

ACTAS Derma-Sifiliográficas

Full English text available at
www.actasdermo.org



REVISIÓN

La linfangiogénesis. Sus implicaciones en el diagnóstico, tratamiento y pronóstico del melanoma



I. Pastushenko^{a,*}, C. Conejero^a y F.J. Carapeto^b

^a Servicio de Dermatología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, España

^b Facultad de Medicina, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España

Recibido el 22 de septiembre de 2013; aceptado el 14 de febrero de 2014

Disponible en Internet el 2 de junio de 2014

PALABRAS CLAVE

Melanoma;
Linfangiogénesis;
Ganglio centinela;
Pronóstico

KEYWORDS

Melanoma;
Lymphangiogenesis;
Sentinel lymph node;
Prognosis

Resumen En pacientes con melanoma los factores pronósticos utilizados en muchas ocasiones no permiten una predicción precisa de la evolución de la enfermedad, lo que hace evidente la necesidad de búsqueda de nuevos factores pronósticos. Existe una evidencia científica cada vez más sólida de que los vasos linfáticos tumorales desempeñan un papel importante en la producción de metástasis linfáticas y también hematógenas en pacientes con melanoma. En este trabajo expondremos el estado actual del conocimiento y las implicaciones del proceso de linfangiogénesis en el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de los pacientes con melanoma. © 2013 Elsevier España, S.L.U. y AEDV. Todos los derechos reservados.

Lymphangiogenesis: Implications for Diagnosis, Treatment, and Prognosis in Patients With Melanoma

Abstract Disease course in melanoma often cannot be accurately predicted by means of the prognostic factors usually considered in patients with melanoma; therefore, new factors are clearly needed. Increasingly robust scientific evidence shows that tumor lymph vessels play a key role in melanoma that metastasizes by lymphatic and hematogenous pathways. We review current knowledge and examine the implications of lymphangiogenesis in the diagnosis, treatment, and prognosis of patients with melanoma. © 2013 Elsevier España, S.L.U. and AEDV. All rights reserved.

Introducción

El melanoma representa menos del 10% de todos los cánceres de piel; sin embargo, es responsable de más del 90% de las muertes por neoplasias cutáneas¹. Las estadísticas de los últimos años son alarmantes, apreciándose un incremento

* Autor para correspondencia.
Correo electrónico: jane.pastushenko@gmail.com
(I. Pastushenko).

constante en la incidencia de melanoma en la mayoría de los países, y de manera llamativa entre la población joven, factores que en conjunto obligan a considerarlo como un problema de salud pública en aumento². La base de su tratamiento es la extirpación quirúrgica, que ofrece una alta tasa de curación si se realiza de forma precoz. Sin embargo, una vez que el tumor se ha extendido más allá del control quirúrgico locorregional, el pronóstico empeora notablemente. Afortunadamente, en la actualidad disponemos de fármacos que tienen impacto sobre la supervivencia en pacientes con melanoma³⁻⁶.

Los factores pronósticos utilizados en la práctica clínica diaria en pacientes con melanoma son el índice de Breslow, la presencia de ulceración, el índice mitótico y el estado del ganglio centinela⁷⁻¹². Sin embargo, la valoración de estos parámetros no permite establecer una predicción precisa de la evolución de la enfermedad en un porcentaje nada despreciable de pacientes. Así, más del 15% de los enfermos con índice de Breslow menor de 1 mm desarrollarán enfermedad metastásica¹³, mientras que una proporción importante de pacientes con tumores cuyo Breslow supera los 4 mm presentarán una supervivencia libre de enfermedad relativamente larga (58% más de 5 años)¹⁴.

Uno de los procesos que se consideran clave en la progresión y diseminación de los tumores malignos es la angiogénesis. Se trata de la formación de nuevos capilares sanguíneos a partir de los vasos preexistentes, lo que facilita su diseminación y, en definitiva, las metástasis. La utilización como factor pronóstico de los diferentes parámetros que reflejan el nivel de angiogénesis tumoral se ha investigado en diferentes tipos de neoplasias¹⁵⁻¹⁸, incluyendo el melanoma¹⁹⁻²². Sin embargo, estos estudios no han aportado resultados homogéneos de forma concluyente y unitaria²³⁻²⁷. Así, los resultados del metaanálisis publicado recientemente por nuestro grupo apuntan a que la densidad de vasos sanguíneos es muy similar entre pacientes que han desarrollado metástasis y aquellos sin evidencia de enfermedad metastásica²⁸. Por el contrario, sí parece existir una diferencia significativa en la densidad y frecuencia de invasión de vasos linfáticos entre los 2 grupos²⁸.

Es de resaltar que, a diferencia de la angiogénesis, el proceso de linfangiogénesis no ha sido estudiado en profundidad hasta hace relativamente poco tiempo, debido a la falta de marcadores específicos del endotelio linfático. Con el objetivo de clarificar el papel de los vasos linfáticos en la progresión y diseminación del melanoma, nos ha parecido de interés revisar lo conocido hasta el momento, valorando las posibles implicaciones del proceso de linfangiogénesis en el diagnóstico y tratamiento de este tipo de tumor. Nos ha parecido importante hacer referencia, además, a los aspectos más técnicos, por lo que describiremos los diferentes métodos de cuantificación del proceso de linfangiogénesis en tumores sólidos y mencionaremos las principales características de los marcadores del endotelio linfático.

Mecanismos de linfangiogénesis

En la última década las investigaciones en el campo de la linfangiogénesis tumoral han conseguido identificar muchos de los factores implicados en el crecimiento, proliferación, migración y supervivencia de las células del endotelio linfático. Los primeros factores que se han descrito como

responsables del proceso de linfangiogénesis han sido el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-C y -D, y su receptor VEGF-receptor (VEGFR)-3²⁹⁻³². Por otra parte, VEGF-A, conocido como uno de los factores proangiogénicos más importantes, también ha demostrado ser capaz de inducir la proliferación de los vasos linfáticos³³.

Los factores VEGF-A, -C y -D ejercen su acción a través de receptores específicos en el endotelio linfático (VEGFR). Sin embargo, también son capaces de unirse a la neuropilina-2 (Nrp-2), receptor de semaforinas descubierto inicialmente en el sistema nervioso, detectándose posteriormente su expresión también en las células del endotelio linfático. Se piensa que la Nrp-2 actúa como coreceptor del VEGFR-3³⁴. Recientemente se han identificado otros nuevos inductores del crecimiento y proliferación de los vasos linfáticos, entre ellos el factor de crecimiento de los hepatocitos³⁵, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)-2³⁶, el factor de crecimiento derivado de plaquetas³⁷, el factor de crecimiento insulina-like³⁸ y el factor de crecimiento epidérmico (EGF)³⁹ (fig. 1). Tanto las células tumorales como los macrófagos son capaces de liberar factores inductores de linfangiogénesis⁴⁰.

El descubrimiento y manejo de los marcadores específicos permite actualmente diferenciar los vasos sanguíneos de los linfáticos, lo que ha supuesto un avance trascendental de la investigación en el campo de la linfangiogénesis tumoral. Los marcadores más ampliamente utilizados son LYVE-1, una proteína de membrana y función desconocida, que se expresa en las células del endotelio linfático y en los macrófagos activados⁴¹, y D2-40, anticuerpo que reconoce una glucoproteína transmembrana del endotelio linfático, denominada podoplanina^{42,43}. En la tabla 1 resumimos las principales características de los anticuerpos disponibles en el mercado, y en la figura 2 representamos el proceso de linfangiogénesis y la localización de los marcadores en las células del endotelio linfático.

Linfangiogénesis y metástasis en el melanoma

Entre las características clínico-evolutivas del melanoma está la de provocar las metástasis linfáticas, como ocurre en otros tipos de cánceres. Basándose en una cohorte de 431 pacientes con melanoma, Essner et al. hallaron una prevalencia de metástasis linfáticas del 21% de los pacientes en el momento de su diagnóstico⁴⁴. Por otra parte, la presencia de células tumorales en el ganglio centinela es uno de los factores pronósticos desfavorables más importantes⁴⁵. Sin embargo, hasta un 22% de los enfermos con negatividad en el estudio del ganglio centinela presentarán recurrencia de su enfermedad y un 15% de mortalidad antes de los 5 años⁴⁶.

En 1997 de Waal et al., con el fin de valorar la linfangiogénesis en el melanoma, desarrollaron una técnica para la detección selectiva de los vasos linfáticos, que se basaba en una doble tinción de las muestras histopatológicas con CD31 (anticuerpo que reacciona con todos los tipos de microvasos) y PAL-E (marcador específico del endotelio vascular sanguíneo). Los autores dedujeron que aquellos vasos que tenían resultado positivo para CD31 y negativo para PAL-E serían los linfáticos⁴⁷. Sin embargo, aunque se pudo evidenciar una llamativa diferencia en la densidad de los vasos sanguíneos en los melanomas en fase de crecimiento horizontal y los de crecimiento vertical, los autores no detectaron ningún

Tabla 1 Resumen de las principales características de los marcadores del endotelio linfático

Proteína	Anticuerpo	Sensibilidad	Especificidad	Reactividad	
				TFC	TIP
VEGFR-3	Anti-VEGF3 (FTL-4)	Células endotelio linfático y capilares fenestrados de médula ósea, sinusoides de hígado y páncreas, glomerulos renales y glándulas endocrinas	No	+	+
Desmoplaquina	Anti-desmoplakin	Unión intercelular del endotelio linfático, epitelio, urotelio, hepatocitos	No	+	+
Receptor D6 de la beta-quimioquina	Anti-beta-chemokine receptor D6	Células del endotelio linfático de piel, mucosa y submucosa, intestino y apéndice	¿Sí?	+	+
Prox-1	Anti-Prox-1	Células endotelio linfático, corazón, hígado, páncreas, sistema nervioso	No	+	+
LYVE-1	Anti-LYVE-1	Células endotelio linfático, endotelio, vasos sinusoidales de hígado y páncreas	Sí	+	+
Podoplanina	D2-40	Es un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la podoplanina humana	Sí	+	+

TFC: tejido fresco congelado; TIP: tejido incluido en parafina.

cambio en el número de los vasos linfáticos, concluyendo que las células del melanoma no eran capaces de inducir la linfangiogenesis.

Durante los 5 años posteriores a la publicación de este primer estudio sobre linfangiogenesis en melanoma no hubo ningún otro intento de cuantificar los vasos linfáticos en este tumor, hasta la aparición en el mercado de los anticuerpos específicos. Utilizando dichos marcadores la mayoría de los autores fueron capaces de confirmar la presencia de vasos linfáticos intra y peritumorales en preparaciones de melanoma. Sin embargo, no ha existido unanimidad en la interpretación de los resultados según los datos publicados. Así, mientras que para la mayoría de autores existe una

correlación significativa entre la presencia de metástasis y una menor supervivencia en pacientes con melanoma, para otros no se cumple esta hipótesis-esperada, lo que dio lugar a interpretaciones diversas, como la de que aunque existan vasos linfáticos en la periferia e interior del parénquima tumoral no serían funcionantes⁴⁸.

En la [tabla 2](#) resumimos las principales características de los estudios que evalúan el papel de los vasos linfáticos en pacientes con melanoma. La búsqueda se realizó en la base de datos PubMed con las siguientes palabras clave (MeSH): «melanoma» and («lymphangiogenesis» OR «lymphatic vessels»), resultando en 226 trabajos. Se seleccionaron aquellos estudios que evaluaban la densidad o la

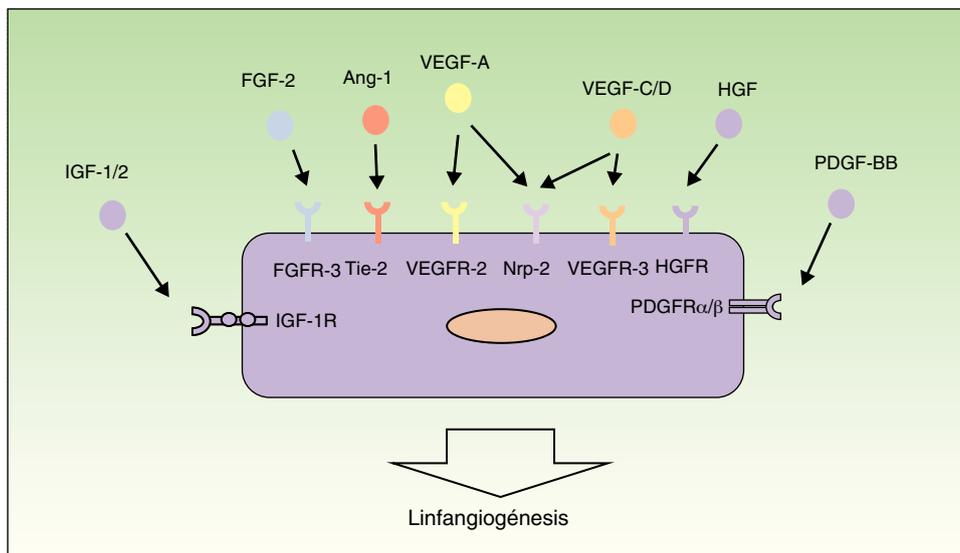


Figura 1 Control molecular del proceso de linfangiogenesis. En el siguiente esquema están representados los principales factores de crecimiento implicados en el proceso de linfangiogenesis y sus receptores en el endotelio linfático. Ang-1: angiopoyetina 1; HGF: factor de crecimiento de hepatocitos; HGFR: receptor de HGF; IGF: factor de crecimiento insulina-like; IGFR: receptor de IGF; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; PDGFR: receptor de PDGF; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; VEGFR: receptor de VEGF.

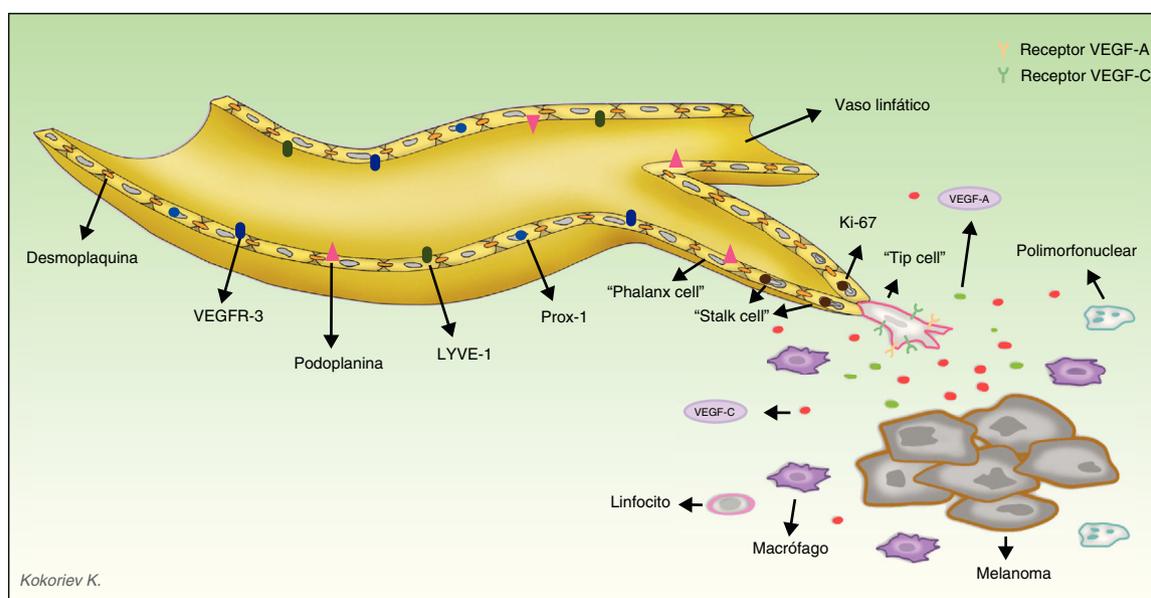


Figura 2 Representación del proceso de linfangiogenesis tumoral y marcadores de los vasos linfáticos. Las células del melanoma y los macrófagos tumorales secretan diversos factores capaces de activar el proceso de linfangiogenesis. Durante la proliferación de los vasos linfáticos se diferencian 3 tipos de células implicadas. La célula guía (*tip cell* en la terminología anglosajona) expresa en su superficie numerosos receptores de factores prolinfangiogenicos, tales como VEGF-A y VEGF-C, y a través de sus filopodios *escanea* el entorno y guía el brote linfático en la dirección de la mayor concentración de dichos factores. Las células del tallo (*stalk cells* en la terminología anglosajona) se localizan detrás de la célula guía, no tienen filopodios ni expresan altas concentraciones de receptores de los factores prolinfangiogenicos en su superficie. Estas células proliferan a una gran velocidad (obsérvese en el esquema que estas células son positivas para Ki-67, marcador de proliferación), comienzan el proceso de formación de la luz vascular y participan en la elaboración de la membrana basal. Durante el proceso de maduración las células del tallo se transforman en las células falange (*phalanx cells* en la terminología anglosajona). Se denominan así porque se disponen formando una monocapa ordenada de células endoteliales linfáticas, recordando a la organización de los soldados en la antigua Grecia (*phalanx*). Las células falange comparten las características morfológicas de las células endoteliales quiescentes, pero a diferencia de estas continúan participando en la formación de la membrana basal.

Tabla 2 Resumen de los estudios publicados sobre el valor pronóstico de la densidad o invasión de vasos linfáticos en pacientes con melanoma

N	Autor	Año	N.º pacientes	Anticuerpo	Parámetro	Resultado
1	de Waal et al. ⁴⁷	1997	27	CD31/PAL-E, CD34, Anti-Col-iv	DVL	Negativo
2	Dadras et al. ²⁷	2003	37	LYVE-1	DVL, IVL	Positivo
3	Straume et al. ⁴⁹	2003	202	LYVE-1	DVL	Positivo
4	Shields et al. ⁵⁰	2004	21	LYVE-1	DVL, IVL	Positivo
5	Valencak et al. ²⁰	2004	120	D2-40	DVL	Positivo
6	Dadras et al. ¹²	2005	45	LYVE-1, D2-40	DVL, IVL	Positivo
7	Sahni et al. ⁵¹	2005	36	LYVE-1	DVL	Negativo
8	Massi et al. ⁵²	2006	45	D2-40	DVL	Positivo
9	Niakosari et al. ⁵³	2008	96	D2-40	IVL	Positivo
10	Xu et al. ⁵⁴	2008	106	D2-40	DVL, IVL	Positivo
11	Petitt et al. ⁵⁵	2009	27	D2-40	IVL	Negativo
12	Doeden et al. ⁵⁶	2009	36	LYVE-1, D2-40	IVL	Positivo
13	Petersson et al. ⁵⁷	2009	36	D2-40	IVL	Positivo
14	Emmett et al. ¹³	2010	102	LYVE-1	DVL (102), IVL (18) ^a	Positivo
15	Fohnet et al. ⁵⁸	2011	64	D2-40	IVL	Positivo
16	Storr et al. ⁵⁹	2012	202	D2-40	DVL (202), IVL (186) ^a	Negativo
17	Shayan et al. ⁶⁰	2012	22	D2-40	DVL	Positivo
18	Xu et al. ⁶¹	2012	251	D2-40	IVL	Positivo

DVL: densidad de vasos linfáticos; IVL: invasión de vasos linfáticos; Negativo: no se encontró asociación estadísticamente significativa; Positivo: asociación estadísticamente significativa.

^a Número de pacientes incluidos en cada parámetro.

presencia de invasión de los vasos linfáticos en preparaciones histológicas de melanomas humanos mediante técnicas de inmunohistoquímica. Asimismo, hemos revisado las referencias bibliográficas de los trabajos seleccionados con el fin de identificar aquellos estudios no detectados por la búsqueda.

El hecho de que algunos autores hayan sido capaces de demostrar el valor pronóstico de la densidad de vasos linfáticos (DVL) y/o de la presencia de invasión de vasos linfáticos (IVL) en pacientes con melanoma, mientras que otros no, podría deberse en parte a la falta del acuerdo en la metodología utilizada hasta el año 2006, año en el que se publicó el primer consenso internacional sobre la metodología de cuantificación de linfangiogenesis en tumores sólidos⁶². En este trabajo se revisan los aspectos más relevantes del proceso de cuantificación de los vasos linfáticos tumorales y se dan una serie de recomendaciones a seguir, con el objetivo de conseguir resultados homogéneos y comparables entre los diferentes estudios.

Varios estudios experimentales en animales han confirmado el papel activo de la linfangiogenesis tumoral, así como el de los factores VEGF-C y VEGF-D en la diseminación del tumor hacia los ganglios linfáticos⁶³. Una sobreexpresión constante de estos factores por las células tumorales incrementa de forma llamativa el crecimiento de los vasos linfáticos del parénquima tumoral, favoreciendo la diseminación metastásica^{64,65}. En el modelo animal de melanoma la sobreexpresión del VEGF-C condujo al incremento en el número de los vasos linfáticos intratumorales y al aumento del diámetro de los vasos peritumorales⁶⁶. De forma similar, en muestras de melanoma humano, los niveles del VEGF-C se han correlacionado tanto con la densidad de los vasos linfáticos en el tumor primario²⁷ como en las metástasis ganglionares en estos pacientes^{21,67,68}.

Importancia de la linfangiogenesis en el ganglio centinela

La mayoría de las publicaciones sobre el papel de la linfangiogenesis en la progresión y diseminación de melanoma se han centrado en el estudio de la morfología y de la funcionalidad de los vasos linfáticos asociados al tumor primario en la piel. Sin embargo, el grupo dirigido por Michael Detmar³³ describió un concepto nuevo que creemos que tiene gran trascendencia para la clínica y las investigaciones futuras. Así, los investigadores demostraron en el modelo animal de cáncer cutáneo que el proceso de linfangiogenesis en el ganglio centinela está activado, incluso antes de que se produzcan las metástasis. Dicho de otro modo, los hallazgos de Detmar et al. sugieren que las células tumorales son capaces de «acondicionar» el lugar donde van a metastatizar. Estos resultados son altamente intrigantes y modifican la imagen estática sobre el cáncer que se ha mantenido durante décadas, al intuir o sospechar la capacidad que tienen los tumores malignos de producir diversos efectos, a distancia del tumor primario, antes de que se produzca la dispersión de las células malignas por el organismo.

Otro hallazgo sorprendente del mismo grupo fue que la presencia de linfangiogenesis en el ganglio centinela se asociaba a una mayor frecuencia de metástasis en los ganglios linfáticos lejanos, y también a una mayor incidencia de

metástasis hematógenas⁶⁹. De nuevo, se trata de un hallazgo de gran trascendencia, pues no habla de que las metástasis linfáticas y las hematógenas no son 2 procesos independientes, sino que están íntimamente relacionados entre sí. El mecanismo que se considera responsable de este fenómeno está ilustrado en la [figura 3](#).

La hipótesis interpretativa permite pensar que, aparentemente, las células tumorales liberan VEGF-A³³ y VEGF-C⁶⁹, que son transportados hacia el ganglio centinela, donde inducen el proceso de linfangiogenesis, proporcionando de esta manera un nicho premetastásico para las células tumorales. Una vez que las células tumorales llegan al primer ganglio se produce un incremento de la concentración del VEGF-A y VEGF-C y, de nuevo, estos factores son transportados a través de los vasos linfáticos hacia los ganglios distantes, produciéndose en ellos una expansión de su red vascular linfática, hallazgos comprobados también en el melanoma⁷⁰. Recordemos que el VEGF-A es un potente factor inductor de la angiogenesis, lo que podría explicar el incremento en la incidencia de las metástasis a distancia observado en tumores con linfangiogenesis activada en el ganglio centinela.

Metodología de cuantificación de los vasos linfáticos en tumores sólidos

La cuantificación de la linfangiogenesis se ha visto dificultada durante años por la falta de marcadores específicos del endotelio linfático. Afortunadamente, en la última década se han identificado y comercializado varios marcadores que se unen de forma selectiva a las células del endotelio linfático, permitiendo diferenciar los vasos linfáticos de los hemáticos en las muestras de tejidos tumorales.

La cuantificación del proceso de linfangiogenesis, al igual que ocurre en el caso de la angiogenesis, es una tarea compleja al tratarse de un proceso dinámico. Por analogía con la angiogenesis, la mayoría de los estudios que evalúan el valor pronóstico de la linfangiogenesis en pacientes con distintos tipos de cáncer se centran en el producto final de la linfangiogenesis, o lo que es lo mismo, la DVL. Para este propósito se han desarrollado diferentes métodos de cuantificación de vasos tumorales, que inicialmente fueron descritos para la cuantificación de los vasos sanguíneos, pero posteriormente fueron aplicados también en los de linfangiogenesis. Entre estos métodos cabría mencionar los siguientes:

Técnica de Weidner

Consiste en cuantificar los vasos linfáticos en los puntos calientes (*hot spots*), definidos como áreas de mayor densidad de vasos⁷¹. Se piensa que la formación de dichos puntos calientes se debe a los cambios locales en los niveles de oxígeno (hipoxia), que inducen la liberación focal de factores prolinfangiogénicos⁶². Los *hot spots* se consideran áreas de importancia biológica, puesto que se originan a partir de células tumorales con un alto potencial angiogénico, células que tendrán mayor facilidad para entrar en la circulación sanguínea o linfática y por tanto producir metástasis por esas vías⁷².

Según la descripción de Weidner (1991) las preparaciones histológicas de los tumores se examinan en primer lugar

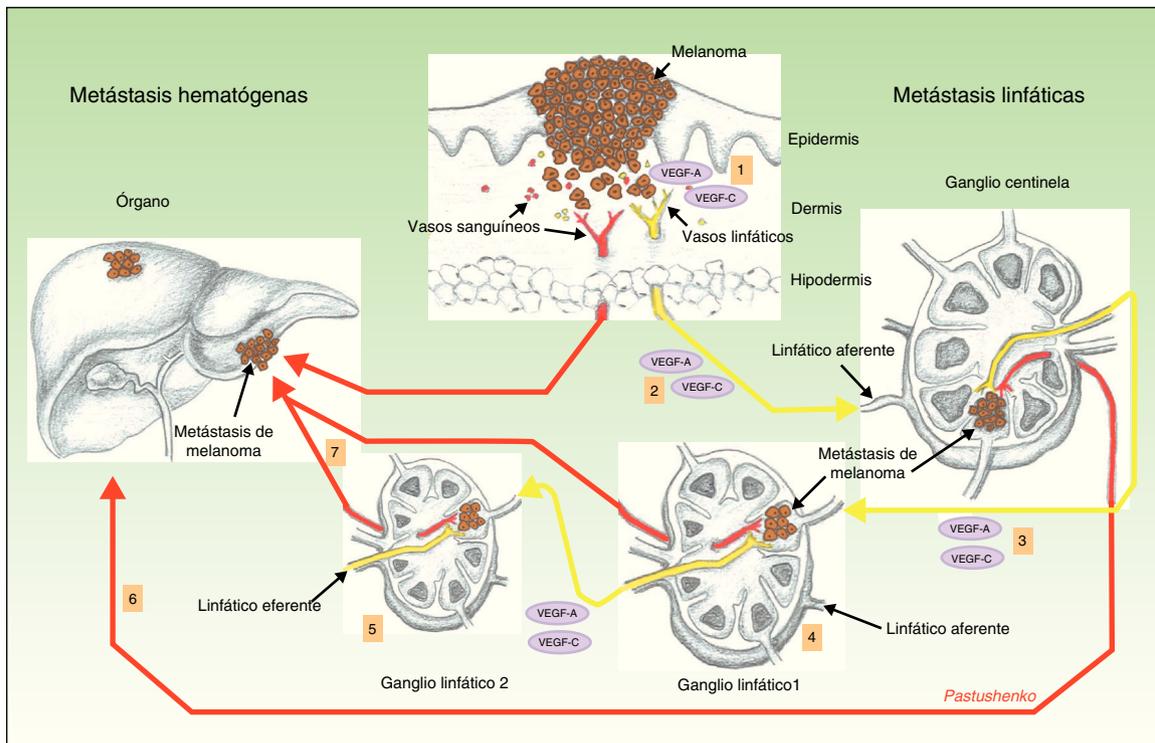


Figura 3 Papel de la linfangiogenesis en la diseminación a distancia de las células neoplásicas. Representa esquemáticamente el papel de la linfangiogenesis en el desarrollo de las metástasis linfáticas y hematogénas. Las células tumorales liberan VEGF-A y VEGF-C, induciendo la proliferación de los vasos linfáticos en tejido conectivo peritumoral (1). Al mismo tiempo, los factores VEGF-A y -C son transportados hacia el ganglio centinela (2), induciendo la proliferación de los vasos sanguíneos y linfáticos en el mismo (nicho pre-metastásico). Una vez que las células tumorales llegan al primer ganglio se produce un incremento de los factores VEGF-A y C, y de nuevo estos son transportados hacia los ganglios distantes (3), facilitando la producción de metástasis hacia los ganglios distantes (4 y 5), así como metástasis hematogénas a distancia, a través del conducto torácico o sistema vascular sanguíneo (6 y 7).

a bajo aumento ($\times 10$), con el fin de identificar los puntos calientes, y posteriormente a mayor aumento ($\times 40$), para cuantificar el número de microvasos en dichos puntos calientes, considerándose como microvaso cualquier célula o grupo de células teñidas con el anticuerpo, claramente separados entre sí. Para definir un microvaso no es necesaria la presencia de luz vascular. En varios estudios se ha encontrado una asociación significativa entre el número de vasos linfáticos en el melanoma primario y un pronóstico evolutivo desfavorable¹⁹.

Método de Chalkley

Este método se basa en la utilización de la *graticula de Chalkley*, que contiene 25 puntos distribuidos de forma aleatoria⁷³. Una vez seleccionados los puntos calientes (de forma similar a la descrita por Weidner) se introduce la graticula en el ocular del microscopio y se va girando, hasta conseguir que un mayor número de puntos se encuentre posicionado sobre las células teñidas con el anticuerpo, o sobre las luces de aquellos vasos cuyas paredes están claramente teñidas con el marcador endotelial (fig. 4A). En lugar de cuantificar el número de vasos, como en la técnica descrita por Weidner, se cuantifican los puntos de la graticula situados sobre las estructuras descritas. La

puntuación obtenida refleja el área relativa ocupada por los vasos linfáticos⁶². Este método se considera más objetivo y reproducible, puesto que evita uno de los pasos más subjetivos en el recuento de los vasos, como es el de decidir si 2 estructuras adyacentes se deben cuantificar como 2 microvasos independientes o si forman parte de una misma estructura vascular⁷².

Sistemas computarizados de cuantificación

El análisis automatizado mediante los sistemas computarizados evidentemente ofrece una valoración de la red vascular tumoral más objetiva y reproducible, además la mayoría de los programas diseñados para este fin permiten obtener información adicional importante, como por ejemplo el área y el perímetro de la luz vascular. Sin embargo, la aplicación generalizada de estos sistemas se ve obstaculizada por la necesidad de equipos especiales con coste económico elevado. Otra limitación de la técnica es la de la observación de que algunos anticuerpos tiñen de forma inespecífica otras estructuras, fácilmente distinguibles de los vasos por el patólogo experto, pero que sin embargo pueden ser confundidas por los sistemas automatizados que captan la señal luminica, sin tener en cuenta la estructura y morfología⁶².

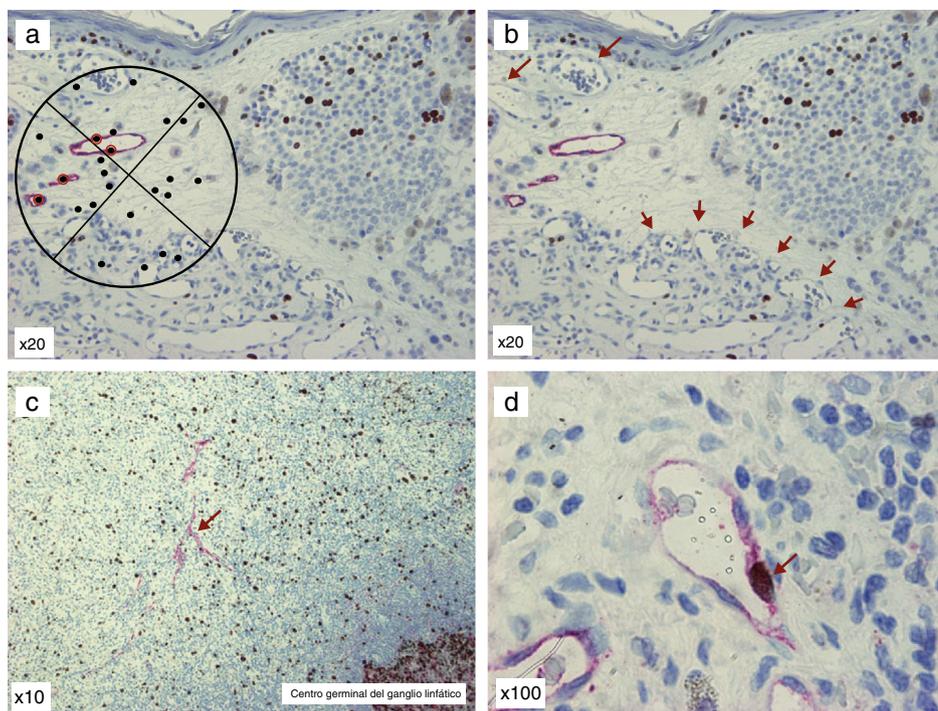


Figura 4 Doble tinción D2-40/Ki-67 de preparaciones de melanoma y su metástasis ganglionar. A. Graticula de Chalkley: nótese que aquellos puntos marcados con halo rojo son los que se consideran positivos. B. Obsérvese los vasos linfáticos positivos para D2-40 en el tumor primario y múltiples vasos sanguíneos D2-40 (-), que se distribuyen en hot spot en la parte inferior de la imagen (flechas). C. Metástasis de melanoma en ganglio centinela, donde se pueden objetivar vasos linfáticos positivos para D2-40 (flecha). D. Metástasis de melanoma en ganglio centinela, pudiéndose observar, a mayor aumento, un vaso linfático en proliferación: fíjese en las paredes del vaso, que son claramente D2-40 positivas (patrón citoplásmico, cromógeno *fast red*, Dako) y el núcleo es positivo para Ki-67 (patrón nuclear, cromógeno DAB, Dako; flecha).

Cálculo de la fracción de células endoteliales linfáticas en proliferación

Se realiza mediante la doble tinción del tejido tumoral con anticuerpos contra endotelio linfático (anti-podoplanina y anti-LYVE-1) y el marcador de células en proliferación (Ki-67 o anti-PCNA). En el melanoma se ha constatado la presencia de vasos linfáticos con núcleos en proliferación^{27,49}, lo que sugiere que existe linfangiogenesis tumoral activa en este tipo de tumor. En la [figura 4B-C](#) se ofrecen ejemplos de imágenes de la doble tinción D2-40/Ki-67.

Perspectivas futuras

Existe evidencia científica cada vez más sólida y mejor definida sobre la importancia de la linfangiogenesis en la progresión y diseminación de los tumores malignos en general y del melanoma cutáneo en particular. Probablemente, la principal razón por la que los parámetros relacionados con la linfangiogenesis tumoral no hayan podido ser incluidos en el análisis rutinario de las preparaciones de melanoma ha sido la falta de consenso en la metodología utilizada en los estudios publicados hasta la fecha, por lo que resulta de gran importancia y trascendencia para los trabajos futuros seguir las recomendaciones de los expertos internacionales⁶².

Un supuesto hipotético de gran relevancia en el futuro de estas investigaciones sería que la linfangiogenesis pudiese ser determinada a través de los marcadores en suero de

los pacientes que padecen esta enfermedad tumoral. Sería el caso, por ejemplo, de la monitorización de los niveles del VEGF-C en suero. Avalando este supuesto, en un estudio publicado recientemente se han encontrado niveles más bajos del VEGF-C en suero de los pacientes con satelitosis o metástasis subcutáneas próximas a la lesión primaria de melanoma, en comparación con aquellos con metástasis a distancia⁶⁸. Esta hipotética posibilidad de estudio tiene sus dificultades de valoración, ya que los niveles del VEGF-C circulantes son muy diferentes de unos individuos a otros⁷⁴, por lo que aún no se dispone de datos concluyentes que permitan con garantías la utilización del VEGF-C u otros factores prolinfangiogenéticos en suero, como indicadores pronósticos en pacientes con melanoma.

Estas hipótesis de futuro permiten plantearse casi inevitablemente la pregunta de si inhibiendo los factores VEGF-C, VEGF-D o su receptor VEGFR-3 conseguiríamos un efecto terapéutico en pacientes con melanoma. Estudios experimentales en diferentes tipos de neoplasias (carcinoma gástrico, carcinoma de mama), parecen apuntar en el sentido de que los anticuerpos neutralizantes frente al VEGF-D⁷⁵ y al VEGFR-3⁷⁶⁻⁷⁸ son capaces de inhibir la linfangiogenesis tumoral y las metástasis en modelos animales. Por lo tanto, el proceso de linfangiogenesis tumoral merece ser tomado en consideración tanto como marcador pronóstico, como una posible futura diana terapéutica.

Finalmente, la importancia de la linfangiogenesis tumoral en el ganglio centinela, incluso previa a la aparición

de metástasis, sugiere que su determinación podría tener valor en el diagnóstico precoz o incluso en la prevención de metástasis, detectándose mediante técnicas de imagen en pacientes a los que se les ha extirpado un melanoma⁷⁹.

En este trabajo hemos expuesto una serie de hipótesis y dudas razonables sobre el estado del conocimiento actual de la linfangiogénesis tumoral relativo al melanoma, basándonos en la revisión de los datos bibliográficos y en la experiencia propia sobre algunos parámetros manejados por nosotros, que esperamos nos permitan, en un futuro medio-próximo, aportar algunos resultados de interés general en el campo de la dermatología.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores de este trabajo quieren expresar su agradecimiento a K. Kokoriev e Y. Pastushenko por su inestimable ayuda en la elaboración de los esquemas.

Bibliografía

1. Forsea AM, del Marmol V, de Vries E, Bailey EE, Geller AC. Melanoma incidence and mortality in Europe: New estimates, persistent disparities. *Br J Dermatol.* 2012;167:1124–30.
2. MacKie RM, Hauschild A, Eggermont AM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol.* 2009;20 Suppl 6:vi1–7.
3. Bhatia S, Thompson JA. Systemic therapy for metastatic melanoma in 2012: Dawn of a new era. *J Natl Compr Canc Netw.* 2012;10:403–12.
4. Wolchok JF, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 2013;369:122–33.
5. Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med.* 2013;369:134–44.
6. Young K, Minchom A, Larkin J. BRIM-1, -2 and -3 trials: Improved survival with vemurafenib in metastatic melanoma patients with BRAF (V600E) mutation. *Future Oncol.* 2012;8:499–507.
7. Mangas C, Paradelo C, Puig S, Gallardo F, Marcoval J, Azon A, et al. Initial evaluation, diagnosis, staging, treatment, and follow-up of patients with primary cutaneous malignant melanoma. Consensus statement of the Network of Catalan and Balearic Melanoma Centers. *Actas Dermosifiliogr.* 2010;101:129–42.
8. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009;27:6199–206.
9. Coit DG, Andtbacka R, Anker CJ, Bichakjian CK, Carson WE, Daud A, et al. Melanoma, version 2.2013: Featured updates to the NCCN guidelines. *J Natl Compr Cancer Netw.* 2013;11:395–407.
10. Dummer R, Hauschild A, Guggenheim M, Keilholz U, Pentheroudakis G, ESMO Guidelines Working Group. Cutaneous melanoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2012;23 Suppl 7:vii86–91.
11. Australian cancer network melanoma guidelines revision working party. Clinical practice guidelines for the management of melanoma in Australia and New Zealand. Wellington: Cancer Council Australia and Australian Cancer Network, Sydney and New Zealand Guidelines Group; 2008.
12. Fong ZV, Tanabe KK. Comparison of melanoma guidelines in the United States, Canada, Europe, Australia and New Zealand. A critical appraisal and comprehensive review. *Br J Dermatol.* 2014;170:20–30.
13. Emmett MS, Symonds KE, Rigby H, Cook MG, Price R, Metcalfe C, et al. Prediction of melanoma metastasis by shields index based on lymphatic vessel density. *BMC Cancer.* 2010;210:208.
14. Criscione VD, Weinstock MA. Melanoma thickness trends in the United States, 1988-2006. *J Invest Dermatol.* 2010;130:793–7.
15. Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: A systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res.* 2004;64:2941–55.
16. Trivella M, Pezzella F, Pastorino U, Harris AL, Altman DG. Microvessel density as a prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma: A meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol.* 2007;8:488–99.
17. Meert AP, Peasmans M, Martin B, Delmotte P, Berghmans T, Verdebout JM, et al. The role of microvessel density on the survival of patients with lung cancer: A systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer.* 2002;87:694–701.
18. Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Morere JF, Benamouzig R, et al. Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. *Br J Cancer.* 2006;94:1823–32.
19. Straume O, Salvesen HB, Akslen LA. Angiogenesis is prognostically important in vertical growth phase melanomas. *Int J Oncol.* 1999;15:595–9.
20. Valencak J, Heere-Ress E, Kopp T, Schoppmann SF, 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;40:358–64.
21. Dadras SS, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Nguyen L, Vora A, Muzikansky A, et al. Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Mod Pathol.* 2005;18:1232–42.
22. Demirkessen C, BüyükpınarbasılıN, Ramazanoglu R, Oguz O, Mandel NM, Kaner G. The correlation of angiogenesis with metastasis in primary cutaneous melanoma: A comparative analysis of microvessel density, expression of vascular endothelial growth factor and basic fibroblastic growth factor. *Pathology.* 2006;38:132–7.
23. Carnochan P, Briggs JC, Westbury G, Davies AJ. The vascularity of cutaneous melanoma: A quantitative histological study of lesions 0.85-1.25 mm in thickness. *Br J Cancer.* 1991;64:102–7.
24. Barnhill RL, Busam KJ, Berwick M, Blessing K, Cochran AJ, Elder DE, et al. Tumor vascularity is not a prognostic factor for cutaneous melanoma. *Lancet.* 1994;344:1237–8.
25. Graham CH, Rivers J, Kerbel RS, Stankiewicz KS, White WL. Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin (<0.76 mm) malignant melanomas. *Am J Pathol.* 1994;145:510–4.
26. Busam KJ, Berwick M, Blessing K, Fandrey K, Kang S, Karaoli T, et al. Tumor vascularity is not a prognostic factor for malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol.* 1995;147:1049–56.
27. Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, Brown LF, Muzikansky A, Jackson DG, et al. Tumor lymphangiogenesis: A novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol.* 2003;162:1951–60.
28. Pastushenko I, Vermeulen PB, Carapeto FJ, Van den Eynden GG, Rutten A, Ara M, et al. Blood microvessel density, lymphatic microvessel density and lymphatic invasion in predicting melanoma metastases: Systematic review and meta-analysis. *Br J Dermatol.* 2014;170:66–77.

29. Orlandini M, Marcocini L, Ferruzzi R, Oliviero S. Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:11675-80.
30. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lathinen I, Kukk E, et al. A novel vascular endothelial growth factor. VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*. 1996;15:1751.
31. Yamada Y, Nezu J, Shimane M, Hirata Y. Molecular cloning of a novel vascular endothelial growth factor, VEGF-D. *Genomics*. 1997;42:483-8.
32. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Minen T, Vitali A, Wilks AF, et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:548-53.
33. Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, Kajiyama K, Brown LF, Detmar M. VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J Exp Med*. 2005;201:1089-99.
34. Karkkainen MJ, Saario A, Jussila L, Karila KA, Lawrence EC, Pajusola K, et al. A model of gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:12677-82.
35. Kajiyama K, Hirakawa S, Ma B, Drinnenberg I, Detmar M. Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function. *EMBO J*. 2005;24:1885-95.
36. Shin JW, Min M, Larrieu-Lahargue F, Canron X, Kunstfeld R, Nguyen L, et al. Prox1 promotes lineage-specific expression of fibroblast growth factor (FGF) receptor-3 in lymphatic endothelium: A role for FGF signaling in lymphangiogenesis. *Mol Biol Cell*. 2006;17:576-84.
37. Cao R, Bjorndahl MA, Religa P, Clasper S, Garvin S, Galter D, et al. PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *Cancer Cell*. 2004;6:333-45.
38. Bjorndahl M, Cao R, Nissen LJ, Clasper S, Johnson LA, Xue Y, et al. Insulin-like growth factors 1 and 2 induce lymphangiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:15593-8.
39. Bracher A, Cardona AS, Tauber S, Fink AM, Steiner A, Pehamberger H, et al. Epidermal growth factor facilitates melanoma lymph node metastasis by influencing tumor lymphangiogenesis. *J Invest Dermatol*. 2013;133:230-8.
40. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis development and human disease. *Nature*. 2005;438:946-53.
41. Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, et al. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol*. 1999;144:789-801.
42. Schacht V, Dadrass SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol*. 2005;166:913-21.
43. Kahn HJ, Bailey D, Marks A. Monoclonal antibody D2-40, a new marker of lymphatic endothelium, reacts with Kaposi's sarcoma and a subset of angiosarcomas. *Mod Pathol*. 2002;15:434-40.
44. Essner R, Scheri R, Kavanagh M, Torisu-Itakura H, Wanek LA, Morton DL. Surgical management of the groin lymph nodes in melanoma in the era of sentinel lymph node dissection. *Arch Surg*. 2006;141:877-82.
45. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*. 2001;19:3635-48.
46. Cuchet E, Pinel N, Corcella D, Vuillez JP, Lebeau J, Moutet F, et al. Sentinel lymph node biopsy in cutaneous melanoma: Outcome after 5-years follow-up. *Eur J Dermatol*. 2007;15:387-91.
47. De Waal RM, van Altena MC, Erhard H, Weidle UH, Nooijen PT, Ruiter DJ. Lack of lymphangiogenesis in human primary cutaneous melanoma. Consequences for the mechanism of lymphatic dissemination. *Am J Pathol*. 1997;150:1951-7.
48. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, et al. Lymphatic metastasis in absence of functional intratumor lymphatics. *Science*. 2002;296:1883-6.
49. Straume O, Jackson DG, Akslen LA. Independent prognostic impact of lymphatic vessel density and presence of low-grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res*. 2003;9:250-6.
50. Shields JD, Borsetti M, Rigby H, Harper SJ, Mortimer PS, Levick JR, et al. Lymphatic density and metastatic spread in human malignant melanoma. *Br J Cancer*. 2004;90:693-700.
51. Sahni D, Robson A, Orchard G, Szydio R, Evans AV, Russell-Jones R. The use of LYVE-1 antibody for detecting lymphatic involvement in patients with malignant melanoma of known sentinel node status. *J Clin Pathol*. 2005;58:715-21.
52. Massi D, Puig S, Franchi A, Malvey J, Vidal-Sicart S, González-Cao M, et al. Tumor lymphangiogenesis is a possible predictor of sentinel lymph node status in cutaneous melanoma: A case-control study. *J Clin Pathol*. 2006;59:166-73.
53. Niakosari F, Kahn HJ, McCready D, Ghazarian D, Rotstein LE, Marks A, et al. Lymphatic invasion identified by monoclonal antibody D2-40, younger age, and ulceration: Predictors of sentinel lymph node involvement in primary cutaneous melanoma. *Arch Dermatol*. 2008;144:462-7.
54. Xu X, Gimotty PA, Guerry D, Karakousis G, Van Belle P, Liang H, et al. Lymphatic invasion revealed by multispectral imaging is common in primary melanomas and associates with prognosis. *Hum Pathol*. 2008;39:901-9.
55. Pettitt M, Allison A, Shimoni T, Uchida T, Raimer S, Kelly B. Lymphatic invasion detected by D2-40/S-100 dual immunohistochemistry does not predict sentinel lymph node status in melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2009;61:819-28.
56. Doeden K, Ma Z, Narasimhan B, Sweetter SM, Detmar M, Dadrass SS. Lymphatic invasion in cutaneous melanoma is associated with sentinel lymph node metastasis. *J Cutan Pathol*. 2009;36:772-80.
57. Petersson F, Diwan AH, Ivan D, Gershenwald JE, Johnson MM, Harrell R, et al. Immunohistochemical detection of lymphovascular invasion with D2-40 in melanoma correlates with sentinel lymph node status, metastasis and survival. *J Cutan Pathol*. 2009;36:1157-63.
58. Fohn LE, Rodriguez A, Kelley MC, Ye F, Shyr Y, Strickin G, et al. D2-40 lymphatic marker for detecting lymphatic invasion in thin to intermediate thickness melanomas: Association with sentinel lymph node status and prognostic value- a retrospective case study. *J Am Acad Dermatol*. 2011;64:336-45.
59. Storr SJ, Safuan S, Mitra A, Elliott F, Walker C, Vasko MJ, et al. Objective assessment of blood and lymphatic vessel invasion and association with macrophage filtration in cutaneous melanoma. *Mod Pathol*. 2012;25:493-504.
60. Shayan R, Karnezis T, Murali R, Wilmott JS, Ashton MW, Taylor GI, et al. Lymphatic vessel density in primary melanomas predicts sentinel lymph node status and risk of metastasis. *Histopathology*. 2012;61:702-10.
61. Xu X, Chen L, Guerry D, Dawson PR, Hwang WT, VanBelle P, et al. Lymphatic invasion is independently prognostic of metastasis in primary cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res*. 2012;18:229-37.
62. Van der Auwera I, Cao Y, Tille JC, Pepper MS, Jackson DG, Fox SB, et al. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumors. *Br J Cancer*. 2006;95:1611-25.
63. Tobler NE, Detmar M. Tumor and lymph node lymphangiogenesis-impact on cancer metastasis. *J Leukoc Biol*. 2006;80:691-6.

64. Skobe M, Hawighorts T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, et al. Induction of tumourlymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med.* 2001;7:192–8.
65. Von Marshall Z, Scholz A, Stacker SA, Achen MG, Jackson DG, Alves S, et al. Vascular endothelial growth factor-D induces lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in models of ductal pancreatic cancer. *Int J Oncol.* 2005;27:669–79.
66. Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T, Schirner M, Wolf GL, Alitalo K, et al. Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol.* 2001;159:893–903.
67. Schietroma C, Cianfarani F, Lacal PM, Odorisio T, Orecchia A, Kanitakis J, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression correlates with lymph node localization of human melanoma metastases. *Cancer.* 2003;98:789–97.
68. Vihinen PP, Hilli J, Vuoristo MS, Syrjänen KJ, Kähäri VM, Pyrhönen SO. Serum VEGF-C is associated with metastatic site in patients with malignant melanoma. *Acta Oncol.* 2007;46:678–84.
69. Hirakawa S, Brown LF, Kodama S, Paavonen K, Alitalo K, Detmar M. VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. *Blood.* 2007;109:101–17.
70. Harrell MI, Iritani BM, Ruddell A. Tumour-induced sentinel lymph node lymphangiogenesis and increased lymph flow precede melanoma metastasis. *Am J Pathol.* 2007;170:774–86.
71. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumour angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991;324:1–8.
72. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer.* 2002;38:1564–79.
73. Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count and computer image analysis. *J Pathol.* 1995;177:275–83.
74. Tamura M, Ohta Y. Serum vascular endothelial growth factor-C level in patients with primary nonsmall cell lung carcinoma: A possible diagnostic tool for lymph node metastasis. *Cancer.* 2003;98:1217–22.
75. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med.* 2001;7:186–91.
76. Shimizu K, Kubo H, Yamaguchi K, Kawashima K, Ueda Y, Matsuo K, et al. Suppression of VEGFR-3 signaling inhibits lymph node metastasis in gastric cancer. *Cancer Sci.* 2004;95:328–33.
77. Roberts N, Kloos B, Cassella M, Podgrabinska S, Persaud K, Wu Y, et al. Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2. *Cancer Res.* 2006;66:2650–7.
78. Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Yl Hertzuala S, Jäättelä M, et al. Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res.* 2001;61:1786–90.
79. Rinderknecht M, Detmar M. Tumor lymphangiogenesis and melanoma metastasis. *J Cell Physiol.* 2008;216:347–54.