

INFILTRAT LIMFOCITAR INTRATUMORAL (TIL): FACTOR PROGNOSTIC AL MELANOMULUI MALIGN

Emőke HORVÁTH¹, Z. PÁVAI¹, Liliana CHIRAI¹, M. TURCU¹, Réka DÓSA², E.-E. NAGY³

1 - UMF Tg. Mureș, Disciplina de Morfopatologie, 2 - Spital Clinic Județean Fogolyán Kristóf Sfântu-Gheorghe, Clinica de Dermatologie și Venerologie, 3 - UMF Tg. Mureș, Disciplina de Biochimie Farmaceutică

Rezumat

Melanomul malign poate fi privit ca și prototipul tumorilor pentru care se dezvoltă strategii bazate pe imunologie pentru identificarea antigenelor tumorale.

Prezența infiltratului limfocitar intratumoral (TIL), fenomen frecvent întâlnit în structura tumorii, presupune o reacție imună antitumorală din partea organismului imunocompetent. Cantitatea infiltratului inflamator prezintă corelație cu rata de supraviețuire. Acest răspuns este de obicei evaluat în faza de creștere verticală a tumorii și este categorizată ca fiind prezent sau absent.

Prezentăm un număr de 24 cazuri de melanom cutanat primar. Din care am efectuat reacții imunohistochimice pentru antigenele LCA, CD8, CD4 CD56, Granzyme B și APAF1 (marker al apoptozei).

Evaluările histopatologice au fost făcute de doi anatomopatologi în mod independent. S-au evaluat infiltratele ca și fiind de densitate mare, medie sau joasă. De asemenea au fost evaluate factorii clinici și morfologici (vârsta, localizarea, stadiul Clark, grosimea tumorii).

Evaluarea TIL poate fi de folos în selectarea pacienților cu melanom cu potențial de răspuns terapeutic crescut la modulatori biologici, deoarece TIL poate fi un efector local imun sensibil la IFN alfa-2 sau alți agenți biologici.

Cuvinte cheie: antigeni de melanom, infiltrat limfocitar intratumoral (TIL)

Summary

Melanoma has served as the prototype cancer from which immune-based strategies have been evolved to identify tumor antigens. Primary cutaneous melanoma is often infiltrated lymphocytes that provide the opportunity to study what may be local immunologic reaction to the tumor and to correlate the presence of these lymphocytes with overall survival this response is usually measured by the level of intratumoral lymphocytic infiltrate (TIL) present at the base of the vertical growth phase of tumor and is categorized as present or absent.

We present a number of 24 cases of primary cutaneous melanoma.

Immunohistochemical demonstrations of LCA, CD8, CD4 CD56, Granzyme B and APAF1 (apoptosis marker) were performed. The results were derived from independent histopathologic reviews by two pathologists. We interpreted the high-density, moderate-density and low-density groups of cells that infiltrated the tumor tissue. Clinical variables (age, tumor location, Clark level and thickness) also were analysed.

The intratumoral lymphocytic infiltrate evaluation may prove useful in selecting melanoma patients who will best respond to therapy with biologic response modifiers, because the TILs may be the local immune effector cell targets of IFN alpha-2 or of other biologic agents.

Key words: melanoma antigens, tumor-infiltrating lymphocytes (TIL)

Introducere

Frecvența melanoamelor maligne este în creștere pe plan mondial și caracterizează vârsta medie și înaintată, incidența maximă fiind între 40-50 ani.

Formele anatomoclinice sunt reprezentate în funcție de tendința de creștere a tumorii. Melanoamele în fază de creștere radială (melanomul cu extindere superficială, lentigo malign, melanomul acral lentiginos) sunt leziuni care se dezvoltă lent, de-a lungul joncțiunii dermo-epidermale, putând interesa și dermul papilar, care ulterior se transformă în creștere verticală, și încep să formeze noduli expansiv intradermice. Entitatea clinică numită melanom malign nodular corespunde unui melanom cu fază de creștere verticală, în absența unei leziuni precursorare maculare. Profunzimea și grosimea invaziei au semnificație prognostică majoră, fiind completate de o serie de alți factori clinici și histopatologici.

Material și metodă

În Laboratorul de Anatomie Patologică a Spitalului Clinic Județean de Urgență Tg. Mureș am cercetat prezența infiltratului limfocitar intratumoral (TIL) cu evidențierea expresiei imunohistochimice a antigenelor caracteristice, prezența TIL-ului fiind considerat un factor de prognostic favorabil în evoluția melanoamelor maligne. Pe baza buletinelor histopatologice am introdus toate datele clinice și histologice în fișe de lucru, completând aceste date cu rezultatele examinărilor imunohistochimice. Prelucrarea statistică a datelor am efectuat cu Programul Statistica 5.0 prin corelarea expresiei TIL cu alți factori prognostici: indicele Breslow, nivelul Clark, prezența ulcerăției, dimensiunea tumorii.

Leziunile cutanate provin din cazuistica Clinicii de Dermatovenerologie și Venerologie sfântu-Gheorghe, diagnosticate ca tumori melanocitare

maligne pe baza examenului dermatoscopic (cu scor dermatoscopic peste 4,7 conform regulei ABCD după Stolz).

Expresia imunohistochimică a TIL-lui a fost studiată prin folosirea unui panel complex de anticorpi: LCA, CD4, CD8, CD56, Granzyme B și

APAF1 (marker al apoptozei). Secțiunile examinate am etalat pe lame silanizate, urmată de incubarea cu anticorpi mono-și policlonali (Tabel 1) și cu sistemul de amplificare En Vision. Pentru evidențierea produsului de reacție am folosit cromogenul diaminobenzidină.(DAB).

Tabelul 1

Denumirea și caracteristicile anticorpului primar	Sursa	Demascarea antigenului	Localizarea antigenului	Control pozitiv
CD4 (NCL-CD4-368) Clone: 4B12	NOVOCASTRA (UK) Diluție: 1/20	Soluție tampon EDTA pH 8,0,	Imunomarcaj membrana celulelor	Tonsilă
CD8 (NCL-CD8-295) Clone: 1A5	NOVOCASTRA (UK) Diluție: 1/40	Soluție tampon citrat 0,01M pH 6,0,	Imunomarcaj membrana celulelor	Tonsilă
Granzyme B (NCL-GRAN-B-295) Clone: 11F1	NOVOCASTRA (UK) Diluție: 1/75	Soluție tampon citrat 0,01M pH 6,0	Imunomarcaj citoplasmatic de aspect granular	Limfom Hodgkin/tonsilă
Apoptosis Protease Activating Factor 1 (NCL-APAF1) Clone: 4B12	NOVOCASTRA (UK) Diluție: 1/40	Soluție tampon citrat 0,01M pH 6,0	Imunomarcaj citoplasmatic	Miocard/piele
CD56 (NCL-CD56-504) Clone: CD564	NOVOCASTRA (UK) Diluție: 1/75	Soluție tampon citrat 0,01M pH 6,0	Imunomarcaj citoplasmatic	Intestin subțire
Mo A Hu Melanosome Clone HMB45	DAKO (Danemarca) Diluție: 1/50	Soluție tampon citrat 0,01M pH 6,0,	Expresie la nivelul citoplasmului celulelor tumorale	Melanom malign

Interpretarea preparatului colorat imunohistochimic (cuantificarea reacțiilor) am făcut comparativ, raportând la rezultatele obținute pe controlul pozitiv extern, precum pe controlul negativ a reacției. Cuantificarea reacțiilor au fost efectuate de doi patologii experimentați prin menționarea semicuantitativă a expresiei, ea fiind notată ca prezentă (expresie abundentă, moderată) sau absentă (expresie slabă sau celule LCA pozitive absente).

Rezultate

În studiul nostru incidența maximă a melanoamelor maligne a fost găsită la grupa de vârstă de 60-70 ani, vârsta medie fiind 62,7 ani cu deviație standardă de 12.8.

Diagnosticul histopatologic a confirmat 8 cazuri de melanoame cu extindere superficială (SSM) și 16 melanoame nodulare, 58,32% (14 cazuri) cu nivel Clark 4 și 5, în 56, 32% a cazurilor cu prezența ulcerăției epidermului.

Imunoreacția pentru LCA a fost pozitivă în 16 cazuri (66,66%) dintre cele 24 melanoame maligne investigate. Dintre aceste cazuri 4 a prezentat coexpresia CD4 și CD8 (CD4+/CD8+), în 12

cazuri am găsit imunomarcaj discordant în expresia CD8 și CD4: 8 cazuri cu expresie Th (CD4-/CD8+), 4 cazuri cu expresia Th (CD4+/CD8-). Cele 13 cazuri (54,17%) CD8 pozitive s-au asociat cu expresia Granzyme B, iar în 8 cazuri am găsit coexpresie CD8 și CD56 (29,17%) .Nu am găsit corelație statistic semnificativ între intensitatea expresiei LCA și subtipul histopatologic al tumorii (SSM/melanom nodular), între indicele Breslow, nivelul Clark ($p>0,05$) și între intensitatea expresiei TIL-lui și faza de creștere a melanomului. Expresia APAPF1a a prezentat corelație cu intensitatea expresiei LCA ($p=0,02$ -test Pearson C).

Discuții

Teoria supravegherii imune a cancerului lansată în 1960 de Burnett reprezintă o adevărată piatră de hotar în imunologia tumorală. Conform acestei teorii, imunitatea mediată celular, de către limfocitele T joacă un rol esențial în controlul dezvoltării tumorilor. Noile descoperiri au demonstrat că nu numai limfocitele T citotoxice (Tc) au rol în imunitatea antitumorală. Existența celulelor spontan ucigașe nespecifice (NK), mecanismele citotoxicității-de distrugere a celulelor

(prin necroză sau apoptoză), moleculele ce intervin în comunicarea intercelulară –receptorii pentru factorii de creștere sau molecule de adeziune celulară (CAM)-, împreună formează o advărată rețea cu rol protector împotriva extinderii procesului tumoral Lazar-Molnar (2000). Ineficiența acestui mecanism în cazul organismului imunocompetent se explică prin existența mecanismelor de scăpare ale tumorilor de sub controlul imun datorită sactivării suboptimale a celulelor tumorale Georgiu (2005).

În cazul melanoamelor maligne antigenele tumorale cele mai importante (Melan-A/MART-1, gp-100/pmel17, tirozinaza, TRP-1/-2, MC1R (Melanocortin-1 Receptor) și polipeptida P sunt cele de linaj, Balica &Lazăr (2005), care reprezintă antigenele de diferențiere, cu specificitate de țesut, care pot să fie specifice tumorii sau doar asociate tumorii (fiind prezente și pe țesuturile normale corespunzătoare) Szekeres &Battyanyi (2003). Imunitatea intensă față de aceste antigene poate provoca regresia tumorii și apariția unui vitiligo autoimun, acest din urmă fenomen fiind considerat un marker surogat pentru un prognostic mai bun Georgiu (2005).

Limfocitele Th CD8, componentă importantă a TIL-lui după unii autori are valoare prognostică independentă, fiind factor de prognostic favorabil potențat de expresia CD56., deoarece prin mecanismele citotoxicității-de distrugere a celulelor (prin necroză sau apoptoză), moleculele ce intervin în comunicarea intercelulară –receptorii pentru factorii de creștere sau molecule de adeziune celulară (CAM)-, împreună formează o advărată rețea cu rol protector împotriva extinderii procesului tumoral Balch et al. (1980&2001). Ineficiența acestui mecanism în cazul organismului imunocompetent se explică prin existența mecanismelor de scăpare ale tumorilor de sub controlul imun Georgiu (2005).. 29,17% a lotului examinat a reprezentat o categorie considerată cu prognostic relativ favorabil (coexpresia CD8 cu CD56), dar acest rezultat trebuie interpretat în oglinda factorilor prognostici clasici. În cazul interesării nodulilor limfatici regionali și prezenței metastazei la distanță, valoarea prognostică pozitivă este pus sub semnul întrebării. Expresia APAPF1 la nivelul celulelor tumorale indică prezența mecanismului apoptotic al morții celulare.

Pentru a interpreta valoarea prognostică a prezenței TIL în melanoame maligne aceasta trebuie analizată separat în cazurile cu creștere radială și cea verticală. În faza de creștere radială, în general apare un infiltrat limfocitar marcat, care poate rezulta regresia parțială a melanomului Yee et al. (2000). Conform datelor din literatură în faza de

creștere verticală există de asemenea un răspuns imun, dar nu atât de pronunțat ca în faza de creștere radială. Elder și colab. caracterizează aceste limfocite ca fiind tumorinfiltrative (TIL) sau neinfiltrative Elder &Murphy (1991). În cazul TIL-lui limfocitele și celulele NK infiltrază leziunea, ele pătrunzându-se printre celulele tumorale, și se extind între ele și formează rozete în jurul celulelor individuale la nivelul cărora apar câteodată și semne degenerative. În cazul celor neinfiltrative infiltratul limfocitar se localizează în jurul tumorii. Corelație pozitivă între supraviețuire și prezența infiltratului limfocitar există doar în cazul TIL-lui Ryan (1993), Balch (2001).

Analizele statistice efectuate pe un număr mare de pacienți au arătat în cazul melanoamelor cu creștere verticală o supraviețuire de 77%, respectiv 55% referitoare la 5, respectiv 10 ani în cazurile cu TIL abundent, aceste valori scăzând la 53%, respectiv 43% în cazurile cu infiltrat moderat. În absența TIL-lui supraviețuirea scade la 37%, respectiv 27% Homsí et al. (2005).

În mod paradoxal. în unele studii, regresia parțială este corelată cu prezența metastazelor în cazul SSM. Elder și colab. (1991) presupun că regresia are un rol permisiv în generarea fazei de creștere verticală obliterând faza de creștere radială, nerecunoașterea antigenelor de celulele antitumorale din faza de creștere verticală, astfel prezența regresiei în faza de creștere radială prezentând o corelație negativă cu rata de supraviețuire Orosz (2003).

Concluzii

Stabilirea factorilor de prognostic reprezintă un moment esențial în terapia melanoamelor maligne. Imuncolorarea permite tipizarea elementelor celulare care intră în componența TIL-lui, predominanța CD8 versus CD4 având semnificație prognostică favorabilă. Trebuie însă menționată faptul că metodele imunohistochimice au o utilitate deosebită în diagnosticul și prognosticul unor cazuri selecționate de melanom malign, dar din păcate însă, markerii utilizați în imunohistochimie nu permit diferențierea tumorilor benigne de cele maligne. Malignitatea trebuie întotdeauna determinată utilizând criteriile morfologice.

Nu am găsit corelație statistic significant între intensitatea expresiei LCA și subtipul histopatologic al tumorii (SSM/melanom nodular), între indicele Breslow, nivelul Clark ($p>0,05$) și între intensitatea expresiei TIL-lui și faza de creștere a melanomului.

Expresia APAPF1a fost significant în cazul tumorilor cu expresie LCA intensă ($p=0,02$ -test Pearson C). Scăderea ratei de apoptoză în celulele

tumorale din melanoame aflate în faza de creștere verticală, asociată cu absența TIL poate fi considerat factor de prognostic nefavorabil.

Integrând aceste rezultate obținute printre factori de prognostic clasici studiate la acest lot de pacienți, în cadrul studiului nostru prospectiv pot fi identificați pacienții cu risc crescut la apariția precoce a metastazelor (TIL absent) și un grup cu prognostic favorabil, unde îngrijirea bolnavilor poate fi lărgită cu imunoterapie.

Bibliografie

1. Balch, C.M, Wilkerson, J.A., Murad, T.M. et al. 1980. The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma. *Cancer* 45 3012-3017.
2. Balch, C.M., Buzaid, A.C., Soong, S.J., et al. 2001. Final Version of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Cutaneous Melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 19(16) 3635-3648.
3. Balica, S., Lazăr, E. 2005. Rolul markerilor imunohistochimici în diagnosticul și aprecierea prognosticului melanomului cutanat. *Romanian J. Path.* 8 (3,4) 271-278.
4. Georgiu C. 2005. Antigenele tumorale în imunologia tumorală. *Romanian J. Path.* 8 (1,2) 71-86.
5. Elder, D., Murphy, G. 1991. Atlas of tumor pathology. Pp.: 110-191. In *Melanocytic Tumors of Skin AFIP*, Washington D.C.
6. Homsy, J., Kashani-Sabet, M., Messina, J.L. et al. 2005. Cutaneous melanoma : Prognostic factors. *Cancer Control* 12(4) 223-228.
7. Lázár-Molnár, E., Hegyesi, H., Tóth, S., Falus, A. 2000. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 6 547-554.
8. Orosz, Zs. 2003. A melanoma malignum patológiai diagnózisának buktatói. *Hungarian Oncology* 47 27-41.
9. Ryan, L., Kramar, A., Borden, E. 1993. Prognostic factors in metastatic melanoma. *Cancer* 71 2995-3005.
10. Szekeres, Gy., Battányi, Z. 2003. The immundiagnostic of malignant melanoma. *Hungarian Oncology* 47 45-51.
11. Yee, C., Thompson, J.A., Roche, P. et al. 2000. Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma : direct evidence of T cell-mediated vitiligo. *J Exp Med.* 192:1637-1644.