



VII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica y I Congreso de Preparaciones Virtuales por Internet

Del 1 al 31 de octubre de 2005



TMA: ESTUDIO DE CADHERINAS & CATENINAS EN LAS DIFERENTES FASES DE PROGRESIÓN DEL MELANOMA

ANA SAIZ*, JOSE LUIS RODRIGUEZ PERALTO*

* HOSPITAL 12 DE OCTUBRE ESPAÑA

Resumen

INTRODUCCIÓN El melanoma, además de ser uno de los cánceres más agresivos, está aumentando su incidencia en los últimos años de forma exponencial. Las cadherinas son un grupo de moléculas de adhesión caracterizadas por un mecanismo de acción dependiente de calcio. Para el correcto funcionamiento de las uniones celulares, las cadherinas se unen a las cateninas y éstas a su vez al citoesqueleto de la célula, haciendo que las uniones célula a célula sean sólidas y estables. La mayoría de los trabajos de melanoma publicados hasta ahora se han realizado sobre cultivos y modelos tumorales, y ninguno de ellos aprovechando la peculiar secuencia de progresión del melanoma. Este trabajo propone un estudio sobre tejidos humanos de melanoma, utilizando la técnica de tissue microarrays, con objeto de identificar perfiles moleculares de expresión de algunas de las moléculas de adhesión en las distintas fases de progresión del melanoma: radial, vertical y metástasis. **MATERIAL Y MÉTODOS** Hemos seleccionado 162 pacientes diagnosticados de melanoma en el servicio de Anatomía Patológica del hospital Ramón y Cajal de Madrid. El material fue incluido en cuatro tissue microarrays, con el posterior estudio de inmunohistoquímica en el que se utilizaron cinco marcadores de moléculas de adhesión (E-cadherina; Cadherina-11; beta catenina; p-120 y catenina gamma). **RESULTADOS** La Cadherina E disminuye su expresión a medida que progresa el melanoma p? 0.001. Estos resultados están en consonancia con los hallazgos en la literatura que postulan que el primer paso de la cascada oncogénica es la pérdida de expresión de cadherina E. La p-120 y la catenina beta tienen un comportamiento similar siendo positivos todos los casos en fase de crecimiento radial y negativizándose de forma moderada según progresa la lesión. La escasa literatura existente al respecto es concordante con nuestros hallazgos. La expresión de catenina gamma disminuye claramente con una p? 0.001, según progresa el melanoma, y la Cadherina 11 es negativa en prácticamente todos los casos independientemente de la fase de crecimiento o el espesor de Breslow, sin embargo son escasas las referencias que nos permitan comparar estos datos. **CONCLUSIONES** 1- La técnica de los tissue microarrays o matrices tisulares es barata, eficaz, sencilla y reproducible para el análisis de expresión inmunohistoquímica de grandes series de melanomas. 2 - La expresión de cadherina E, catenina gamma y p 120, disminuye de forma estadísticamente significativa p<0.001, a medida que progresa la fase de crecimiento y el espesor de Breslow del melanoma. 3 - La catenina β y la p120 tienen patrones de expresión semejantes en las distintas fases de crecimiento de los melanomas humanos. Ambas, disminuyen su expresión de forma moderada según progresa la evolución del melanoma. Además el patrón de expresión nuclear de la catenina beta, en contra de lo observado en otros tumores, no se correlaciona con el pronóstico del melanoma.

Introducción

El melanoma es uno de los cánceres humanos más agresivos, caracterizado por una etiología multifactorial (1). Son muchos los estudios encaminados a entender la biología de esta neoplasia, sobre todo, teniendo en cuenta que la incidencia del melanoma ha aumentado de forma exponencial en la población mundial en los últimos años (1). Sin embargo, este aumento de su incidencia no ha sido proporcional al aumento de la mortalidad del melanoma. De hecho hay autores que postulan un aumento de la incidencia, a costa de un mayor diagnóstico de lesiones tempranas, gracias a las campañas de prevención y diagnóstico precoz de muchos países, y por tanto melanomas con un comportamiento menos agresivo (2). El pronóstico de un melanoma es variable, hay lesiones que con las mismas características evolucionan bien y otras, sin embargo, muy mal. El intentar identificar las diferencias moleculares entre unas y otras es un objetivo preferente en la mayoría de los estudios actuales (3). Estas diferencias en la biología de los distintos melanomas no se pueden explicar solamente con las características clínicas e histológicas, necesitamos identificar variables biológicas que nos permitan diferenciar grupos de riesgo y por tanto pronósticos (4). A nivel celular el melanoma es una neoplasia producida por una alteración en la correcta homeostasis cutánea (4). Sin embargo, identificar marcadores moleculares que puedan servir como factores pronósticos es muy difícil, de hecho son muchos los intentos en la literatura y la mayoría sin éxito (5-6). Los factores implicados en la progresión del melanoma están aun por descubrir. El melanoma es una neoplasia con una forma de progresión diferente, una progresión neoplásica secuencial característica, radial, vertical y metástasis, esto hace que el melanoma sea una neoplasia con especial interés a la hora de buscar factores pronósticos moleculares. Hay que recalcar que hasta ahora la mayoría de los estudios sobre melanoma se han realizado sobre cultivos y líneas celulares son escasos los estudios sobre tejidos humanos y prácticamente ninguno de ellos aprovechando la peculiar forma de progresión neoplásica secuencial del melanoma. La tecnología de los tissue microarrays (TMA) o matrices tisulares nos permite estudiar gran número de especímenes con mínimo daño del bloque original, obteniendo material suficiente para el análisis y la interpretación de las técnicas aplicadas y además supone un importante ahorro de tiempo y de dinero (7). Se incluyó en cada TMA dos duplicados de los casos estudiados basándonos en resultados previos de la literatura (8-9). El aplicar esta técnica para el estudio de una gran serie de melanomas es otro de los objetivos de este trabajo. Las cadherinas son un grupo de moléculas de adhesión caracterizadas por un mecanismo de acción dependiente de calcio (11). Para el correcto funcionamiento de las uniones celulares las cadherinas se unen a las cateninas y éstas a su vez al citoesqueleto de la célula, haciendo que las uniones célula a célula sean sólidas y estables (11). La cadherina E es la molécula de adhesión predominante en el epitelio humano, mientras que la cadherina N se expresa en fibroblastos y células endoteliales de la dermis y no en queratinocitos ni melanocitos (11). El propósito de este estudio es tratar de identificar un patrón de expresión de algunas de las moléculas de adhesión: cadherinas y cateninas, en tejidos de melanomas humanos, en las distintas fases de progresión del melanoma: radial, vertical y metastásica, intentando buscar una relación con el pronóstico del melanoma, y posibles inmunofenotipos de melanoma más agresivos. Todo ello utilizando la técnica de TMA.

Material y Métodos

1 - Casos recogidos Se seleccionaron 162 pacientes diagnosticados de melanoma en el Hospital Ramón y Cajal de Madrid. De todos ellos obtuvimos 191 bloques de parafina correspondientes a: 39 melanomas en fase de crecimiento radial, 106 en fase de crecimiento vertical, 36 metástasis y 11 melanomas no clasificables histológicamente. Ninguno de los pacientes seleccionados tenían historia familiar de melanoma, y todos ellos fueron tratados de acuerdo a criterios estándar. 2 - Construcción de los tissue microarrays Se diseñaron cuatro TMA para este estudio, cada uno de ellos contenía dos cilindros de tejido duplicados de cada caso problema de 1,5 mm de diámetro. Asimismo se utilizaron controles internos en cada uno de los TMA: piel normal, nevus, tejido mamario, músculo cardíaco y amígdala. 3 - Inmunohistoquímica Se realizaron secciones de 3 micras de espesor de los TMA con microtomo y sobre ellas se realizó el estudio inmunohistoquímico. Las preparaciones se incubaron toda la noche a 56°C, posteriormente se deparafinaron en xilol durante 20 minutos, se rehidrataron con etanol en distintas concentraciones y posteriormente se lavaron. El revelado del antígeno se consiguió con choque de calor en una olla, que contenía 1 litro de citrato sódico (ph 2.5 DAKO). Posteriormente sobre estos cristales se aplicaron los anticuerpos correspondientes a cadherina E, cadherina 11, beta catenina, gamma catenina y p120. Los anticuerpos seleccionados para el estudio inmunohistoquímico fueron los disponibles en kits comerciales que habían sido previamente optimizados para la técnica en nuestro laboratorio. 4 - Valoración de resultados inmunohistoquímicos Se valoró la intensidad de la tinción por un patólogo utilizando tres o dos de las siguientes categorías: ++=muy positivo +=positivo -=negativo En el caso de la catenina beta se añadió a las anteriores otra categoría: + nuclear.

Resultados

Para interpretar los resultados obtenidos enfrentamos la expresión de cada una de las moléculas de adhesión estudiadas frente a fase de crecimiento del melanoma y espesor de Breslow. Se realizaron tablas de 2x2 utilizando el test de la chi cuadrado. Nuestra serie comprenda 20.7% de melanomas en fase de crecimiento radial, 66.3% en fase de crecimiento vertical y 12.4% metástasis. Los melanomas en fase de crecimiento radial no presentaron metástasis mientras que los de fase de crecimiento vertical metastatizaron en un 42.9% de los casos. El espesor tumoral se dividió en dos grupos aprovechando las cinco categorías utilizadas siguiendo criterios de la American Joint Committee on Cancer (AJCC). Todos los anticuerpos estudiados presentaron positividad membranosa, excepto catenina beta que además de la membranosa en algunos casos presentó positividad nuclear. Cadherina E La expresión de cadherina E disminuyó de forma estadísticamente significativa a medida que progresó la fase de crecimiento del melanoma y aumentó el espesor de Breslow. Sin embargo se siguieron observando casos positivos en cada una de las fases de crecimiento de los melanomas. (Figura 1 y 2) Cadherina 11 El patrón de expresión de la cadherina 11 resultó muy similar al de la cadherina N, la mayoría de los melanomas fueron negativos para la expresión de cadherina 11, independientemente de su fase de crecimiento y su espesor tumoral. (Figura 3 y 4) Catenina gamma La expresión de catenina gamma disminuyó de forma estadísticamente significativa a medida que progresó la lesión y aumentó el espesor tumoral. Asimismo los casos positivos disminuyeron. (Figura 5 y 6) p-120 La expresión de p-120 en los melanomas en fase de crecimiento radial fue positiva en un 100% de los casos, esta positividad fue disminuyendo de forma moderada según progresó el melanoma y aumentó su espesor tumoral con una $p < 0.001$. Persistiendo muchos casos positivos en todas las fases de crecimiento. Este comportamiento fue muy similar al de la catenina beta. (Figura 7 y 8) Catenina beta Al estudiar la expresión de catenina beta vimos como el 100% de los melanomas en fase radial resultaron positivos para la expresión de catenina beta y ésta fue disminuyendo de forma moderada según avanzó la fase de progresión del melanoma y su espesor de breslow, de forma similar a la p120. (Figura 9 y 10) En la expresión de la catenina beta incluimos una nueva categoría de positivo nuclear que resultó de aproximadamente el 10% en cada una de las fases de crecimiento.

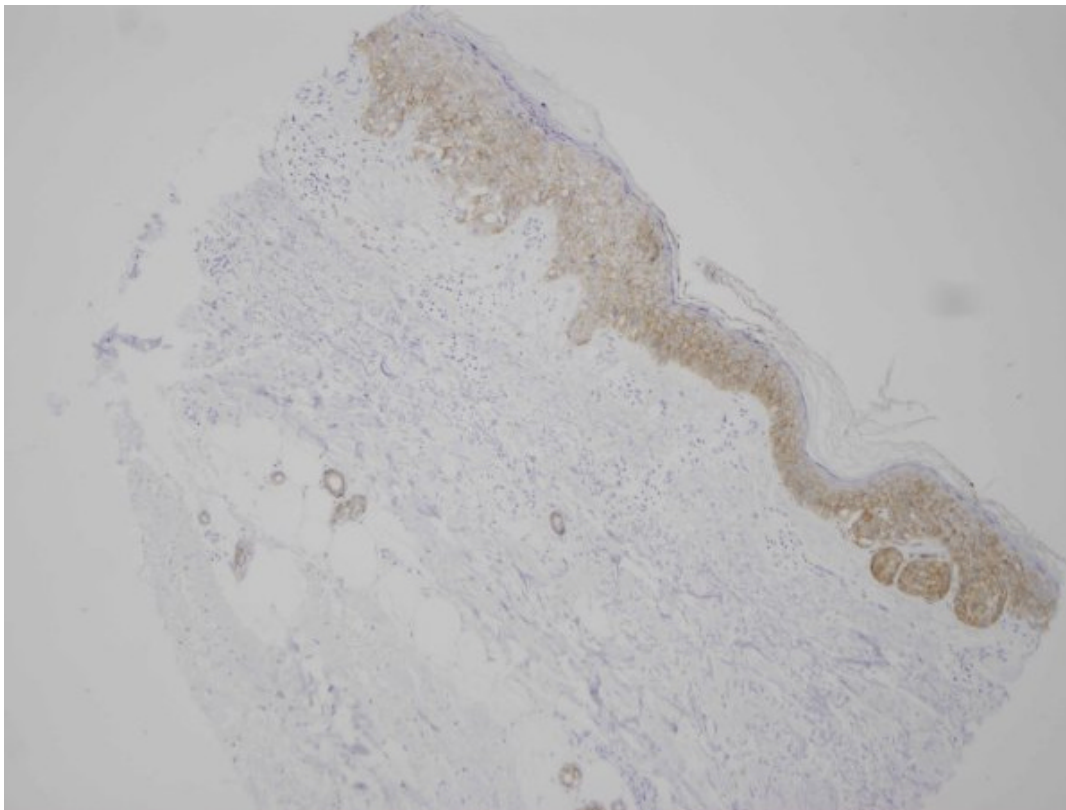
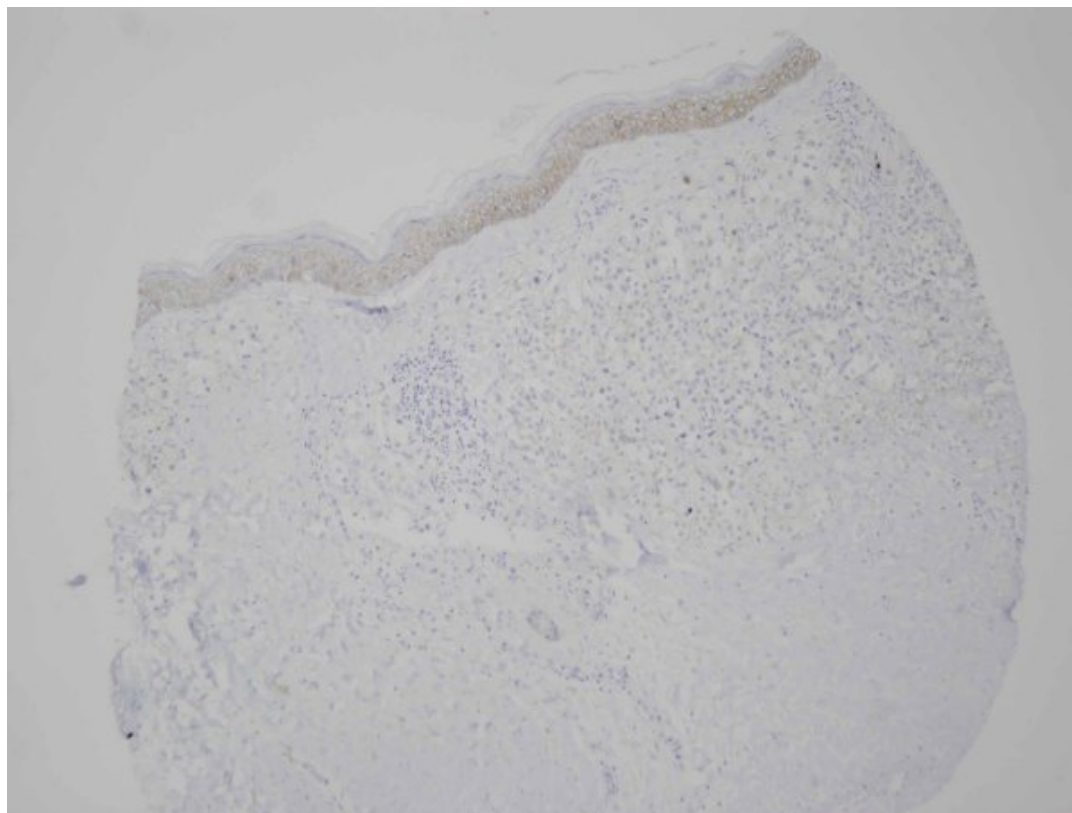


Figura 1 - Expresión IHQ de Cadherina E, en fase de crecimiento radial



y 2 - Expresión IHQ de Cadherina E, en fase de crecimiento vertical

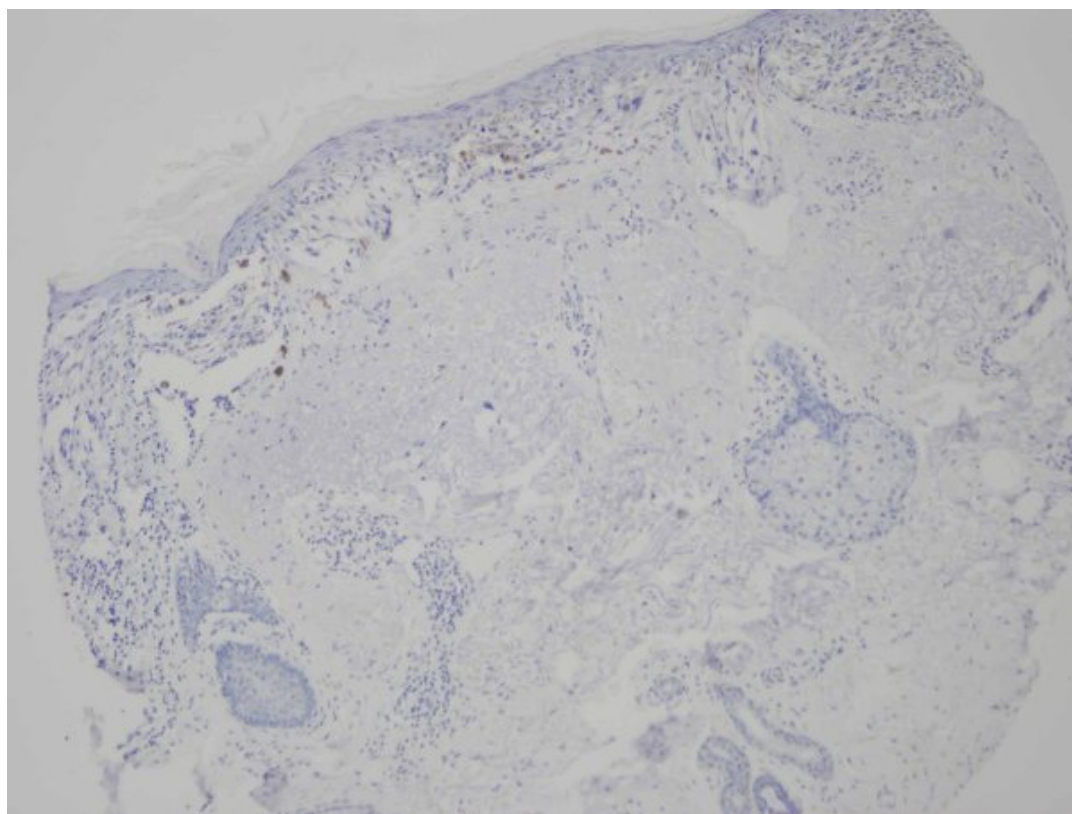
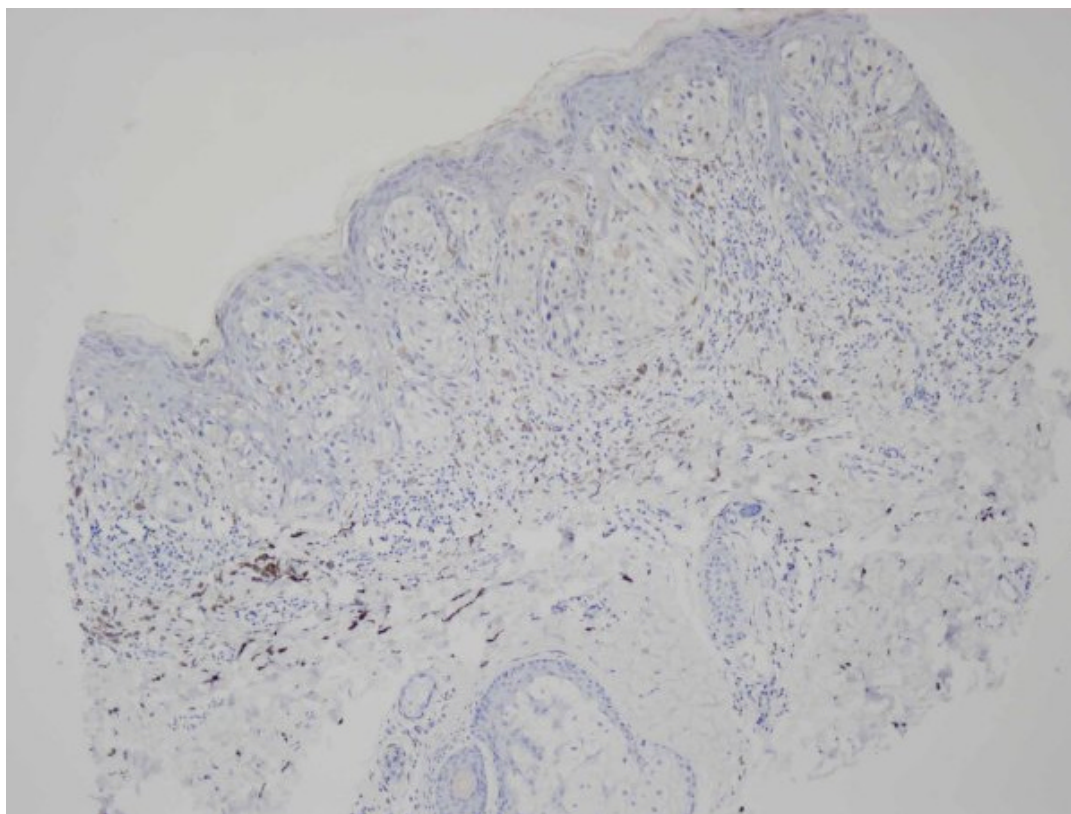


Figura 3 - Expresión IHQ de Cadherina 11, en fase de crecimiento radial



y 4 - Expresión IHQ de Cadherina 11, en fase de crecimiento vertical

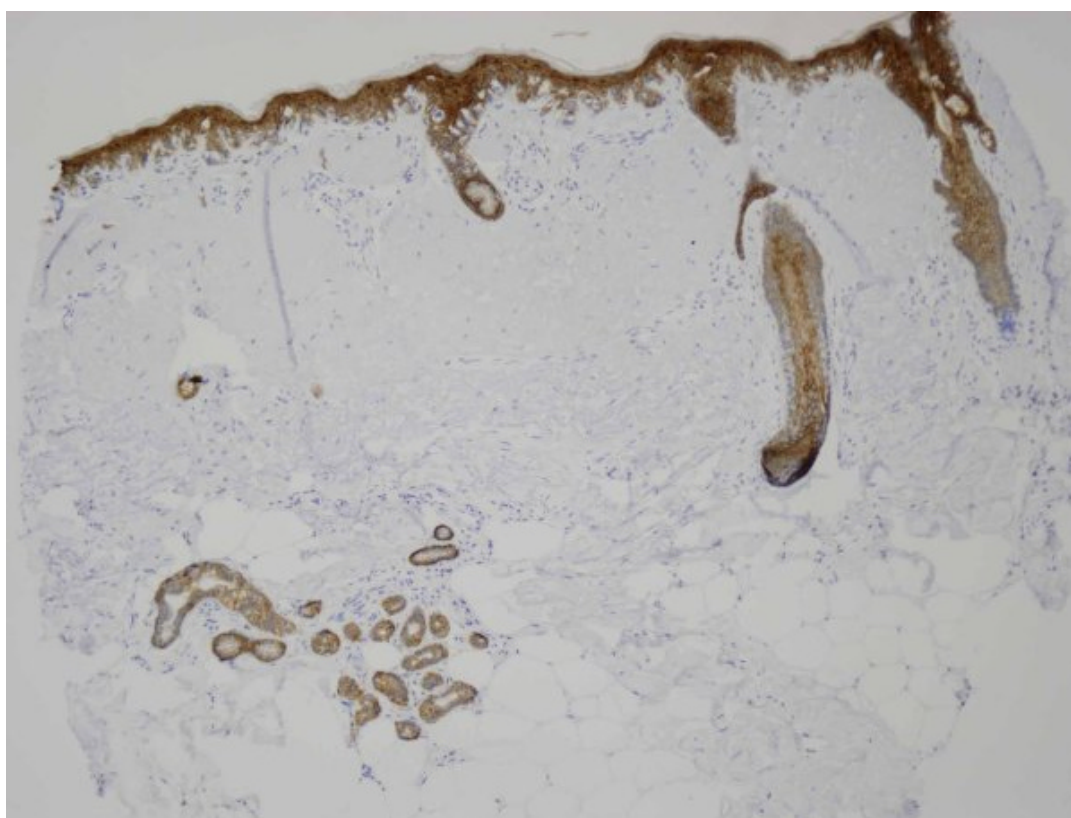
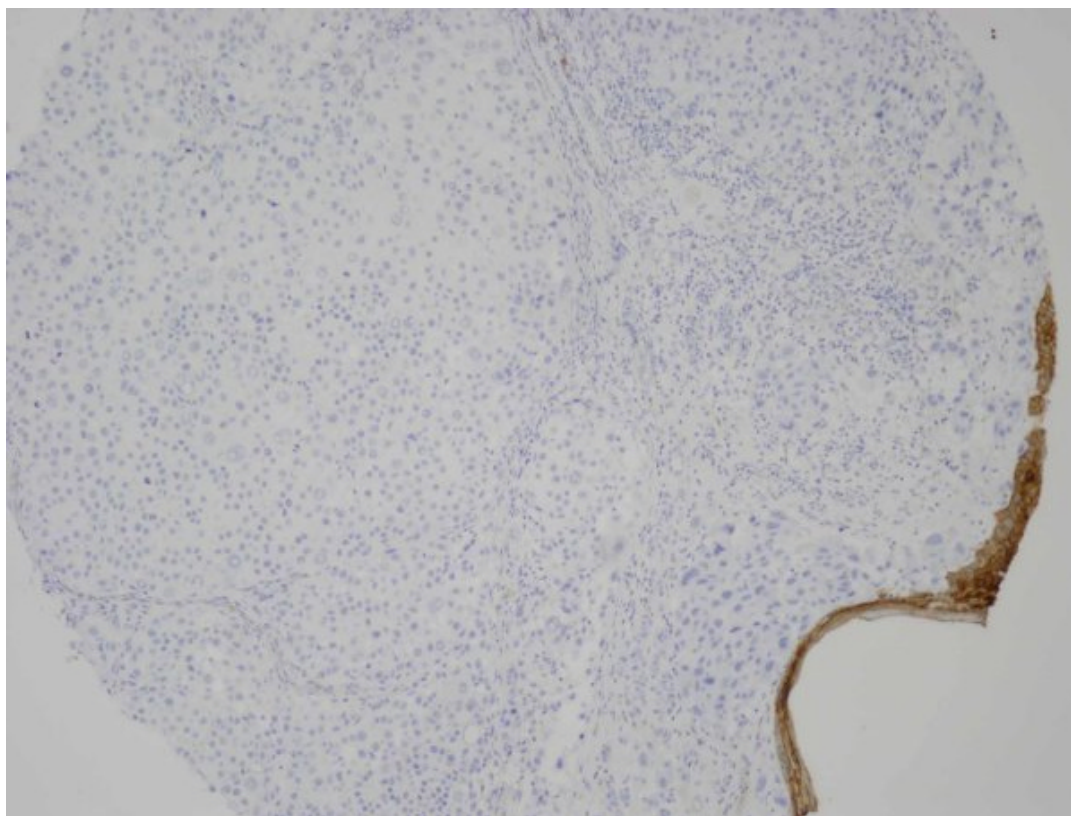


Figura 5 - Expresión IHQ de Catenina gamma, en fase de crecimiento radial



y 6 - Expresión IHQ de Catenina gamma, en fase de crecimiento vertical

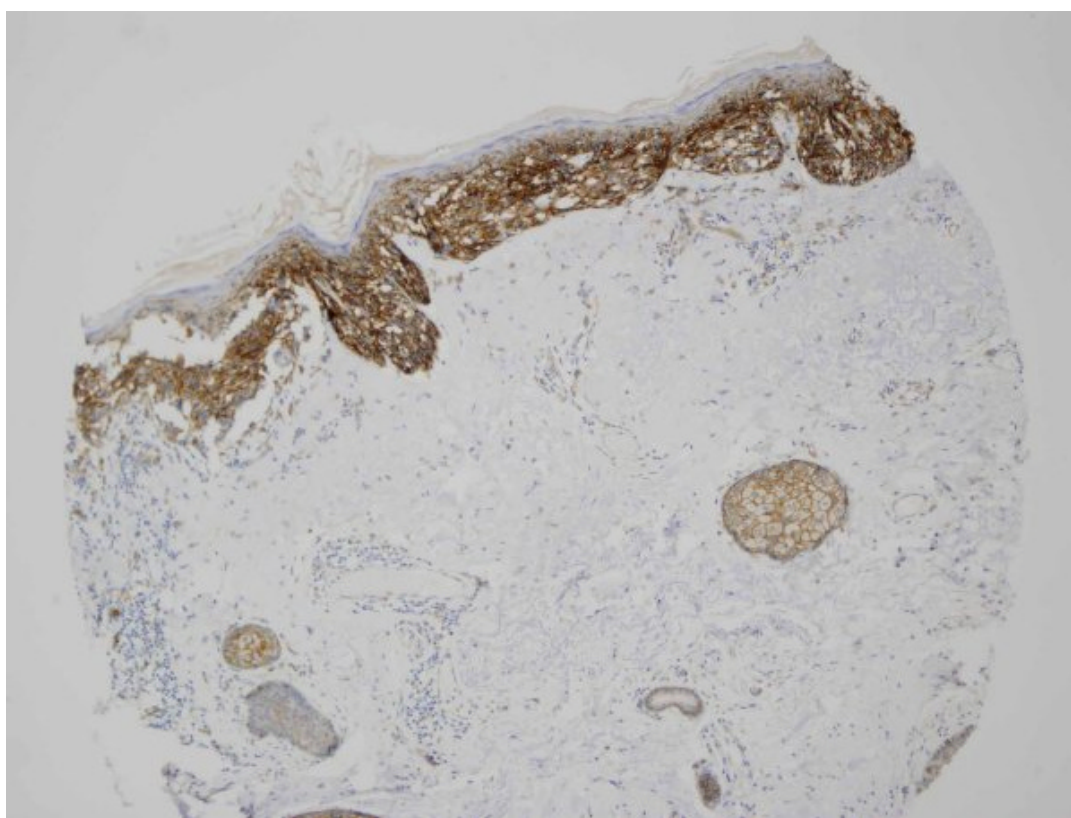
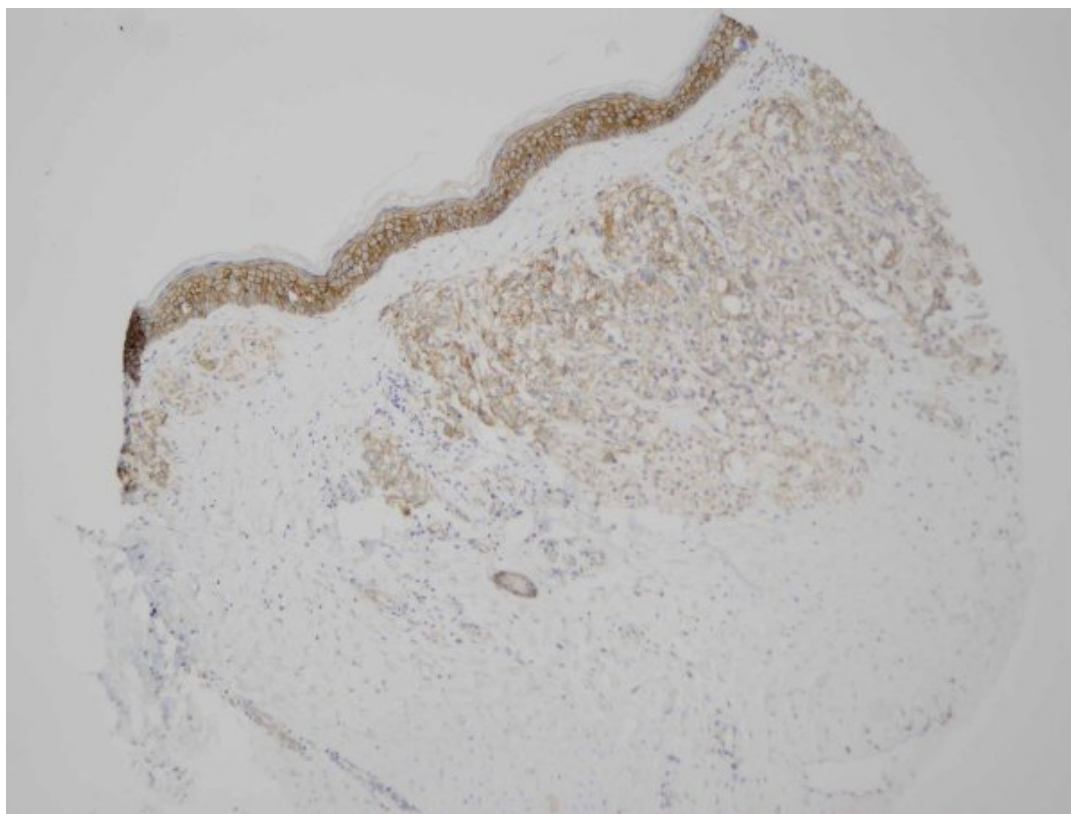


Figura 7 - Expresión IHQ de p120, en fase de crecimiento radial



y 8 - Expresión IHQ de p120, en fase de crecimiento vertical

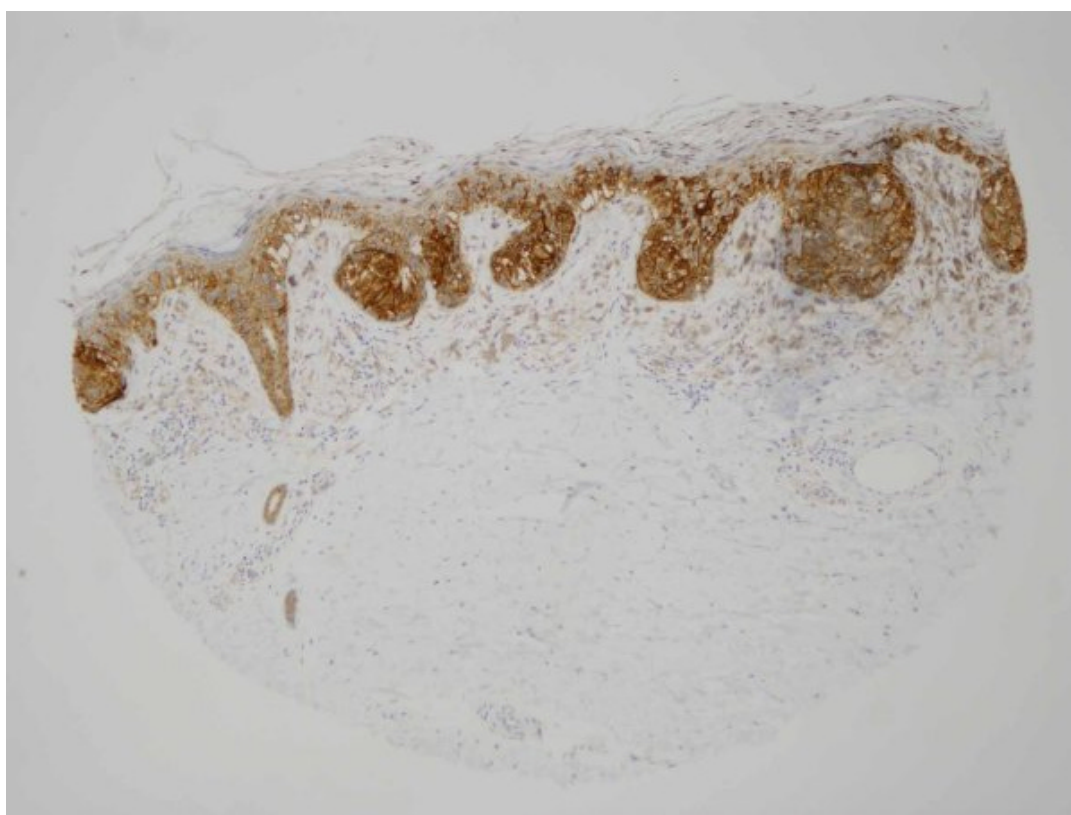
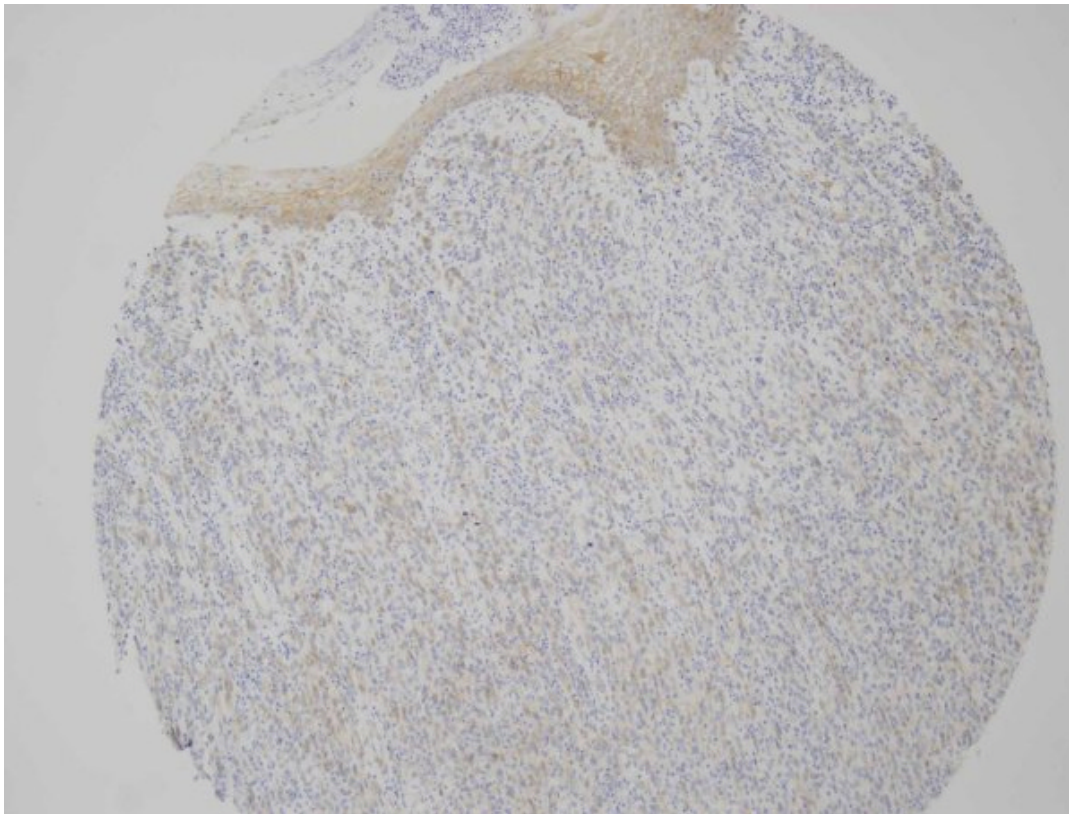


Figura 9 - Expresión IHQ de catenina beta, en fase de crecimiento radial



y 10 - Expresión IHQ de beta catenina, en fase de crecimiento vertical

Discusión

Para interpretar los resultados obtenidos enfrentamos la expresión de cada una de las moléculas de adhesión estudiadas frente a fase de crecimiento del melanoma y espesor de Breslow. Se realizaron tablas de 2x2 utilizando el test de la chi cuadrado. Nuestra serie comprenda 20.7% de melanomas en fase de crecimiento radial, 66.3% en fase de crecimiento vertical y 12.4% metastasis. Los melanomas en fase de crecimiento radial no presentaron metástasis mientras que los de fase de crecimiento vertical metastatizaron en un 42.9% de los casos. El espesor tumoral se dividió en dos grupos aprovechando las cinco categorías utilizadas siguiendo criterios de la American Joint Committee on Cancer (AJCC). Todos los anticuerpos estudiados presentaron positividad membranosa, excepto catenina beta que además de la membranosa en algunos casos presentó positividad nuclear. Cadherina E La expresión de cadherina E disminuyó de forma estadísticamente significativa a medida que progresó la fase de crecimiento del melanoma y aumentó el espesor de Breslow. Sin embargo se siguieron observando casos positivos en cada una de las fases de crecimiento de los melanomas. Cadherina 11 El patrón de expresión de la cadherina 11 resultó muy similar al de la cadherina N, la mayoría de los melanomas fueron negativos para la expresión de cadherina 11, independientemente de su fase de crecimiento y su espesor tumoral. Catenina gamma La expresión de catenina gamma disminuyó de forma estadísticamente significativa a medida que progresó la lesión y aumento el espesor tumoral. Asimismo los casos positivos disminuyeron. p-120 La expresión de p-120 en los melanomas en fase de crecimiento radial fue positiva en un 100% de los casos, esta positividad fue disminuyendo de forma moderada según progresó el melanoma y aumentó su espesor tumoral con una $p < 0.001$. Persistiendo muchos casos positivos en todas las fases de crecimiento. Este comportamiento fue muy similar al de la catenina beta. Catenina beta Al estudiar la expresión de catenina beta vimos como el 100% de los melanomas en fase radial resultaron positivos para la expresión de catenina beta y ésta fue disminuyendo de forma moderada según avanzó la fase de progresión del melanoma y su espesor de breslow, de forma similar a la p120. En la expresión de la catenina beta incluimos una nueva categoría de positivo nuclear que resultó de aproximadamente el 10% en cada una de las fases de crecimiento.

Conclusiones

- La técnica de los tissue microarrays o matrices tisulares es barata, eficaz, sencilla y reproducible para el análisis de expresión inmunohistoquímica de grandes series de melanomas. 2 - La expresión de cadherina E, catenina gamma y p 120, disminuye de forma estadísticamente significativa $p < 0.001$, a medida que progresa la fase de crecimiento y el espesor de Breslow del melanoma. 3- La catenina β y la p120 tienen patrones de expresión semejantes en las distintas fases de crecimiento de los melanomas humanos. Ambas, disminuyen su expresión de forma moderada según progresa la evolución del melanoma. Además el patrón de expresión nuclear de la catenina beta, en contra de lo observado en otros tumores, no se correlaciona con el pronóstico del melanoma.

Bibliografía

1.- Beddingfield FC. The melanoma epidemic: Res Ipsa Loquitur. The Oncologist 2003; 8: 459-465. 2.- American Cancer Society. Cancer facts and figures 2002. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2002. (www.cancer.org). 3.- "Epidemic" of malignant melanoma. True increase or

better detection? JAMA, 2002 - vol. 287, n°17-2201. 4.- Perlis C, Herlyn M. Recent advances in melanoma biology. The Oncologist 2004; 9: 182-187. 5.- Balch CM, Buzaid AC, Atkins MB, et al. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. Cancer 2000; 88: 1484-1491. 6.- Duncan LM, Deeds J, Cronin FE, et al. Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma. J Clin Oncol. 2001; 19: 568-576. 7.- Rimm D, Camp R, Charette L, et al. Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. Cancer J 2001; 7: 24-31. 8.- Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. Lab Invest 2000; 80: 1943-1949. 9.- Hoos A, Urist MJ, Stojadinovik A, et al. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. Am J Pathol 2001; 158: 1245-1251. 10.- Skacel M, Skilton B, Pettay JD, Tubbs RR. Tissue microarrays: a powerful tool for high throughput analysis of clinical specimens: a review of the method with validation data. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2002; 10: 1-6. 11.- Gruss C, Herlyn M. Role of cadherins and matrixins in melanoma. Curr Opin Oncol 2001; 13: 117-123. 12.- Kielhorn E, Provost E, Olsen D, D'aquila TG, et al. Tissue micro-array based analysis shows phospho- β -catenin expression in malignant melanoma is associated with poor outcome. Int J Cancer 2003; 103: 652-656. 13.- Alonso SR, Ortiz P, Rodriguez-Peralto JL et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. Am J Pathol 164; 193-203: 2004. 14.- Sanders DS, Blessing K, Hassan GA, et al. Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours: Mol Pathol 1999; 52: 151-157. 15.- Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. N-Cadherin mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. Cancer Res 2001; 61 :3819-3825. 16.- Cowley GP, Smith MEF. Cadherin expression in melanocytic naevi and malignant melanomas. J Pathol 1996; 179: 183. 17.- Silye R, Karayiannakis AJ, Syrigos KN, et al. E-cadherin / catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions. J Pathol 1998; 186: 350. 18.- Ino Y, Gotoh M, Sakamoto M, Tsukagoshi K, Hiroashi S. Dysadherin, a cancer-associated cell membrane glycoprotein, down regulates E cadherin and promotes metastasis. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 365-70. 19.- Aoki S, Shimamura T, Shibata T, Nakanishi Y, Moriya Y, Sato Y, Kitajima M, Sakamoto M, Hiroashi S. Prognostic significance of dysadherin expression in advanced colorectal carcinoma. Br J Cancer 2003; 88: 726-32. 20.- Hsu M, Andl T, Li G, et al. Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. J Cell Sci. 2000; 113 :1535-1542. 21.- Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, et al. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down regulates expression of invasion-related adhesion receptors. Am J Pathol 2000; 156: 1515-1525. 22.- Krenger S, Grotelüschen F, Bartsch S, Tronnier M. Cadherin expression pattern in melanocytic tumors more likely depends on the melanocyte environment than on tumor cell progression. J Cutan Pathol 2004; 31: 1-7. 23.- Kawaguchi J, Takeshita S, Takeshi K, et al. Expression and function of the splice variant of the human cadherin-11 gene in subordination to intact cadherin 11. J Bone Miner Res 1999; 14: 764-775. 24.- Van Noort M, Clevers H. TCF transcription factors, mediators of Wnt-signaling in development and cancers. Dev Biol 2002; 244: 1-8. 25.- Polakis P. Casein Kinase I: a Wnt'er of disconnect. Curr Biol 2002; 12: R499-R501. 26.- Seidel B, Braeg S, Adler G, Wedlich D, Menke A. E and N cadherin differ with respect to their associated p120 (ctn) isoforms and their ability to suppress invasive growth in pancreatic cancer cells. Oncogene 2004 in press. 27.- Dogione C, Piccinin S, Demontis S, Cangi MG, Pecciarini L, et al. Alterations of β -catenin pathway in non-melanoma skin tumours. Am J Pathol 2003; 163: 2277-2287. 28.- Moreno Bueno G, Gamallo C, Perez Gallego L, Calvo de Mora J, Suarez A, Palacios J. β -Catenin expression pattern, β -Catenin gene mutations, and microsatellite instability in endometrioid ovarian carcinomas and synchronous endometrial carcinomas. Diagn Mol Pathol, 2001;10: 116-122. 29.- Moreno Bueno G, Hardisson D, Sanchez C, Sarrió D, Cassia R et al. Abnormalities of the APC/ β -Catenin pathway in endometrial cancer. Oncogene 2002; 21: 7981-7990. 30.- Murakami T, Toda S, Fujimoto M, et al. Constitutive activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway in migration-active melanoma cells: role of LEF-1 in melanoma with increased metastatic potential. Biochem Biophys Res Com 2001; 288: 8-15. 31.- Shieh YS, Chang LC, Chiu KC, Wu CW, Lee HS. Cadherin and catenin expression in mucoepidermoid carcinoma: correlation with histopathologic grade, clinical stage, and patients outcome. J Oral Pathol Med 2003; 32: 297-304. 32.- Bondi J, Bukholm G, Nesland JM, Bukholm IR. Expression of non-membranous β -catenin and gamma catenin, c-Myc and cyclin D1 in relation to patient outcome in human colon adenocarcinomas. APMIS 2004; 112: 49-56. 33.- Papagerakis S, Shabana AH, Depondt J, et al. Altered plakoglobin expression at mRNA and protein levels correlates with clinical outcome in patients with oropharynx squamous carcinomas. Hum Pathol 2004; 35: 75-85.