

ASOCIACIÓN DE CATEPSINA D CON FACTORES PRONÓSTICOS EN MELANOMA MALIGNO

ALFREDO JOSÉ BORGES GARNICA, WILMER RAMOS, RICARDO GONZÁLEZ, ISMAEL VEGAS, EDUARDO CALEIRAS

SERVICIO DE TUMORES MIXTOS, INSTITUTO DE ONCOLOGÍA DR. MIGUEL PÉREZ CARREÑO, VALENCIA, VENEZUELA

RESUMEN

OBJETIVOS: Determinar la asociación de la catepsina D, como factor pronóstico inmunohistoquímico, para mejorar nuestro arsenal terapéutico. **MÉTODOS:** Se revisaron las historias clínicas de 23 pacientes con diagnóstico de melanoma, tratados en el Instituto de Oncología Dr. Miguel Pérez Carreño, en el lapso comprendido de enero de 1998 y diciembre de 2001, a los cuales, se les realizó la determinación de catepsina D en los bloques de parafina de las biopsias realizadas. **RESULTADOS:** El procedimiento de marcaje inmunohistoquímico de catepsina D se realizó en 23 pacientes según la técnica de revelado con aminoetilcarbazol. Se relacionaron los resultados con la presencia de factores pronósticos. Los pacientes con inmunomarcajes 41,17 % son Clark IV, 41,17 % Breslow > 3 mm, 70,58 % presentaron ulceración, 52,94 % eran estadio III. **CONCLUSIONES:** Se evidenció un paralelismo entre los factores histológicos y el inmunomarcaje con catepsina D, pero se debe determinar la evolución natural de aquellos pacientes en estadios iniciales para poder determinar su valor como factor pronóstico.

PALABRAS CLAVE: Melanoma, catepsina D, inmunohistoquímica, factores pronósticos.

SUMMARY

OBJECTIVES: To determine the association of cathepsin D, like immunohistochemical prognosis factor, in order to improve our therapeutic arsenal. **METHODS:** We reviewed the clinical histories of 23 patients with diagnosis of malignant melanoma treated in the Instituto de Oncología Dr. Miguel Perez Carreño, in the lapse of January of 1998 and December of 2001, to which, the determination of cathepsin D was made in the paraffin blocks of the made biopsies. **RESULTS:** The immunohistochemical mark procedure with cathepsin D was made in 23 patients according to the revealed technique of aminoethylcarbazol. The results were related to the presence of factors prognoses. The patients with positive immunemarked 41.17 % are Clark IV, 41.17 % Breslow > 3 mm, 70.58 % presented ulceration, 52.94 % were stage III. **CONCLUSIONS:** A parallelism between the histological factors and the immunemarked with cathepsin D was demonstrated, but the natural evolution of those patients in initial stages is due to determine to be able to determine its value like factor prognosis.

KEY WORDS: Melanoma, cathepsin D, immunohistochemistry, prognostic factors.

INTRODUCCIÓN

Melanoma es una forma muy importante de cáncer de la piel. Comienza en los melanocitos, las células que hacen que la piel adquiera su color o pigmento (melanina). Aunque el melanoma conforma solamente cerca de 4 % de todos los tipos de

Recibido: 12/07/2004 Revisado: 19/11/2004

Aceptado para Publicación: 10/12/2004

Correspondencia: Dr. Alfredo Borges
Servicio de Tumores Mixtos, Instituto De Oncología
Dr. Miguel Pérez Carreño, Valencia, Venezuela
Tel: (241) 859.6669 - E-mail: alfborges@cantv.net

cáncer de la piel, causa la mayoría de las muertes relacionadas con cáncer dérmico ⁽¹⁾.

Cuando el melanoma comienza en la piel, se llama melanoma cutáneo. El melanoma puede también ocurrir en el ojo, mucosas y raramente en otras áreas que carezcan de melanocitos, por ejemplo la zona digestiva, las meninges y ganglios linfáticos. Cuando el melanoma metastiza, sus células se encontrarán en los ganglios linfáticos y posiblemente también, otras partes del cuerpo, tales como el hígado, pulmones o cerebro. En estos casos, las células del cáncer son células móviles del melanoma, y la enfermedad se llama melanoma metastásico ⁽²⁾.

En hombres, el melanoma se encuentra generalmente en el área entre los hombros y las caderas o en la cabeza y el cuello. En mujeres, el melanoma se ubica a menudo en las piernas. Puede también aparecer debajo de las uñas del dedo del pie o en las palmas. El riesgo de sufrir de melanoma aumenta con la edad, pero afecta a todas las categorías de edad y es uno de los cánceres más comunes de los adultos jóvenes ⁽³⁾.

El número de los melanomas nuevos diagnosticados en los EE.UU está aumentando. El Instituto Nacional del Cáncer estima que cerca de 51 400 melanomas nuevos serán diagnosticados en los EE.UU durante 2002. Cerca de 7 800 muertes de la estadística del cáncer serán atribuidas al melanoma maligno en 2002 ⁽⁴⁾.

Existen muchas clasificaciones sobre factores pronósticos basados en localización, edad, aspectos microscópicos, etc. La clasificación de la profundidad hacia adentro de la piel o clasificación de Breslow es una de las que tiene mejor correlación con el pronóstico. El melanoma debe detectarse tempranamente, cuando hay mayores probabilidades de ser curado completamente. La mayoría de los cánceres de la piel pueden prevenirse. Las estrategias preventivas pueden lograr una mayor reducción

del número de casos de cáncer de la piel, aliviar el dolor y disminuir el número de muertes debido a esta enfermedad. Esto implica instruir al público acerca de los factores de riesgo del cáncer de la piel ⁽⁵⁾.

Es importante que los profesionales de la salud y los sobrevivientes de esta enfermedad les recuerden a las demás personas el peligro que representa la exposición excesiva a los rayos solares, así como, lo fácil que puede ser protegerse la piel de la radiación ultravioleta. Los autoexámenes mensuales y, el estar atento a las señales de advertencia de los melanomas, podría ser útil para detectar esta enfermedad en una etapa inicial curable ⁽⁵⁾.

MÉTODOS

El presente trabajo es de carácter retrospectivo, prospectivo. Se llevó a cabo en el Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño" en la ciudad de Valencia, en el lapso comprendido de enero de 1998 y diciembre de 2001.

Se realizó una revisión de las historias clínicas de los pacientes ingresados con diagnóstico de melanoma maligno entre enero de 1998 y diciembre de 2001.

El procedimiento de marcaje inmunohistoquímico de catepsina D se realizó en aquellos pacientes y bloques de parafina que cumplieran los criterios de inclusión y según la técnica de revelado con aminoetilcarbazol. Dicha técnica presentó la ventaja de utilizar un colorante que resalta las células melanocíticas, del resto de las células, facilitando la lectura de los resultados.

Las muestras histológicas se encontraron en forma de bloques de parafina, en el archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Instituto de Oncología "Dr. Miguel Pérez Carreño". Los bloques fueron desparafinados e hidratados con agua destilada. Se realizaron 3 secciones de las

muestras con un espesor de 3 a 4 micras los cuales se colocaron en solución recuperadora de antígenos por treinta minutos a una temperatura de 95° C. Posteriormente son lavados con buffer y bloqueados con peróxido de hidrógeno al 3 %. Se colocó el anticuerpo primario durante 12 horas. Posteriormente se colocó el anticuerpo secundario (biotina) por 10 minutos. Se colocó la estreptovidina por 10 minutos y luego se reveló con aminoetilcarbazol y se montó con geltol.

Se contó con el apoyo de la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital Metropolitano del Norte.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente bajo el ambiente de Windows XP® y el programa estadístico de Excel®, utilizando los parámetros de Chi cuadrado de Pearson para la corroboración de correlaciones.

RESULTADOS

Para la realización de este trabajo se obtuvo de la población, una muestra correspondiente de 23 pacientes, según los criterios de inclusión, y a los cuales, se les realizó el procedimiento de determinación de catepsina D de los bloques de parafina de sus biopsias. Al observar el inmunomarcaje se determinó que 6 pacientes, correspondiente a un 26,1 % del total de los mismos, no presentaron inmunomarcaje. Los 17 pacientes restantes, el 73,9 %, sí presentó algún grado de inmunomarcaje, distribuyéndose en 17,4 % para los +, un 26 % para los ++, y un 30,4 % para los +++.

Al relacionar el inmunomarcaje con la distribución etaria, se evidencia que aquellos pacientes con un inmunomarcaje negativo, presentaron una distribución que osciló entre 16,7 % y 33,3 % en los diferentes grupos. En cuanto a los pacientes con inmunomarcaje positivo, la mayor proporción se encontró en aquellos pacientes ubicados en rango etario de

41-50 años con 35,2 %, seguido del grupo de 51-70 años con 29,4 % y el grupo de >70 años con un 23,5 % ($P > 0,05$).

De acuerdo con la distribución y relación del inmunomarcaje con el sexo, se observó que el 83,3 % de los pacientes con inmunomarcaje negativo correspondieron al sexo femenino, mientras que el inmunomarcaje positivo no presentó una tendencia marcada, donde el sexo masculino predominó con un 52,9 % con respecto al sexo femenino con un 47,0 % ($P > 0,05$).

En ambas series de resultados de los pacientes del estudio se evidencia que la raza negra predomina sobre la raza blanca, con un 66,7 % en los pacientes con inmunomarcaje negativo y 58,8 % en los pacientes con inmunomarcaje positivo. No encontramos en el universo de estudio otras razas a evaluar ($P > 0,05$).

De acuerdo al volumen tumoral y el inmunomarcaje, se encontró que la distribución de pacientes con inmunomarcaje negativo, se presentó de manera uniforme con un 16,7 % a excepción de los pacientes con volúmenes entre 1 mm³- 5 mm³ (33,3 %) y 16 mm³- 20 mm³ (0 %).

En los pacientes catepsina D positivos se encontró una incidencia en meseta entre los volúmenes de 1 mm³ a 20 mm³, oscilando las frecuencias de 17,6 % a 23,5 %. Estas relaciones no fueron estadísticamente significativas ($P = 0,056$).

De acuerdo con los resultados obtenidos, el inmunomarcaje positivo presentó una incidencia mayor en todos los niveles de Breslow, y a medida que progresaban los niveles de profundidad de Breslow, esta tendencia aumentaba.

Es así que, el mayor promedio se ubicó en los pacientes con un nivel de Breslow mayor de 3 mm con un 77,7 %, seguidos del nivel 1,6 mm - 3 mm con un 71,4 %. Esta relación fue estadísticamente significativa ($P = 0,0097$).

Se evidenció durante los resultados del

trabajo que el inmunomarcaje positivo se presentó en un 70,5 % de los pacientes cuyas biopsias de melanoma presentaron ulceración en sus reportes histológicos.

En contraste con los pacientes con catepsina D negativo presentaron una distribución homogénea con un 50 % para la presencia o ausencia de ulceración. Las relaciones fueron estadísticamente significativas ($P=0,0073$).

Se evidenció para el grupo de pacientes con biopsias positivas para el inmunomarcaje de catepsina D, que la mayor incidencia se encontró en estadios avanzados, donde el estadio III alcanzó un 90 % ($P=0,0086$).

En los estadios iniciales, no se demostró diferencia significativa con respecto al inmunomarcaje, siendo ambas distribuciones simétricas.

DISCUSIÓN

Se analizaron en nuestro estudio 23 pacientes con diagnóstico de melanoma maligno ingresados en el Instituto de Oncología Dr. Miguel Pérez Carreño, según los criterios de inclusión.

Se determinaron las variables pronósticas de acuerdo con criterios epidemiológicos, clínicos e histológicos. Se utilizó una ficha epidemiológica basada en datos recolectados en la historia clínica y el estadiaje clínico basado en los criterios de la *American Joint Committee on Cancer* ⁽⁶⁾.

Se revisaron los bloques de parafina de las biopsias de cada paciente, las cuales se encontraban almacenadas en el archivo del servicio de anatomía patológica del Instituto y se les realizó el procedimiento de determinación inmunohistoquímica del marcador catepsina D.

La determinación de inmunorreacción evidenció que el 73,9 % de los pacientes fueron positivos a la reacción. Las lesiones melano-cíticas presentan una actividad proteásica

aumentada, por lo que el inmunomarcaje con catepsina D, el cual, es un marcador de actividad proteolítica, debe estar aumentado, tal como lo demostraron Frölich y col. ⁽⁷⁾.

Muchos autores han determinado que la edad es un factor de mal pronóstico en melanomas malignos, sobre todo, basado en la correlación existente entre mayor edad y mayor grosor ⁽⁵⁾. Levine y col. determinaron que pacientes de mayor edad presentan melanomas más gruesos y estos a su vez presentan mayor poder de invasión y necrosis ⁽⁸⁾. Al relacionar la reacción de catepsina D observamos que la mayor incidencia de inmunorreacción la presentaron aquellos pacientes mayores de 50 años, los cuales en sumatoria presentaron un 88 % de reacción.

Mangus y col., en su trabajo de factores de riesgo, en 1977, concluyeron que no existe un cambio determinante en el riesgo de acuerdo al sexo en pacientes con melanoma ⁽⁵⁾. En el presente trabajo tampoco se evidenció una diferencia significativa del inmunomarcaje con catepsina D de acuerdo al sexo.

A pesar de que la raza caucásica representa el mayor porcentaje en incidencia de melanoma, se encontró en este trabajo como resultado que la raza negra representó la de mayor frecuencia en incidencia y en cuanto a inmunorreacción. Es de notar que existe una importante variabilidad en la incidencia de acuerdo con la ubicación geográfica, así como, las diferencias fenotípicas de las distintas razas y su proceso de mestizaje ⁽⁹⁾.

No existió una variabilidad significativa de acuerdo al volumen tumoral y la positividad de la inmunorreacción. A pesar de que el volumen tumoral representa un importante factor pronóstico Friedman y col. ⁽⁵⁾, refieren que el volumen tumoral es un predictor más importante que el mismo espesor tumoral. Buttner y col. ⁽¹⁰⁾, determinaron que lesiones superiores a 200 μm presentaron una peor sobrevida con respecto a los de lesiones menores.

Desde el momento que se inicia la micro-invasión tumoral en los melanomas malignos, la actividad proteolítica es determinante como factor coadyuvante en el poder de invasión, infiltración e incluso de producir metástasis. Es así que, numerosos autores han tratado de establecer una relación directa entre la invasión tumoral y el pronóstico del melanoma ⁽⁷⁾.

Gracias a estos postulados y a criterios de funcionalismo histológico, Clark y col. ⁽¹¹⁾, estableció niveles pronósticos basados en la invasión a los diferentes estratos de la piel. Breslow ⁽¹²⁾, a su vez, correlacionó el espesor tumoral con el pronóstico basado en una clasificación en milímetros, donde a mayor profundidad de invasión peor es el pronóstico. Aun cuando ambos estudios establecen correlaciones lineales, al evaluar estudios multifactoriales determinamos que tal curso no siempre es constante ⁽¹³⁾. Algunas lesiones con niveles precoces de invasión presentan lesiones metastásicas al momento del diagnóstico. Es aquí donde la agresividad proteolítica juega un papel en las lesiones melánicas. Al evaluar los resultados observamos que la inmunorreacción con catepsina D fue más importante en aquellos pacientes con niveles de Breslow y Clark avanzados y, prácticamente fue inexistente en niveles precoces, esta relación fue estadísticamente significativa. Faltaría evaluar a través del tiempo el comportamiento biológico de esas lesiones iniciales que presentaron inmunomarcaje positivo.

Los pacientes con melanomas malignos con ulceración, presentaron un mayor inmunomarcaje. Es conocido que la ulceración es uno

de los signos de alarma del melanoma maligno al ensombrecer el pronóstico ^(5,14).

El estadio clínico es el consenso multifactorial para lograr establecer una clasificación uniforme para el melanoma maligno. Esta clasificación, basada en espesor tumoral, presencia de compromiso ganglionar regional y de enfermedad a distancia, permite al clínico establecer un pronóstico global de la enfermedad y traduce una variabilidad en el comportamiento biológico del melanoma, es decir, un menor o mayor potencial de invasión y diseminación de la enfermedad. En este trabajo se obtuvo que existía una fuerte relación entre el inmunomarcaje y el estadio, donde a mayor estadio clínico, el mayor era el índice de inmunomarcaje, traduciendo este resultado, el mayor potencial proteolítico, infiltrativo de estas lesiones.

Frölich y col. ⁽⁷⁾, concluyeron que la actividad de la catepsina D, dependiendo del grosor de la lesión como parte del estadio, es regulada por diferentes mecanismos, y es el gen regulador de la transcripción de la catepsina un indicador de la mayor agresividad de las células tumorales.

En conclusión parece existir una relación positiva entre inmunomarcaje y los factores histológicos, así como del estadio clínico, aun cuando no se realizó el análisis independiente de todos los elementos que conforman el estadiaje clínico según la AJCC.

No se determinó la evolución natural del melanoma en aquellos pacientes en etapas iniciales de la enfermedad, por lo que el valor como factor pronóstico de la catepsina D, a pesar de los resultados, está por determinarse.

REFERENCIAS

1. Reintgen D, Glass F, Fenske N, Cruse CW, Rapaport D, Messina J, et al. Clinical Practice Guidelines for Melanoma. *Cancer Control*. 1997;4(1):45-52.
2. Sober AJ, Fitzpatrick TB, Mihm MC Jr. Primary melanoma of the skin: Recognition and management. *J Am Acad Dermatol*. 1980;2(3):179-197.

3. Gonzáles Baron M, Ordóñez O, Paredes M, Battle L. Factores pronósticos en oncología. Editorial Mc Graw Hill. Interamericana. 1994:305-320.
4. Garbe C, Buttner P, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, et al. Primary cutaneous melanoma. Prognostic classification of anatomic location. *Cancer*. 1995;75(10):2492-2498.
5. Friedman RJ, Rigel DS, Silverman MK, Kopf AW, Vossaert KA. Malignant melanoma in the 1990s: The continued importance of early detection and the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J Clin*. 1991;41(4):201-226.
6. American Joint Committee on Cancer. Manual for Staging of Cancer. Malignant melanoma of the skin. J.B. Lippincott Co. 1993:155-160.
7. Frohlich E, Schlagenhauff B, Mohrle M, Weber E, Klessen C, Rassner G. Activity, expression, and transcription rate of the cathepsins B, D, H, and L in cutaneous malignant melanoma. *Cancer*. 2001;91(5):972-982.
8. Garbe C. A rational approach to the follow-up of melanoma patients. *Recent Results Cancer Res*. 2002;160:205-215.
9. Andersson AP, Gottlieb J, Drzewiecki KT, Hou-Jensen K, Sondergaard K. Skin melanoma of the head and neck. Prognostic factors and recurrence-free survival in 512 patients. *Cancer*. 1992;69(5):1153-1156.
10. Buttner P, Garbe C, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, et al. Primary cutaneous melanoma. Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of Clark's level for prognostic classification. *Cancer*. 1995;75(10):2499-2506.
11. Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res*. 1969;29(3):705-736.
12. Breslow, A. Prognostic factors in the treatment of cutaneous melanoma. *J Cutan Pathol*. 1979;6(3):208-212.
13. Lew RA, Koh HK, Sober AJ. Epidemiology of cutaneous melanoma. *Dermatol Clin*. 1985;3(2):257-269.
14. Ryan L, Kramar A, Borden E. Prognostic factors in metastatic melanoma. *Cancer*. 1993;71(10):2995-3005.