



GRUPPO DI STUDIO

TUMORI CUTANEI

**PROCEDURE OPERATIVE NEL LINFONODO
SENTINELLA DEL MELANOMA: UNA PROPOSTA**

A cura di:

Alberto Pisacane

Il documento è stato valutato e validato dai componenti della:

Sezione Regionale della Società Italiana di Anatomia patologica

- SIAPEC -

&

da tutto il gruppo di studio sui TUMORI CUTANEI così costituito:

*Bertero Michele, Carnevale Fabrizio, Colombo Enrico, Farnetti Alessandra,
Gattoni Massimo, Giacalone Angela, Giacone Elena Francesca, Guzzetti Stefano,
Landra Marino, Macripò Giuseppe, Norat Maurizio, Ocelli Marcella, Pala Cinzia,
Palenzona Carlo, Pisacane Alberto, Pochettino Paolo, Quaglino Pietro, Rondonotti David,
Rossotto Gianluca, Santoro Luigi, Scatolini Maria, Senetta Rebecca, Tessa Maria,
Venesio Tiziana, Zaccagna Alessandro.*

Indice.

Introduzione	pag. 4
Invio del SLN	pag. 4
Esame intraoperatorio del SLN	pag. 4
Processazione del SLN	pag. 4
Protocolli di taglio e colorazione	pag. 5
Proposta per un nuovo protocollo	pag. 9
Immunistoichimica	pag. 11

Bibliografia

Introduzione.

La presenza di focolai di melanoma metastatico nel linfonodo sentinella costituisce uno dei parametri prognostici di maggior peso. Inoltre la loro determinazione è un dato sempre più importante nella decisione di applicare conseguenti soluzioni terapeutiche, a partire dalla dissezione linfonodale completa, fino alla inclusione in eventuali trials terapeutici.

Nella maggior parte dei pazienti è identificabile un singolo linfonodo sentinella (SLN), tuttavia non sono rari i casi in cui i linfonodi siano due o anche tre, mentre è difficile che il loro numero sia superiore.

E' fondamentale sottolineare quanto le metodiche di esame del SLN siano mirate, dettagliate e impegnative per il patologo e per il Laboratorio di Anatomia Patologica, e quanto sia importante applicarle ad ogni SLN. E' pertanto altrettanto importante che ogni linfonodo sentinella inviato sia effettivamente un SLN per non sottoporre il personale tecnico e lo stesso patologo ad un inutile superlavoro e la Struttura Operativa ad una spesa inappropriata.

INVIO DEL SLN

Il SNL deve essere inviato intatto, preferibilmente con una sottile rima di tessuto adiposo circostante. Il chirurgo deve evitare per quanto possibile artefatti da schiacciamento o diatermocoagulazione. Non è necessario alcun reperaggio di zone particolari del frammento operatorio.

ESAME INTRAOPERATORIO DEL SLN

E' fortemente sconsigliato l'esame intraoperatorio del SLN previo congelamento al fine di evitare inutile perdita di tessuto durante le manovre di allestimento dei preparati e la perdita di dettaglio morfologico dovuto al congelamento stesso. La sensibilità di tale esame nella detezione di depositi neoplastici millimetrici, già molto bassa su tessuto congelato (29%), diminuisce ulteriormente su preparati isto/citologici allestiti diversamente, da tessuto fresco.

PROCESSAZIONE DEL SLN

Dopo un minimo di 12 ore in formalina, il processo di fissazione si può considerare completato. Ogni SLN verrà pertanto sottoposto a riduzione macroscopica secondo due modalità alternative:

- 1) Metodo del “Bread Loafing”: ogni SLN con dimensione \geq a 5 mm viene interamente sezionato lungo l’asse minore ad intervalli di 2-3 mm. Le sezioni ottenute da ogni singolo SLN possono essere messe, dimensioni permettendo, in un’unica biocassetta.

Vantaggi: valutazione esaustiva della capsula e del seno marginale.

- 2) Metodo del “Bivalving”: il linfonodo è sezionato lungo l’asse maggiore, a partire dall’ilo, ad intervalli di 3-4 mm.

Vantaggi: fase di campionamento e tempi tecnici leggermente più rapidi.

Svantaggi: con i protocolli di allestimento più utilizzati scopre una minore superficie tissutale e capsulare.

Il metodo “Bivalving” è stato concepito al fine di scoprire quanta più superficie di linfonodo peri-ilare, su cui la maggior parte dei protocolli istologici per il SLN del melanoma focalizza l’attenzione.

Tale interesse origina da una vecchia, e ormai smentita, segnalazione, che identificava nelle aree linfonodali peri-ilari le sedi più frequentemente coinvolte da metastasi precoce.

PROTOCOLLI DI TAGLIO E COLORAZIONE

La frequenza di positività del SLN varia a seconda del protocollo utilizzato, e sembra comunque fortemente dipendente dal numero di sezioni esaminate da ciascun linfonodo. Poiché i primi studi sul SLN in corso di melanoma suggerivano che le metastasi si localizzassero a partire dalla porzione centrale (peri-ilare) del SLN, la maggior parte di protocolli messi a punto, e ancora oggi ampiamente utilizzati, focalizza l’attenzione esclusivamente su questa regione. Tra questi, i più diffusi sono:

- 1) **MIA protocol** (Melanoma Institute of Australia): tipo di sezione macroscopica “bivalving”
Quattro sezioni seriate da ogni metà linfonodale, di cui due (I e IV) colorate con ematossilina-eosina (HE) e due immunocolorate rispettivamente con S100 e HMB45



Fig 1: metà linfonodale; in nero istotopografia e % di superficie esaminata

Protocollo MIA: quattro sezioni seriate da ogni metà linfonodale.

Svantaggi: permette l'esame di una limitata porzione del linfonodo; non "vede" le porzioni periferiche

Vantaggi: tempi tecnici (sostanzialmente allestimento dei preparati) e tempi medici (lettura dei preparati) molto contenuti.

2) **WHO Melanoma Program:** tipo di sezione macro "bread loafing".

Prima sezione colorata con HE. Se negativa per metastasi seguono 10 sezioni (da ciascuna biocassetta), di cui la I e la VI immunocolorate con S100; la II e la VII colorate con HE e la III, IV, V, VIII, IX e X in "bianco" a disposizione per ulteriori eventuali colorazioni.

Svantaggi: permette l'esame di una limitata porzione del linfonodo (fig.2); non "vede" le porzioni periferiche.



Fig 2: metà linfonodale; in grigio istotopografia e % di superficie esaminata

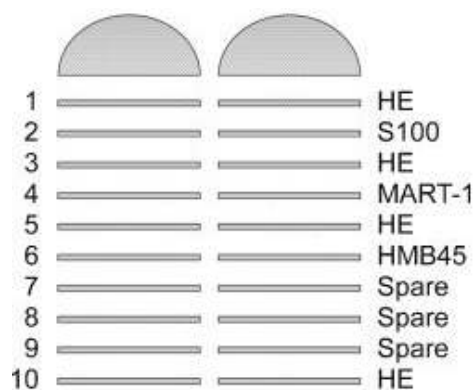
3) **Augsburg Consensus (Cochrane 2000):** tipo di sezione macro: "bivalving".



Allestite 10 sezioni, la n. 1, 3, 5 e 10 vengono colorate con HE; la n.2 immunocolorata con S100; la n. 4 immunocolorata con HMB45; le rimanenti sono in "bianco" o come controllo per l'immunoistochimica (v. schema).

4) **Protocollo UCLA (Cochran 2006):** tipo di sezione “bivalving”.

Allestite 10 sezioni; è simile all’Augsburg ma la sezione n. 6 viene colorata con HMB45 e la n. 7, 8 e 9 vengono lasciate in “bianco” (a disposizione per eventuali altre colorazioni/immunocolorazioni).



Sequence may be repeated if needed

Svantaggi dei protocolli 3,e 4: permettono l’esame di una limitata porzione del linfonodo; non “vedono” le porzioni periferiche (fig.2).

5) **Protocollo EORTC:** tipo di sezione “bivalving”.

Vengono tagliate 20 sezioni istologiche suddivise in gruppi da 3 sezioni (quattro gruppi); da 6 sezioni (un gruppo) e 2 sezioni (un gruppo). I gruppi sono separati tra loro da 50 micron di tessuto “sacrificato”

Alcune sezioni vengono colorate con HE; altre immunocolorate come illustrato nello schema.



Schema protocollo EORTC

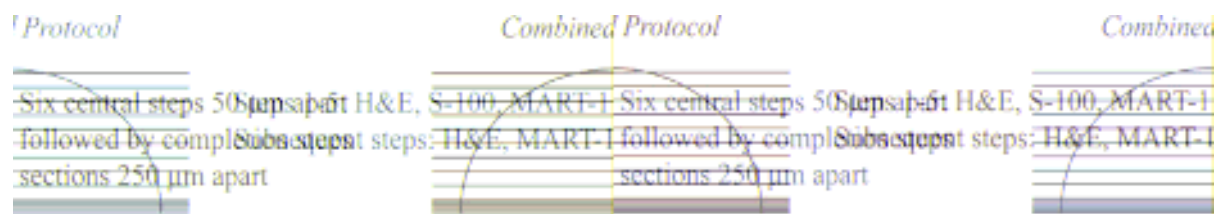


Fig 3: metà linfonodale; in grigio isotopografia e % superficie esaminata

Vantaggi: permette l'esame anche se parziale dei distretti periferici del linfonodo. Permette l'identificazione di metastasi/micrometastasi nel 33% dei linfonodi esaminati (contro il 20% dei linfonodi esaminati con Cochran e UCLA protocol).

6) Protocollo "Combined": tipo di sezione "bivalving"

Questo protocollo, proposto dal gruppo danese di Riber-Hansen, nasce dall'evidenza che le metastasi/micrometastasi di melanoma, si distribuiscono, nel SNL, con uguale frequenza tanto nei distretti centrali (peri-ilari) quanto in quelli periferici. A questo proposito è stato necessario introdurre una procedura di esame che prevedesse lo studio dell'intera superficie linfonodale.



Schema del protocollo “combined”: le due metà linfonodali vengono interamente sezionate dapprima come da protocollo EORTC, successivamente l’esame viene completato con tagli su livelli intervallati di 250 micron. Ad ogni livello si ricavano 2 sezioni di cui una viene colorata con ematossilina-eosina e l’altra con MART-1

Vantaggi: aumenta di circa il 7% le probabilità di trovare una micrometastasi rispetto al protocollo EORTC. Svantaggi: tecnicamente lungo e impegnativo. Intervalli di 250 micron troppo ampi.

Il protocollo “combined”, è solo l’ultimo in termini cronologici di una serie di studi simili, mirati all’intero esame del linfonodo sentinella (vedi ad es. il protocollo “enhanced” di Spanknebel e Rosai, 2005), che hanno costantemente portato all’effettivo incremento di microfocolai metastatici reperiti. A fronte di questo dato, certamente significativo, non si può tuttavia non considerare quanto, ognuno di questi protocolli, sia impegnativo e gravoso sia per il comparto tecnico destinato all’allestimento di lunghe serie di preparati, che per il patologo deputato alla lettura, che costantemente consiste nella ricerca di microscopici gruppi di cellule.

PROPOSTA PER UN NUOVO PROTOCOLLO

Fermo restando che i protocolli sopra elencati, sono tutti (chi più chi meno), ovunque accettati e/o applicati, alla luce comunque della necessità di estendere l’esame all’intera superficie del SLN, potrebbe essere utile e assai pratico, pensare di “approfittare” dell’esperienza di gruppi di studio sul linfonodo sentinella, in corso di neoplasie di diversa natura.

A questo proposito si potrebbe implementare, anche se con alcune modifiche operative, l’efficace modello di esame del SLN in corso di carcinoma della mammella, segnalato da Pietribiasi et al. (Pathologica 2006), con il concreto ed immediato vantaggio di applicare, ad una diversa patologia, una metodica conosciuta, affidabile e poco gravosa.

In sintesi tale protocollo, modificato per il melanoma, prevede serie di due sezioni intervallate di 100 micron, sino ad esaurimento del linfonodo, come di seguito indicato:

Tipo di sezione macroscopica: “bivalving” o “bread loafing”, con fette di linfonodo dello spessore di 3-4 mm, poste in 1 o, se necessario, 2 biocassette.

LIVELLO 1 (Sezione 1: HE; Sezione 2: S100)

GAP 100 micron

LIVELLO 2 (Sezione 3: HE; Sezione 4: Melan-A oppure HMB45, o altro)

GAP 100 micron

LIVELLO 3 (Sezione 5: HE; Sezione 6: bianca)

GAP 100 micron

LIVELLO 4 - GAP 100 micron - LIVELLO 5 - GAP 100 micron - LIVELLO 6 - GAP 100 micron:
solo sezioni bianche

LIVELLO 7 (Sezione 13: HE; Sezione 14: S100)

GAP 100 micron

LIVELLO 8 (Sezione 15: HE; Sezione 16: Melan-A oppure HMB45 o altro)

GAP 100 micron

LIVELLO 9 (Sezione 17: HE; Sezione 18: bianca)

LIVELLO 10 - GAP 100 micron - LIVELLO 11 - GAP 100 micron - LIVELLO 12 - GAP 100
micron: solo sezioni bianche

LIVELLO 13 (Sezione 25: HE; Sezione 26: S100)

GAP 100 micron

LIVELLO 14 (Sezione 27: HE; Sezione 28: Melan-A oppure HMB45 o altro)

GAP 100 micron

LIVELLO 15 (Sezione 28: HE; Sezione 29: bianca)

In questo caso, su un linfonodo esauritosi in 15 livelli, abbiamo prodotto 3 HE e 2 Immunocolorazioni dai distretti peri-ilare (livello 1, 2 e 3), intermedio (livello 7, 8 e 9) e periferico (livello 13, 14 e 15), per un totale di 9 HE e 6 Immunocolorazioni ed abbiamo un sufficiente numero di sezioni non colorate per eventuali ulteriori approfondimenti.

IMMUNOISTOCHEMICA

Nella totalità dei protocolli esaminati l'anticorpo costantemente utilizzato è stato l'S100. A questo sono stati affiancati, di volta in volta, il Melan-A e l'HMB45 con maggior frequenza. L'unico suggerimento che si trae pertanto dalle varie esperienze riportate è quello utilizzare un pannello costituito da almeno due anticorpi, di cui uno deve essere l'S100 e l'altro a scelta.

Bibliografia.

- 1) [Location of melanoma metastases in sentinel lymph nodes: what are the implications for histologic processing of sentinel lymph nodes in routine practice?](#)
Murali R, Thompson JF, Scolyer RA. Am J Surg Pathol. 2010 Jan;34(1):127-9
- 2) [Sentinel lymph node biopsy in cutaneous melanoma: the WHO Melanoma Program experience.](#)
Cascinelli N, Belli F, Santinami M, Fait V, Testori A, Ruka W, Cavaliere R, Mozzillo N, Rossi CR, MacKie RM, Nieweg O, Pace M, Kirov K. Ann Surg Oncol. 2000 Jul;7(6):469-74.
- 3) [The Augsburg Consensus. Techniques of lymphatic mapping, sentinel lymphadenectomy, and completion lymphadenectomy in cutaneous malignancies.](#) Cochran A J et al. [Cancer](#). 2000 Jul 15;89(2):236-41.
- 4) [Clinically relevant information from sentinel lymph node biopsies of melanoma patients.](#) Wen DR, Cochran AJ, Huang RR, Itakura E, Binder S. J Surg Oncol. 2011 Sep;104(4):369-78. doi: 10.1002/jso.21818. Review
- 5) [The development of optimal pathological assessment of sentinel lymph nodes for melanoma.](#)
Cook MG, Green MA, Anderson B, Eggermont AM, Ruiters DJ, Spatz A, Kissin MW, Powell BW; EORTC Melanoma Group. J Pathol. 2003 Jul;200(3):314-9
- 6) [The nodal location of metastases in melanoma sentinel lymph nodes.](#)
Riber-Hansen R, Nyengaard JR, Hamilton-Dutoit SJ, Steiniche T.
Am J Surg Pathol. 2009 Oct;33(10):1522-8
- 7) [Treatment influencing down-staging in EORTC Melanoma Group sentinel node histological protocol compared with complete step-sectioning: a national multicentre study.](#) Riber-Hansen R, Hastrup N, Clemmensen O, Behrendt N, Klausen S, Ramsing M, Spaun E, Hamilton-Dutoit SJ, Steiniche T. Eur J Cancer. 2012 Feb;48(3):347-52
- 8) [Characterization of micrometastatic disease in melanoma sentinel lymph nodes by enhanced pathology: recommendations for standardizing pathologic analysis.](#)

Spanknebel K, Coit DG, Bieligk SC, Gonen M, Rosai J, Klimstra DS.

Am J Surg Pathol. 2005 Mar;29(3):305-17

- 9) [Sentinel and nonsentinel node status in stage IB and II melanoma patients: two-step prognostic indicators of survival](#). Cascinelli N, Bombardieri E, Bufalino R, Camerini T, Carbone A, Clemente C, Lenisa L, Mascheroni L, Maurichi A, Pennacchioli E, Patuzzo R, Santinami M, Tragni G. J Clin Oncol. 2006 Sep 20;24(27):4464-71
- 10) [Pathologic examination of sentinel lymph nodes from melanoma patients](#). Scolyer RA, Murali R, McCarthy SW, Thompson JF. Semin Diagn Pathol. 2008 May;25(2):100-11.
- 11) [Sentinel lymph node biopsies for cutaneous melanoma](#). Wick MR, Patterson JW. Am J Surg Pathol. 2005 Mar;29(3):412-4
- 12) [Protocol for diagnostic assessment of sentinel lymph node in breast pathology: a proposal of SIAPEC-IAP, Piemonte Region, Italy](#). Pietribiasi F, De Rosa G, Arisio R, Bagnato R, Ravarino N, Pavesi M, Canavese G, Castellano I, Sapino A; SIAPEC-IAP Piemonte. Pathologica. 2006 Jun;98(3):167-70