

## L'incremento della concentrazione sierica della proteina S-100 è un marcatore di metastasi nel melanoma maligno? Quattro anni di esperienza

M. Governa<sup>a</sup>, R.M. Dorizzi<sup>b</sup>, A. Tambuscio<sup>a</sup>, C. Monese<sup>a</sup>, A. Ferrari<sup>b</sup>, P. Rizzotti<sup>b</sup>, D. Barisoni<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Divisione di Chirurgia Plastica e Centro Ustioni

<sup>b</sup>Laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia, Azienda Ospedaliera di Verona

**Premesse.** L'incidenza di melanoma maligno è in continuo aumento negli ultimi anni e il follow up post chirurgico è tuttora caratterizzato da frequenti metastasi. La proteina S-100 viene prodotta da numerosi tipi di cellule fra cui quelle che originano dalla cresta neurale. L'S-100 è stato proposto per il follow up della malattia poiché la sua concentrazione è risultata in relazione con la progressione di tale malattia.

**Metodi.** Dall'ottobre 1999 all'ottobre 2003 la concentrazione sierica della proteina S-100 è stata misurata in 880 campioni ottenuti da 178 pazienti consecutivi affetti da melanoma maligno istologicamente confermato. La concentrazione dell'S-100 è stata misurata con un sistema basato su tre anticorpi monoclonali diretti contro la subunità B dell'S-100 bovina e utilizzando un analizzatore automatizzato in chemiluminescenza (Liaison, Diasorin, Saluggia, Italia). Questo metodo, richiedendo meno di un'ora

di tempo, è molto più veloce rispetto alla tecnologia utilizzata nella maggior parte degli studi analoghi nello stesso campo e permette al chirurgo di utilizzare l'S-100 nel follow up della malattia.

**Risultati.** 17 su 178 pazienti (9.55%) hanno manifestato metastasi locali o a distanza. In 14 di loro (82.35%), i livelli dell'S-100, al momento della constatazione della progressione di malattia, erano superiori a 250 ng/L (livello decisionale). Inoltre, il follow up di cinque pazienti ha messo in evidenza che i reinnalzamenti della concentrazione dell'S-100 rispecchiano una nuova ricorrenza tumorale.

**Conclusioni.** I nostri risultati confermano che la concentrazione dell'S-100 cresce consensualmente alla progressione della malattia e livelli aumentati sono spesso il primo sintomo di una recidiva. Lo studio ha messo in evidenza il vantaggio dato dalla disponibilità in tempi brevissimi dei risultati per il controllo clinico del paziente.

**Background.** The incidence of malignant melanoma greatly increased in the recent years and the follow up of disease is plagued by many relapses. S-100 protein is found in several cells of neuroectodermal origin. Serum S-100 concentration has been proposed as biochemical marker in malignant melanoma since it is related with the progression of the disease.

**Methods.** From October 1999 to October 2003, S-100 serum concentration was measured in 880 blood samples obtained from 178 consecutive patients admitted for histologically confirmed malignant melanoma. S-100 serum concentration was measured by an assay based on three monoclonal antibodies against bovine S-100 protein B-subunit, using an automated chemiluminescence analyzer (Liaison, Dia-

sorin, Saluggia, Italy). This method is much faster (requiring less than an hour) compared to the previously available technology which has been employed in most of previous studies in this field

**Results.** Seventeen out of 178 patients (9.55%) had local or distant metastasis. In 14 of them (82.35%), S-100 levels were higher than 250 ng/L (decision level) when disease progression was detected. Furthermore, five patients showed that a renewed rise of S-100 concentration reflected a new tumour recurrence.

**Conclusions.** The present study hints, as previously reported, the rise of S-100 B protein in serum patients with malignant melanoma. The modern chemiluminescence analyser employed in our study is reliable and fast, allowing to shorten the assay time.

## Introduzione

Nelle ultime decadi l'incidenza del melanoma maligno è molto aumentata nella popolazioni di razza caucasica. Il tumore può metastatizzare ovunque, e una volta disseminato, è generalmente incurabile. Il follow-up post-chirurgico non è purtroppo premiante, e circa il 20% dei pazienti affetti muore a distanza per metastasi disseminate. Uno dei principali scopi nello studio clinico e laboratoristico di questi pazienti è la messa a punto di marcatori sierici affidabili e sicuri per migliorare la diagnosi precoce e monitorare l'eventuale progressione della malattia. Numerose proteine sono state isolate nei tessuti di pazienti con melanoma e proposte come indice prognostico: NSE (enolasi neurone specifica), LASA (lipide cellulare di membrana associato all'acido sialico), CD44 (glicoproteina di superficie espressa nei tessuti tumorali), HMB45 (glicoproteina utilizzata anche per la diagnosi immunocitochimica di melanoma), RT-PCR, e la proteina S-100<sup>1-7</sup>.

L'S-100 è una proteina acida chelante il calcio, con un peso molecolare di 21 KD, composta da due subunità isomeriche A e B presente nel tessuto nervoso di tutti i mammiferi e nelle cellule di derivazione melanocitaria di origine neuroectodermica.<sup>8-10</sup> Identificata per la prima volta nel 1965 da Moore et al.<sup>11</sup>, deve il nome alla sua solubilità in ammonio solfato al 100% a pH neutro. A tutt'oggi la sua specifica funzione biologica non è stata completamente spiegata<sup>9, 12-15</sup>; si sa comunque che la sua concentrazione aumenta nel liquido cerebrospinale e nel siero dopo traumi del tessuto cerebrale, tanto da essere stata proposta come indice specifico per valutare il danno cerebrale.<sup>16-17</sup> Anticorpi monoclonali contro la proteina S-100 sono routinariamente impiegati dagli istopatologi per l'identificazione delle cellule tumorali di origine melanocitaria che la esprimono.<sup>3-5, 9, 14, 18-20</sup> L'incremento del livello sierico indica una progressione di malattia, mentre una sua riduzione si associa ad una positiva risposta alle terapie<sup>21-24</sup>. Le tradizionali metodiche immunoradiometriche, pur affidabili, richiedevano lunghi tempi tecnici, limitando così l'importanza della proteina S-100 nella gestione dei pazienti con melanoma.<sup>25</sup> Obiettivo di questo studio è stato quello di valutare una metodica più rapida per la misurazione della concentrazione sierica della proteina S-100 allo scopo di identificare i pazienti con un più alto rischio di recidive e/o metastasi valutando il valore prognostico dell'innalzamento del suo livello sierico.

## Materiali e metodi

Dall'ottobre 1999 all'ottobre 2003, la concentrazione sierica dell'S-100 è stata misurata in 880 campioni di sangue ottenuti da 178 pazienti consecutivi, 91

donne, (51,1%) e 87 maschi (48,9%) con età media di 57 anni (17-96), ricoverati per melanoma maligno (Breslow > 1 mm) in stadio I e II (malattia primitiva con negatività clinica all'interessamento dei linfonodi regionali). In tutti i casi la diagnosi clinica è stata confermata da quella istologica e immunocitochimica.

Tutti i pazienti trattati risultavano liberi da malattia dopo il trattamento chirurgico iniziale, e durante lo studio in nessun caso è stata utilizzata terapia adiuvante finché non ritenuto necessario. Il follow-up medio è stato di 34 mesi<sup>12-48</sup>.

I campioni di sangue sono stati raccolti al tempo 0 (diagnosi) e nello stesso giorno dei controlli clinici periodici (3-4 volte/anno).

La concentrazione sierica dell'S-100 è stata misurata con una metodica basata su tre anticorpi monoclonali contro la subunità B della proteina S-100 bovina, usando un analizzatore automatico a chemiluminescenza (Liaison, Diasorin, Saluggia, Italia). Tale metodica è molto più veloce (richiede meno di un'ora) se confrontata con la tecnologia disponibile precedentemente ed impiegata in molti studi condotti in passato in questo campo. Tutti i campioni infatti, sono stati raccolti nella tarda mattinata (tra le 11 e le 12) e i risultati, già disponibili entro le ore 14, immediatamente inviati al chirurgo prima che iniziasse la visita dei pazienti. In tal modo si è potuto integrare il valore della concentrazione sierica dell'S-100 con gli altri dati dell'ammalato (esame clinico, radiografie, ecografie, TAC, RMN) utilizzandolo nella eventuale scelta terapeutica e nella successiva programmazione del follow-up.

## Risultati

I risultati sono indicati nelle tabelle 1 e 2. Diciassette dei 178 pazienti (9,55%) hanno sviluppato metastasi locali o a distanza. In 14 di questi (82,35%), i livelli dell'S-100 erano più alti di 250 ng/L (livello decisionale) quando è stata diagnosticata progressione di malattia. Sensibilità, specificità, valori predittivi, efficienza e quoziente di probabilità positivo (LR+) e negativo (LR-) per elevati valori di proteina S-100 nel siero nel predire la progressione di melanoma sono state fissate usando tabelle standard 2 x 2. La sensibilità del metodo è stata dell'82,3% (con intervallo di confidenza (CI) del 95%: 58,97-93,81) e la specificità del 98,13 (95% CI: 94,66-99,36). L'LR per valori positivi o negativi è stato di 44,2 (95% CI: 14,1-138,5) e 0,18% (95% CI: 0,06-0,5) rispettivamente. Il valore predittivo positivo e negativo sono risultati rispettivamente 82,3% (95% CI: 58,97-93,81) e 98,2% (95% CI: 94,66-99,36) mentre l'efficienza è stata di 96,6% (95% CI: 92,84-98,44). Inoltre, l'analisi dell'andamento delle concentrazioni dell'S-100 in cinque pazienti ha mostrato che

successivi aumentati livelli di tale proteina riflettevano una nuova recidiva. Le figure 1-3 rappresentano la concentrazione dell' S-100 misurata in tre pazienti durante il follow-up.

## Discussione

Sia l'incidenza di melanoma che il numero di pazienti con metastasi continuano ad aumentare in Italia e in tutto il mondo nonostante la maggior attenzione e le misure di prevenzione.<sup>4, 5, 23</sup> Il melanoma maligno, una volta disseminato, è generalmente resistente alla terapia convenzionale, e la sopravvivenza raramente supera alcuni mesi. Quindi una diagnosi precoce delle eventuali recidive e/o metastasi è essenziale per ridurre il tasso di mortalità della malattia<sup>13</sup> e un attento follow-up è indispensabile. L'indice di Breslow (che evidenzia lo spessore del tumore) è attualmente il parametro prognostico più usato, ma spesso, non è attendibile; pertanto ad oggi mancano metodi efficaci per identificare i pazienti ad alto rischio di ripresa della malattia.

A tale scopo, negli ultimi anni nuove strategie sono state sviluppate per identificare marcatori sierici specifici e sensibili, utili nella diagnosi e nel monitoraggio di progressione del melanoma.<sup>13, 38</sup> I marcatori tumorali potrebbero infatti permettere di valutare nel tempo gran parte dei pazienti a rischio di recidiva o metastasi, monitorando gli effetti del trattamento<sup>2</sup>. Variazioni dei livelli dei markers tumorali dovrebbero precedere piuttosto che seguire i metodi diagnostici convenzionali, ed identificare quindi più precocemente la diffusione della malattia, permettendo così una più tempestiva e mirata terapia<sup>29</sup>.

NSE, RT-PCR e LASA si sono rivelati insufficienti nella diagnosi e nella prognosi in pazienti con melanoma<sup>3, 7, 30</sup>, mentre di gran lunga più affidabile si è dimostrato il dosaggio della proteina S-100<sup>1, 13, 15, 31</sup>. L' S-100 è una proteina acida chelante il calcio, composta da due subunità A e B, presente nei tumori che originano dalla cresta neurale. Nei primi anni '80 è stato riportato che linee cellulari derivate da metastasi umana di melanoma producono S-100, e che questa è presente in tutti i melanomi, specialmente in quelli amelanotici<sup>4, 13, 32</sup>, mentre non viene identificata su cute sana o nei linfonodi<sup>12, 22, 23</sup>. La presenza della subunità B della proteina nel siero di pazienti con melanoma metastatico è stata confermata da diversi studi e il livello sierico è in relazione alla gravità della malattia. La differenziazione maligna delle cellule melanocitarie indurrebbe infatti una maggiore produzione di proteina S-100 la quale verrebbe successivamente rilasciata in circolo<sup>4, 12, 21, 21, 23, 34, 35</sup>.

Anche l'osservazione che l' S-100 non si ritrova nelle cellule del melanoma, finché non siano iniziate la crescita verticale e un atteggiamento invasivo, orien-

ta verso un possibile ruolo di questa proteina come importante marcatore biologico di aggressività del tumore<sup>2, 4, 36, 36</sup>.

In questo studio i livelli sierici dell' S-100 sono stati valutati in 178 pazienti con melanoma maligno in stadio I o II, allo scopo di studiare l'eventuale correlazione tra aumento dei livelli sierici di S-100 e la progressione della malattia.

Nel nostro studio 17 pazienti (9,55%) hanno presentato recidive locali e/o metastasi. In 14 di questi (82,35%) i livelli dell' S-100 erano aumentati e questo è stato il primo segno di ripresa della malattia, confermato più tardi da esami ben più invasivi e costosi (TAC, RMN ed ecografia).

Nella nostra casistica, in accordo con i dati già riportati in letteratura, i livelli sierici di S-100 appaiono aumentati se confrontati con quelli di gruppi di controllo (sani), nei quali questo marcatore non è rilevabile<sup>33</sup>.

Sebbene sensibilità e specificità appaiano abbastanza buone, va notato che anche i classici strumenti dell'Evidence Based Medicine (EBM) dimostrano l'affidabilità e validità del test. In accordo con la teoria dell'EBM, quando l' LR+ è maggiore di 10 il risultato comporta un grande e spesso conclusivo incremento nella possibilità di presenza di malattia, mentre quando l' LR- è tra 0,1 e 0,2 il risultato comporta un moderato decremento nella possibilità di presenza della malattia.

Anche considerando l'intervallo di confidenza del 95 % il risultato della metodica appare buono.

In conclusione il presente studio evidenzia, come già riportato, un aumento delle concentrazioni della proteina S-100 nel siero dei pazienti con melanoma maligno<sup>20, 22, 30, 35, 36, 37, 38</sup>. Il moderno analizzatore in chemiluminescenza impiegato nel nostro studio, è affidabile e veloce, permette di abbreviare i tempi necessari per la misurazione.

Siamo convinti che la concentrazione sierica dell' S-100 dovrebbe essere periodicamente misurata durante il follow-up dei pazienti con melanoma maligno. Valori più alti di 250 ng/L dovrebbero essere riconfermati e il paziente attentamente valutato alla ricerca di eventuali recidive e/o metastasi.

Questo approccio permette di identificare i pazienti ad alto rischio che potrebbero beneficiare di una più appropriata chemioterapia o immunoterapia.

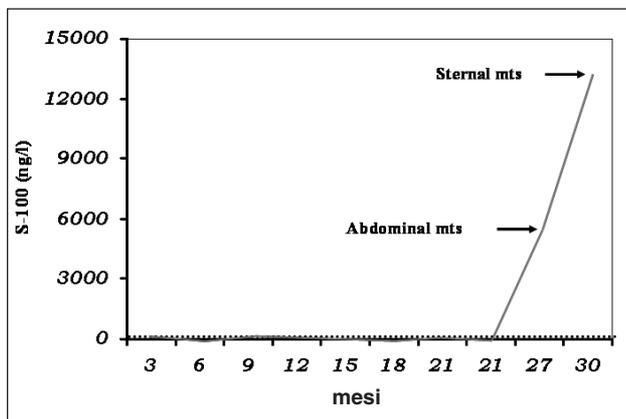
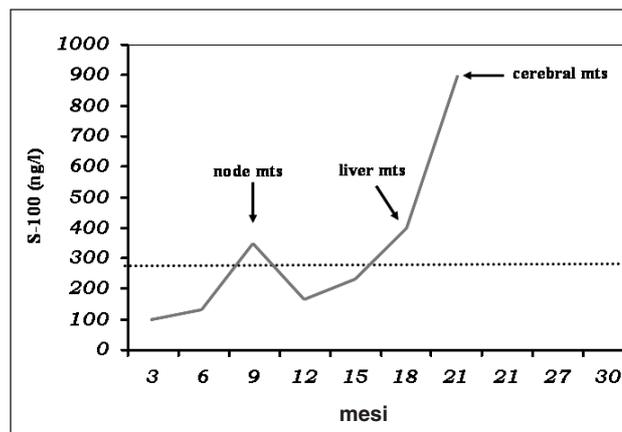
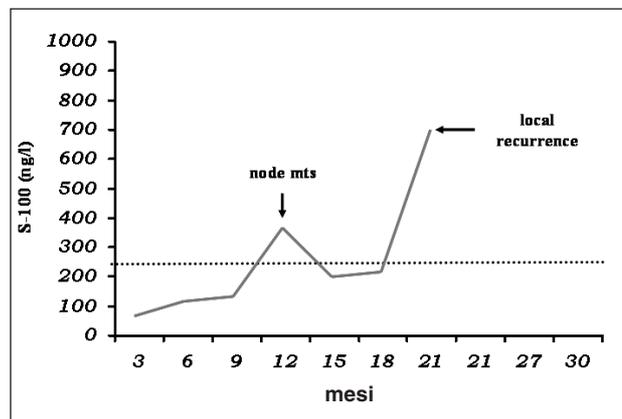
Una precoce scoperta della ripresa di malattia può influenzare positivamente le scelte terapeutiche nel monitoraggio dei pazienti seguiti per melanoma.

**Tabella I** - Sintesi dei risultati  
(MTS=metastasi; NED=Non evidenza di malattia)

	MTS	NED	TOTALE
POSITIVI	14	3	17
NEGATIVI	3	158	161
TOTALE	17	161	178

**Tabella II** - Risultati complessivi ed intervallo di confidenza al 95%

	Intervallo confidenza 95%		
Sensibilità (%)	82.353	58.970	93.809
Specificità (%)	98.137	94.665	99.364
Likelihood Ratio per un Risultato Positivo	44.196	14.101	138.524
Likelihood Ratio per un Risultato Negativo	0.180	0.064	0.502
Valore Predittivo Positivo (%)	82.353	58.970	93.809
Value Predittivo Negativo (%)	98.137	94.665	99.364
Efficienza (%)	96.629	92.842	98.446
Probabilità Pre Test (Prevalenza) (%)	9.551	6.049	14.762

**Figura 1.** Concentrazione di S-100 nel follow up in un paziente con metastasi addominali (Abdominal mts) e sternali (Sternal mts) (Breslow 2.2, Clark IV).**Figura 2.** Concentrazione di S-100 nel follow up in un paziente con metastasi linfonodali (node mts), epatiche (liver mts) e cerebrali (cerebral mts) (Breslow 2.8, Clark III).**Figura 3.** Concentrazione di S-100 nel follow up in un paziente con metastasi linfonodali (node mts) e locali (local recurrences) (Breslow 2.0, Clark III).

## Bibliografia

- Joseph E, Lyman G, Messina J, Brobeil A, Reintgen DS. Tumour markers in malignant melanoma: a review. *Tumour Marker Update* 1997; 9: 157-67.
- Koh HK. Cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 171-82.
- Miliotes G, Lyman GH, Cruse CW, Puleo C, Albertini J, Rapaport D, et al. Evaluation of new putative tumor markers for melanoma. *Ann Surg Oncol* 1996; 3: 558-63.
- Nakajima T, Watanabe S, Sato Y, Kameya T, Shimamoto Y, Ishihara K. Immunohistochemical demonstration of S-100 protein in malignant melanoma and pigmented nevus, and its diagnostic application. *Cancer* 1982; 50: 912-8.
- Ordóñez NG, Ji XL, Hickey RC. Comparison of HMB-45 monoclonal antibody and S-100 protein in the immunohistochemical diagnosis of melanoma. *Am J Clin Pathol* 1988; 90:385-90.
- Wang X, Heller R, Van Voorhis N, Cruise CW, Glass F, Fenske N. Detection of submicroscopic lymph node metastases with polymerase chain reaction in patients with malignant melanoma. *Ann Surg* 1994; 220: 768-74.
- Wibe E, Hannisdal E, Paus E, Aamdal S. Neuron specific enolase as a prognostic factor in metastatic malignant melanoma. *Eur J Cancer* 1992; 28A: 1692.
- Dannies PS, Levine L. Demonstration of subunits in beef brain acidic protein S-100. *Biochem. Biophys. Res Commun* 1969; 37: 587-92.
- Isobe T, Ishioka N, Okuyama T. Structural relation of two S-100 proteins in bovine brain; subunit composition of S-100 protein. *Eur J Biochem* 1981 115: 469-74.
- Yamaguchi H. Studies on the immunohistochemical localisation of S-100 and GFA proteins in the rat nervous system and in human brain tumours. *Brain and nerve* 1980 32: 1055-59.
- Moore BW. A Soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 1965 19: 739-44.
- Gaynor R, Herschman HR, Irie R, Jones P, Morton D, Cochran A. S-100 protein: a marker for human malignant melanomas? *Lancet* 1981 1: 869-71-
- Guo HB, Stoffel-Wagner B, Bierwirth T, Mezger J, Klingmuller D. Clinical significance of S-100 in metastatic malignant melanoma. *Eur J Cancer* 1995 ; 6:924-8.
- Stefannsson K, Wollmann RL, Moore BW. Distribu-

- tion of S-100 protein outside the central nervous system. *Brain Res.* 1982 234: 309-17.
15. von Schoultz E, Hansson LO, Djureen E, Hansson J, Karnell R, Stigbrand T et al. Prognostic value of serum analyses of S-100 B protein in malignant melanoma. *Melanoma Res* 1996. 6: 133-7.
  16. Waterloo K, Ingebrigtsen T, Romner B. Neuropsychological function in patients with increased serum levels of protein S-100 after minor head injury. *Acta Neurochir* 139: 26-32.
  17. Ingebrigtsen T, Romner B, Kongstad P, Langbakk B. Increase serum concentration of protein S-100 after minor head injury: a biochemical serum marker with prognostic value? *J Neurol Neurosurg Psych* 59: 103-4.
  18. Cochran AJ. Melanoma markers: biologic and diagnostic considerations. *Monogr Pathol* 1988 30: 35-41.
  19. Gaynor R, Irie R, Morton D, Herschman HR. S-100 protein is present in cultured human malignant melanomas. *Nature* 1980; 286: 400-1.
  20. <http://www.poems.msu.edu/infomastery/Diagnosis/Diagnosis.htm> (consultato l'ultima volta 20-12-2004)
  21. Abraha HD, Fuller LC, Du Vivier AWP, Higgins EM, Sherwood RA. Serum S-100 protein: a potentially useful prognostic marker in cutaneous melanoma. *Br J Dermatol* 1997; 137: 381-5.
  22. Buer J, Probst M, Franzke A, Duensing S, Haindl J, Volkenandt M, et al Elevated serum level of S-100 and survival in metastatic malignant melanoma. *Br J Cancer* 1997; 75: 1373-6.
  23. Henze G, Dummer R, Joller-Jemelka HI, Boni R, Burg G. Serum S-100. A marker for disease monitoring in metastatic melanoma. *Dermatol* 1997 194: 208-12.
  24. Moretti S, Spallanzani A, Pinzi C, Giannotti B. Dal laboratorio al paziente. Quale utilità pratica della ricerca biologica nel melanoma? *G Ital Dermatol Venereol* 1997; 132: 407-10.
  25. Dorizzi RM, Bortolani A, Caputo M. Measurement of S-100 protein using the automated chemiluminescent system Lia-mat 300. *Ann Clin Biochem* 1999; 36: 777-8.
  26. Legha SS. Current therapy for malignant melanoma. *Sem Oncol* 1989; 16: 34-44.
  27. Aapro MS. Advances in systemic treatment of melanoma. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 613
  28. Missler U, Wiessmann M. Measurement of S-100 protein in human blood and cerebrospinal fluid: analytical method and preliminary clinical results. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 743-8.
  29. Jury CS, McAllister EJ, MacKie RM. Rising levels of serum S-100 protein precede other evidence of disease progression in patients with malignant melanoma. *Br. J. Dermatology* 2000; 143: 269-74.
  30. Shutter EM, JVisser JJ, Van Kamp GJ. The utility of lipid-associated acids (LASA or LSA) as a serum marker for malignancy. A review of the literature. *Tumour Biol.* 1992; 13: 121-5.
  31. Hauschild A, Engel G, Brenner W, Glaser R, Monig, E.Henze et al. S-100 protein detection in serum is a significant prognostic factor in metastatic melanoma. *Oncology* 1999; 56: 338-44.
  32. Hauschild A, Michaelsen J, Brenner W, Rudolph P, Glaser R, Henze E et al. Prognostic significance of serum S-100B detection compared with routine blood parameters in advanced metastatic melanoma patients. *Melanoma Res.* 1999; 9: 155-61.
  33. Dorizzi RM, Cocco C, Bortolani A. Reference interval of S-100 protein measurement using Liaison analyzer and comparison with the results yielded by Lia-mat analyzer. *Melanoma Res.* 2001; 11: S80
  34. Bonfrer JMG, Korse CM, Nieweg OE, Rankin EM. The luminescence immunoassay S-100: a sensitive test to measure circulating S-100B: its prognostic value in malignant melanoma. *Br. J. Cancer* 1998; 77: 2210-4.
  35. Karnell R, Von Schoultz E, Hansson LO, Nilsson B, Arstrand K, Kagedal B. S-100 protein, 5-S-cysteinyldopa and 6-hydroxy-5-methoxyindole-2-carboxylic acid as biochemical markers for survival prognosis in patients with malignant melanoma. *Melanoma Res.* 1997; 7: 393-9.
  36. Hansson LO, Von Shoultz E, Djureen E, Hansson J, Nilsson B, Ringborg U. Prognostic value of serum S-100 protein B in malignant melanoma. *Anticancer Res* 1997; 17: 3071-3.
  37. Schultz ES, Diepgen TL, Von Driesch P. Clinical and prognostic relevance of serum S-100B protein in malignant melanoma. *Br J Dermatol.* 1998;138: 426-30.
  38. Vuoristo MS, Kelloumpu-Lehtinen P, Laine S, Parvonen LM, Hahka-Kemppinen M, Korpela M et al. The value of serum S-100B and interleukins as Markers in advanced melanoma. *Melanoma Res.* 2000; 10: 237-41.