoma: results of surgical treatment in 1319 patients. *Br J Surg* 1982; 69: 108-11.
4. Ioachim HL. Metastatic Melanoma. En: Ioachim HL. *Lymph node pathology*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott 1994, pp 674-81.
5. Reintgen D, Shivers S. Sentinel lymph node micrometástasis from melanoma. Proven methodology and evolving significance. *Cancer* 1999; 86: 551-2.
6. Messina JL, Glass LF, Cruse CW, Berman C, Ku, NK, Reintgen DS. Pathologic examination of the sentinel lymph node in malignant melanoma. *J Am Surg Pathol* 1999; 23: 686-90.
7. Timar J, Csuka O, Orosz Z, Jeney A, Kopper L. Molecular Pathology of tumour metastasis. *Pathol Oncol Res* 2002; 8: 204-19.
8. Denninghoff V, Kahn A, Falco J, Curutchet HP, Elser B. Sentinel lymph node: detection of micrometastases of melanoma. A molecular study. *Mol Diag* 2005; 8: 253-8.

En esta ocasión* ocurrió una circunstancia que prueba la certeza de bañarse las mugeres en seguida de parir, costumbre de que tanto se ha escrito y aun se dudaba. A los dos días de la llegada de los Indios parió una de las mugeres, y en seguida fue inmediatamente al río, acompañada de dos mugeres de la misma tribu se metió en el agua con el recién nacido y permaneció bastante tiempo: á los pocos días después partió con todos los demás para su tierra, completamente restablecida. El zeloso padre Julián no quiso perder la oportunidad de arrancar el alma del chiquillo de las "garras de Satanás", y empleando una piadosa estratagema lo tomó como para enseñarlo á los compañeros, y lo bautizó en el cuarto del general, del cual alcanzó fuese su padrino.

John Miller

**Conferencia del General San Martín con los Indios Pehuenches, Fuerte San Carlos (Mendoza), septiembre de 1816.*

Memorias del General Miller [William (Guillermo) Miller, 1795-1861]. Escritas por John Miller (1829).

Traducidas al castellano por el General Torrijos. 2ª Ed. Buenos Aires: Emecé, 1997, p 124, Gráfica original conservada.