

ARTICOL DE CERCETARE

## Particularitățile limfangio- genezei în subtipurile moleculare de carcinoame mamare: studiu experimental

Ecaterina Carpenco<sup>1,2\*†</sup>, Veaceslav Fulga<sup>1,2†</sup>,  
Lilian Șaptefratî<sup>1,2†</sup>

<sup>1</sup>Catedra de histologie, citologie și embriologie, Universitatea de Stat de  
Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;  
<sup>2</sup>Laboratorul de morfologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie  
„Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova.

Data primirii manuscrisului: 02.03.2020  
Data acceptării spre publicare: 05.08.2020

### Autor corespondent:

Ecaterina Carpenco, asist. univ., studentă-doctorandă  
Catedra de histologie, citologie și embriologie, Laboratorul de morfologie  
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”  
bd. Ștefan cel Mare și Sfânt 192, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004  
e-mail: ecaterina.carpenco@usmf.md

### Ce nu este, deocamdată, cunoscut la subiectul abordat

La momentul actual, modificările stromei înconjurătoare sunt recunoscute drept un element crucial al dezvoltării, progresiei, invaziei, angiogenezei, și metastazării cancerului mamar, precum și drept potențiale ținte terapeutice. În tumorile glandei mamare, vasele limfatice reprezintă componentul major al microambianței tumorale. Controlul hormonal al dezvoltării vaselor limfatice este un subiect controversat timp de decenii, dar rămâne, în mare parte, neexplorat.

### Ipoteza de cercetare

Identificarea vaselor limfatice D2-40 pozitive, precum și a interrelațiilor acestora cu receptorii hormonali și statusul HER2, poate avea o semnificație clinică pentru pacienții cu cancer mamar.

### Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Estrogenii și progesteronul au un rol esențial în limfangio-  
geneză, fapt confirmat prin corelația inversă dintre cantitatea  
de celule ER+ sau PR+ și expresia D2-40, marker al endoteliu-  
lui limfatic.

### Rezumat

**Introducere.** În patologia oncologică feminină, cancerul mamar este cel mai frecvent tip de cancer diagnosticat și principala cauză de deces. Unul dintre cei mai importanți factori de prognostic este prezența metastazelor limfonodale, evalua-

RESEARCH ARTICLE

## Peculiarities of lymphangio- genesis in molecular subtypes of breast carcinomas: experimental study

Ecaterina Carpenco<sup>1,2\*†</sup>, Veaceslav Fulga<sup>1,2†</sup>,  
Lilian Saptefrati<sup>1,2†</sup>

<sup>1</sup>Chair of histology, cytology and embryology, Nicolae Testemitanu State  
University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;  
<sup>2</sup>Laboratory of morphology, Nicolae Testemitanu State University of Medicine  
and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova.

Manuscript received on: 02.03.2020  
Accepted for publication on: 05.08.2020

### Corresponding author:

Ecaterina Carpenco, asist. prof., PhD fellow  
Chair of histology, cytology and embryology, Laboratory of morphology  
Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy  
165, Ștefan cel Mare și Sfânt Bd., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004  
e-mail: ecaterina.carpenco@usmf.md

### What is not known yet, about the topic

Alterations of surrounding stroma are now recognized as a critical element for breast cancer development, progression, invasion, angiogenesis, metastasis as well as potential therapeutic targets. In breast tumor tissues, lymphatic vessels are major components of the tumor microenvironment. The hormonal control of lymphatic vessels is an important issue for decades but remains largely unexplored.

### Research hypothesis

Identification of D2-40 positive lymphatic vessels and their relationships with hormone receptors, HER2 status could have a strong clinical impact for breast cancer patients.

### Article's added novelty on this scientific topic

Estrogens and progesterone seem to have a crucial role in lymphangiogenesis, the amount of ER+ or PR+ carcinoma cells being inversely related with the expression of D2-40, a marker of lymphatic endothelium.

### Abstract

**Introduction.** In female oncological pathology, breast cancer is the most commonly diagnosed cancer and the leading cause of cancer death. Lymph node metastasis is one of the most important survival predictor, this being crucial for tumor

rea acestora fiind esențială pentru stadializarea tumorii și stabilirea planului de tratament. Studiile în domeniu sugerează că metastazarea este direct corelată cu densitatea vaselor limfatice în tumoarea propriu-zisă și în regiunea peritumorală. Scopul cercetării date a constat în analiza distribuției vaselor limfatice (regiunea intratumorală vs peritumorală), precum și a relațiilor dintre limfangiogeneza tumorală și diverși parametri (precum expresia receptorilor hormonal și statusul HER2, vârsta pacientelor, gradul tumorii).

**Material și metode.** 84 cazuri de carcinoame mamare au fost analizate în ceea ce privește profilul molecular (expresia ER, PR, HER2) și densitatea vaselor limfatice în stroma intratumorală (D2-40it) și peritumorală (D2-40pt) cu ajutorul marker-ului endoteliului limfatic D2-40. De asemenea, au fost analizate relațiile statistice dintre subtipurile moleculare de cancer mamar și parametrii clinici principali.

**Rezultate.** Valori numerice maxime, atât a D2-40it cât și a D2-40pt, au fost atinse în cazul carcinoamelor mamare triplu-negative (19 și 17, respectiv). În cazul subtipului luminal A s-a stabilit o corelație pozitivă dintre D2-40it și ER ( $r = 0,611$ ,  $p=0,012$ ) și o corelație negativă dintre D2-40pt și vârstă ( $r = -0,533$ ,  $p=0,033$ ). D2-40pt a corelat pozitiv cu D2-40it ( $r = 0,676$ ,  $p=0,011$ ) în subtipurile HER2+ și triplu-negativ ( $r = 0,631$ ,  $p=0,028$ ). În ultimul menționat, D2-40pt a înregistrat o corelație inversă cu vârsta ( $r = -0,584$ ,  $p=0,046$ ). Analizând subtipurile moleculare per total, am determinat corelații pozitive dintre D2-40it și gradul tumorii ( $r = 0,289$ ,  $p=0,008$ ). Numărul vaselor limfatice intratumorale a prezentat o relație inversă cu vârsta ( $r = -0,242$ ,  $p=0,026$ ), expresia receptorilor hormonal ER ( $r = -0,339$ ,  $p=0,002$ ) și PR ( $r = -0,245$ ,  $p=0,024$ ). În tumorile G2 și G3, D2-40pt a corelat cu D2-40it ( $r = 0,542$ ,  $p=0,000069$  și  $r = 0,558$ ,  $p=0,000206$ , respectiv). În cazul tumorilor G3, s-au stabilit corelații inverse dintre D2-40it și a celulelor tumorale ER+ ( $r = -0,406$ ,  $p=0,016$ ), precum și vârsta pacientelor ( $r = -0,432$ ,  $p=0,009$ ).

**Concluzii.** Densitatea vaselor limfatice intratumorale corelează cu expresia receptorilor hormonal. Intensitatea limfangiogenezei este mai înaltă la pacienții mai tineri. Densitatea vaselor limfatice intratumorale este direct proporțională cu numărul vaselor peritumorale.

**Cuvinte cheie:** cancer mamar, D2-40, DVL, microambianța tumorală, subtipuri moleculare, ER, PR.

## Introducere

În patologia oncologică feminină, cancerul mamar este cel mai frecvent tip de cancer diagnosticat și principala cauză de deces. Ratele de incidență crescute sunt atribuite factorilor de risc cunoscuți legați de menstruație (vârsta timpurie la menarhă, vârsta tardivă la menopauză), reproducere (nuliparitatea, vârsta înaintată la prima naștere și puțini copii), administrarea de hormoni exogeni (utilizarea contraceptivelor orale și terapia de substituție hormonală), aport de alcool și antropometrie (greutate excesivă și distribuție de grăsime corporală); pe când alăptarea și activitatea fizică sunt recunoscute drept factori de protecție [1].

Prezența metastazelor limfonodale este unul dintre cei mai

staging and therapy planning. Studies suggest that metastasizing is directly correlated with the density of lymphatic vessels in the tumor itself and in the peritumoral area. The goal of present study was to study lymphatic vessels' distribution (intratumoral vs peritumoral areas) as well as the relationships between tumor lymphangiogenesis and various parameters (such as hormone receptors and HER2 status, patients' age, tumor grade).

**Material and methods.** 84 cases of breast carcinomas were analyzed in terms of their molecular profile (ER, PR, HER2 expression) and lymphatic vessels' density determined in the intratumoral stroma (D2-40it) and peritumoral area (D2-40pt), using the lymphatic endothelium marker D2-40. The relationships with different molecular subtypes of breast cancer and main clinical parameters were also analyzed.

**Results.** Maximal values of both D2-40it and D2-40pt were achieved in case of triple-negative breast carcinomas (19 and 17, respectively). For luminal A, a positive correlation was detected between D2-40it and ER ( $r = 0,611$ ,  $p=0,012$ ) and a negative correlation between D2-40pt and age ( $r = -0,533$ ,  $p=0,033$ ). D2-40pt positively correlated with D2-40it ( $r = 0,676$ ,  $p=0,011$ ) in HER2+ subtype and in triple-negative breast carcinomas ( $r = 0,631$ ,  $p=0,028$ ). D2-40pt negatively correlated with age in triple-negative subtype ( $r = -0,584$ ,  $p=0,046$ ). Analyzing overall molecular subtypes, we have found a positive correlation between D2-40it and tumor's grade ( $r = 0,289$ ,  $p=0,008$ ). Intratumoral lymphatic vessels' amount negatively correlated with age ( $r = -0,242$ ,  $p=0,026$ ), hormone receptors ER ( $r = -0,339$ ,  $p=0,002$ ) and PR ( $r = -0,245$ ,  $p=0,024$ ). In G2 and G3 tumors, D2-40pt correlated with D2-40it ( $r = 0,542$ ,  $p=0,000069$  and  $r = 0,558$ ,  $p=0,000206$  respectively). In case of G3 tumors intratumoral lymphatic vessels negatively correlated with ER+ carcinoma cells ( $r = -0,406$ ,  $p=0,016$ ) and patients' age ( $r = -0,432$ ,  $p=0,009$ ).

**Conclusions.** Intratumoral lymphatic vessel density correlates with the expression of hormone receptors. The lymphangiogenesis rate is higher in younger patients. The development of intratumoral and peritumoral lymphatic vessels is directly related.

**Key words:** breast carcinoma, D2-40, LVD, tumor microenvironment, molecular subtypes, ER, PR.

## Introduction

In female oncological pathology, breast cancer is the most commonly diagnosed cancer and the leading cause of cancer death. Elevated incidence rates are attributed to known risk factors related to menstruation (early age at menarche, later age at menopause), reproduction (nulliparity, late age at first birth, and few children), exogenous hormone intake (oral contraceptive use and hormone replacement therapy), nutrition (alcohol intake), and anthropometry (excessive weight and body fat distribution); whereas breastfeeding and physical activity are recognized as protective factors [1].

Lymph node metastasis is one of the most important survival predictor for patients with cancers, this being crucial for

importanți predictorii ai supraviețuirii pentru pacienții cu cancer, aceasta fiind crucială pentru stadializarea tumorii și planificarea tratamentului [2]. Metastazele implică nu în ultimul rând și vasele limfatice [3]. De-a lungul timpului, vasele limfatice au fost considerate drept o conductă pasivă pentru metastaze, oferind canale pentru tranzitul celulelor tumorale către nodurile limfatice santinelă. La rândul său, limfangiogeneza, adică formarea de noi vase limfatice, a fost în mod tradițional umbrită prin evidențierea priorității a sistemului vascular sanguin (angiogeneza). Studiile recente au evidențiat totuși un rol activ, mult mai complex a vaselor limfatice în răspândirea metastatică a tumorii, reglementată de o serie complexă de factori limfangiogeni, chemokine și subtipuri de celule imune [4, 5].

Limfangiogeneza indusă de tumoră este mediată de factorii de creștere limfangiogeni care sunt produși și secretați de celulele canceroase propriu-zise și / sau de componentele microambianței tumorale, cum ar fi mastocitele, macrofagele sau trombocitele activate [5]. În prezent, limfangiogeneza este frecvent caracterizată prin densitatea vaselor limfatice (DVL), care este determinată prin numărarea directă a vaselor limfatice [6]. Diverse studii au determinat că limfangiogeneza este direct corelată cu gradul de metastazare a tumorilor solide în nodurile limfatice din carcinomul oral cu celule scuamoase, adenocarcinom de prostată, cancer colorectal [6-9]. În ultimii ani, cercetătorii și-au concentrat atenția asupra factorilor de creștere a endoteliului vascular C și D (VEGF-C și VEGF-D) în evoluția cancerului. Supraexprimarea fie a VEGF-C, fie a VEGF-D în tumori a activat semnificativ dezvoltarea vaselor limfatice asociate tumorii (în principal la marginile tumorii) și a crescut incidența metastazelor limfonodale. Pe lângă sporirea densității vaselor limfatice, acțiunea factorilor de creștere limfangiogeni se manifestă și prin creșterea în dimensiune a vaselor limfatice [5].

Limfangiogeneza poate avea loc atât la periferia tumorii, cât și în interiorul masei celulare maligne, deși exista o părere populară precum că vasele limfatice nu pot fi recrutate în cuibul tumoral. Această idee a fost susținută și de absența de markeri adecvați (până la epoca D2-40), capabili de a distinge endoteliul vaselor sangvine și limfatice. Deși rolul vaselor limfatice peritumorale a fost descris în metastazarea tumorii, nu este clar dacă același lucru este valabil și pentru vasele intratumorale, deoarece acestea sunt adesea colabate sau ocluzionate de celulele tumorale și, posibil, nefuncționale [4, 5, 10-12].

D2-40, un anticorp monoclonal IgG2a generat împotriva antigenului oncofetal membranar M2A, a fost inițial identificat în liniile celulare dezvoltate din carcinomul ovarian, precum și neoplazii a celulelor germinative. Acesta ulterior a fost raportat drept un marker specific pentru endoteliul limfatic în țesuturile neafectate și neoplazice [10].

Qian *et al.* a demonstrat că limfangiogeneza din nodul limfatic santinelă precede metastazarea, vasele neoformate fiind dilatate, iar endoteliul venulelor, tradițional înalt, devine aplăzizat. Aceste evenimente induc creșterea fluxului limfatic, promovează diseminarea metastatică și sculptează un răspuns imun permisiv [2, 5].

Studiile în domeniu indică faptul că vasele limfatice peritumorale au fost asociate cu metastaze limfonodale a cancerului

tumor staging and therapy planning [2]. Metastasis involves also lymphatic vessels [3]. Historically, lymphatic vessels were considered as a somewhat passive conduit for metastasis by simply providing channels for tumor cells to transit to sentinel lymph nodes. In turn, lymphangiogenesis, the formation of new lymphatic vessels, has traditionally been overshadowed by a greater emphasis being placed on the blood vascular system (angiogenesis). Recent studies have however highlighted a much more complex, active role for the lymphatic vasculature in metastatic tumor spread, regulated by a complex array of lymphangiogenic factors, chemokines, and immune cell subsets [4, 5].

Tumor-induced lymphangiogenesis is mediated by lymphangiogenic growth factors that are produced and secreted by the cancerous cells themselves and / or by the components of tumor microenvironment, such as mast cells, macrophages, or activated platelets [5]. Nowadays it's common to characterize lymphangiogenesis by lymphatic vessel density (LVD), which is determined by directly counting lymphatic vessels [6]. Various studies have shown that lymphangiogenesis is directly correlated with the extent of metastasis of solid tumors in lymph nodes in oral squamous cell carcinoma, prostate adenocarcinoma, colorectal cancer [6-9]. In recent years, researchers have focused on the role of vascular endothelial growth factors C and D (VEGF-C and VEGF-D) in cancer progression. The overexpression of either VEGF-C or VEGF-D in tumors significantly increased tumor-associated lymphatic vessel growth (primarily at the tumor margin) and increased incidence of lymph node metastasis. In addition to increasing lymphatic vessel density, lymphangiogenic growth factors also act to enlarge and dilate lymphatic vessel size [5].

Lymphangiogenesis can occur both at the tumor periphery and within the malignant cell mass, although there were a popular belief that lymphatic vessels were not recruited within tumor nest. This idea was supported by the lack of suitable markers (before the D2-40 era) that could distinguish blood and lymphatic vascular endothelium. Although the role of peritumoral lymphatic vessels has been described in tumor metastasis, it is not clear if the same is true for intratumoral vessels, because they are often collapsed or occluded by tumor cells and thereby possibly nonfunctional [4, 5, 10-12].

D2-40, an IgG2a monoclonal antibody generated against an oncofetal membrane antigen M2A, has been identified in ovarian carcinoma cell lines and germ cell neoplasia and has been reported to be a specific marker for lymphatic endothelium in normal and neoplastic tissue [10].

Qian *et al.* proved that lymphangiogenesis in the sentinel lymph node precedes metastasis, the newly formed vessels being dilated, and the venous endothelium, traditionally high, becomes flattened. These events induce increased lymphatic flow, promote metastatic dissemination and sculpt a permissive immune response [2, 5].

Studies in the field indicate that peritumoral lymphatic vessels have been associated with lymph node metastases of breast cancer. To date, the impact of the presence and density of intratumoral vs peritumoral lymphatic vessels on the survi-

mamar. Până în prezent nu se cunoaște impactul prezenței și densității limfaticelor intratumorale vs peritumorale asupra supraviețuirii pacienților cu cancer de sân [10, 13]. De asemenea, există puține date cu privire la relațiile dintre DVL și receptorii hormonal sau statusul HER2.

Scopul cercetării date a constat în analiza distribuției vaselor limfatice (regiunea intratumorală vs peritumorală), precum și a relațiilor dintre limfangiogeneza tumorală și diverși parametri, precum expresia receptorilor hormonal și statusul HER2, vârsta pacientelor, gradul tumorii.

### Material și metode

84 de cazuri de carcinoame ductale invazive au fost preluate la Spitalul Clinic Municipal Arad, România, în perioada anilor 2013-2016. Vârsta pacientelor a fost cuprinsă între 37 și 85 de ani, media fiind de  $67,9 \pm 8,6$  (Tabelul 1). Toate pacientele nu a fost supuse radio- sau chimioterapiei până la operație. Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică a Universității de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu", Chișinău, Republica Moldova (nr. 33/37 din 12.02.2018).

#### Metoda histologică

Specimenele au fost fixate în formalină tamponată 10% și, tradițional, incluse în parafină. Blocurile de parafină au fost folosite pentru crearea de blocuri tisulare microarray cu ajutorul TMA Grand Master (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary). Microarray-urile sunt produse prin extragerea de mostre tisulare de formă cilindrică din diferite blocuri cu reinsertia ulterioară a acestora într-un singur bloc recipient. Din fiecare microarray au fost tăiate o serie de secțiuni de 4  $\mu$ m. O parte din secțiuni au fost utilizate pentru colorația cu hematoxilin și eozină (HE), iar restul – pentru imunohistochimie. Secțiunile pentru HE au fost colorate de Leica Autostainer XL (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK) și montate automat (Leica CV5030, Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK). În vederea determinării tipului histologic a tumorii și evaluarea gradului (scorul Nottingham) cazurile au fost examinate de 3 morfopatologi independenți. Secțiunile potrivite au fost alese pentru colorarea imunohistochimică.

#### Imunohistochimie

Eseurile imunohistochimice a fost efectuată automat de

val of breast cancer patients is unknown [10, 13]. There is also little data on the relationship between DVL and hormone receptors or HER2 status.

The goal of present research was to study lymphatic vessels' distribution (intratumoral vs peritumoral areas) as well as the relationships between tumor lymphangiogenesis and various parameters (hormone receptors and HER2 status, patients' age, tumor grade).

### Material and methods

84 cases of ductal invasive breast carcinomas were collected at the Arad Clinical Hospital, Romania, between 2013-2016. Patients ranged between 37 and 85 years old, mean of age being  $67,9 \pm 8,6$  (Table 1). All patients did not undergo radio- or chemotherapy before surgery. The study was approved by the Ethics Committee of Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Moldova (no. 33/37 from 12.02.2018).

#### Histological method

The specimens were fixed in 10% buffered formalin and paraffin embedded as traditionally. Paraffin blocks were used for creation of tissue microarrays by means of TMA Grand Master (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary). Tissue microarrays are paraffin blocks produced by extracting cylindrical tissue cores from different paraffin donor blocks and reembedding these into a single recipient (microarray) block. A series of 4  $\mu$ m sections were cut from these microarrays. Some were used for hematoxylin and eosin (H&E) staining, while others for immunohistochemistry. Sections for H&E were stained automatically by Leica Autostainer XL (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK) and mounted automatically (Leica CV5030, Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK). Cases were evaluated by 3 independent pathologists for histological tumor type and grade estimation (Nottingham score). Appropriate sections were selected for immunohistochemical stains.

#### Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed automatically by Leica Bond-Max (Leica Biosystems, Newcastle Upon-

**Tabelul 1.** Vârsta pacientelor, gradul tumorii și subtipurile moleculare determinate.

**Table 1.** Patients' age, tumor's grade and the established molecular subtypes.

n (%)		Subtip molecular // Molecular subtype			
		luminal A <i>luminal A</i>	luminal B <i>luminal B</i>	HER2+ <i>HER2+</i>	triplu-negativ <i>triple-negative</i>
		16 (19%)	43 (51,2%)	13 (15,5%)	12 (14,3%)
Vârsta, ani <i>Age, years</i>	Media $\pm$ m <i>Average <math>\pm</math> m</i>	70,4 $\pm$ 7,3	69,5 $\pm$ 6,8	60,6 $\pm$ 4,2	66,8 $\pm$ 6,2
	Mediana <i>Median</i>	72,5	67,0	60,0	64,5
Gradul tumorii <i>Tumor's grade</i>	G1	1	0	0	0
	G2	9	30	5	4
	G3	6	13	8	8

Notă: m – eroarea standard a mediei.

Note: m – standard average error.

**Tabelul 2.** Date despre anticorpi utilizați în studiu.  
**Table 2.** Data regarding antibodies used in the study.

Anticorpi <i>Antibodies</i>	Sursa <i>Source</i>	Clona <i>Clone</i>	Diluția <i>Dilution</i>	Sistem de detecție <i>Detection system</i>	Sistem de demascare <i>Systems of retrieval</i>	Timp de incubare <i>Time of incubation</i>
PR		16				
ER	Leica Bond (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK)	6F11	Ready-to-use	Bond Polymer Refine Detection System	20 min, ER2	30 min
Ki-67		MM1				
HER2	Novocastra (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK)	CB11				
D2-40 (anti-podoplanină)	Abcam (Cambridge, UK)	gp36	1:40		10 min, ER1	60 min

Notă: PR – receptor pentru progesteron; ER – receptor pentru estrogen; HER2 – human epidermal growth receptor 2; ER1 – Bond Epitope Retrieval Solution 1, pH6; ER2 – Bond Epitope Retrieval Solution 2, pH9, Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK.

Note: PR – progesterone receptor; ER – estrogen receptor; HER2 – human epidermal growth receptor 2; ER1 – Bond Epitope Retrieval Solution 1, pH6; ER2 – Bond Epitope Retrieval Solution 2, pH9, Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK.

Leica Bond-Max (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK). Demascarea antigenului a fost obținută prin utilizarea de Bond Epitope Retrieval Solution 1 sau 2 (pH 6 și pH 9, respectiv) (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK). Datele referitoare la anticorpii utilizați pentru stabilirea subtipului molecular și pentru identificarea vaselor limfatice pot fi regăsite în Tabelul 2. DAB (3,3'-diaminobenzidină) a fost aplicat drept substrat cromogen, iar hematoxilina Mayer a fost colorantul adițional utilizat pentru contracolorarea nucleilor.

#### Metode de cuantificare

Pentru clasificarea specimenelor de cancer mamar în funcție de profilul molecular, receptorii hormonal (ER – receptorul pentru estrogen și PR – receptorul pentru progesteron) au fost evaluați în funcție de scorul Allred [14]. Acesta a fost determinat luând în calcul proporția de celule colorate și de intensitatea colorației. Pragul pozitivității (cut-off-ul) pentru ER și PR a fost de 10%, iar pentru Ki-67 – de 20%. Proteina HER2 (receptorul pentru factorul uman de creștere epidermală 2) a fost apreciată conform recomandărilor Societății Americane de Oncologie Clinică [15]. În baza Consensului Internațional de Experți 2015 de la St Gallen, profilul imunohistochimic al subtipurilor moleculare a fost următorul: ER+ și/ sau PR+, HER2-, Ki-67 <20% pentru subtipul luminal A; ER+ și / sau PR+, HER2+ și/ sau Ki-67 >20% pentru luminal B; ER-, PR-, HER2+ pentru subtipul HER2+ [16]. Specimenele în care a lipsit colorația pentru ER, PR și HER2 au fost calificate ca subtip triplu-negativ. În studiul dat nu am folosit CK 5/6 și EGFR pentru a stabili subtipul bazal.

Pentru a determina zonele carcinomului cu cel mai mare număr de vase limfatice distinct evidențiate, secțiunile imunocolorate au fost inițial studiate la obiectivul  $\times 100$ . Cuantificarea a fost făcută la microscopul Axio Imager A2 (Carl Zeiss, Germany). Distribuția limfaticelor față de celulele tumorale și alte componente ale stromei a fost analizată în zonele cu cel

Tyne, UK). Antigen retrieval was achieved by using of Bond Epitope Retrieval Solution 1 or 2 (pH 6 and pH 9, respectively) (Leica Biosystems, Newcastle UponTyne, UK). Information about antibodies used to establish the molecular subtype and to identify lymphatic vessels can be found in Table 2. DAB (3,3'-diaminobenzidine) was applied as a chromogen substrate and Mayer's hematoxylin was the additional dye used for the counterstaining of nuclei.

#### Methods of quantification

To classify specimens of breast cancer according to the molecular profile, hormone receptors (ER – estrogen receptor and PR – progesterone receptor) were evaluated according to Allred score [14]. It was determined depending on the proportion of cells which are stained and the intensity of staining. The cut-off value for ER and PR was 10%. HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) protein was appreciated according to the recommendations of the American Society of Clinical Oncology [15]. According to St Gallen International Expert Consensus 2015, the immunohistochemical profile of molecular subtypes was as follows: ER+ and/ or PR+, HER2-, Ki-67 <20% for luminal A; ER+ and/ or PR+, HER2+ and/ or Ki-67 >20% for luminal B/HER2+; ER-, PR-, HER2+ for HER2+ subtype [16]. The specimens which stained negatively for ER, PR, and HER2 protein were qualified as triple-negative subtype. We did not use CK 5/6 and EGFR to establish basal-like subtype.

For evaluation of LVD, the immunostained sections were scanned at low magnification ( $\times 100$ ) to determine the areas of carcinoma with the greatest number of distinctly highlighted vessels. Counting was done by means of Axio Imager A2 microscope (Carl Zeiss, Germany). Zones with greatest number of D2-40 positive lymphatic vessels were analyzed in terms of distribution of lymphatic vessels related to tumor cells and other components of the stroma. Then we counted the num-

mai mare număr de vase D2-40 pozitive. Numărul vaselor limfatice din stroma intratumorală (D2-40it) și peritumorală (D2-40pt) a fost evaluat separat, în 3 câmpuri microscopice pentru fiecare, la mărirea  $\times 200$ . Am considerat vasele limfatice ca fiind intratumorale dacă acestea erau localizate complet în cuibul tumoral. Valoarea finală a DVL pentru fiecare caz a fost exprimată prin media aritmetică a celor trei câmpuri.

#### Analiza datelor

Datele au fost stocate într-o bază de date MS Excel 2010 și analizate cu ajutorul programului SPSS (*SPSS Statistics 23.0*; IBM, Chicago, IL, USA). În acest studiu am utilizat coeficientul de corelație a lui Pearson și am considerat  $p < 0,05$  drept semnificativ statistic.

### Rezultate

Majoritatea tumorilor (48 de cazuri din 84/ 57,1%) au fost moderat diferențiate (G2), urmate în 35 de cazuri (41,7%) de cele slab diferențiate (G3) și doar 1 caz (1,2%) a avut un grad înalt de diferențiere (G1).

Studiul imunohistochimic a pus în evidență 44 de cazuri de subtip luminal B (51,2%), 16 cazuri luminale A (19%), 13 cazuri HER2+ (15,5%) și 12 cazuri (14,3%) carcinoame mamare triplu-negative.

D2-40 a colorat exclusiv endoteliul vaselor limfatice în conformitate cu ghidul producătorului (Figura 1A). Vasele limfatice D2-40 pozitive au fost distribuite neuniform, aveau o formă neregulată și lumen cu perete subțire. Vasele limfatice intratumorale au fost depistate rar (media și deviația std. fiind de  $1,07 \pm 2,76$  vs  $1,87 \pm 3,03$  pentru D2-40pt), ocazional conținând grupuri de celule tumorale invadante (Figura 1B) și având un lumen deschis (Figura 1C, D), vasele limfatice peritumorale au fost mult mai dilatate (Figura 1E și F). De remarcat că valorile numerice maxime atât ale D2-40it, cât și ale D2-40pt au fost obținute în cazul carcinoamelor mamare triplu-negative (respectiv 19 și 17).

În cazul subtipului luminal A, a fost detectată o corelație pozitivă între D2-40it și ER ( $r = 0,611$ ,  $p = 0,012$ ) precum și o corelație negativă între D2-40pt și vârstă ( $r = -0,533$ ,  $p = 0,033$ ).

D2-40pt a corelat pozitiv cu D2-40it ( $r = 0,676$ ,  $p = 0,011$ ) în subtipul HER2+. Aceeași corelație pozitivă a fost regăsită și în carcinoamele mamare triplu-negative ( $r = 0,631$ ,  $p = 0,028$ ). În plus, în cadrul subtipului HER2+, D2-40pt a corelat negativ cu vârsta pacientelor ( $r = -0,584$ ,  $p = 0,046$ ).

Analizând subtipurile moleculare per total, am determinat corelații pozitive dintre D2-40it și gradul tumorii ( $r = 0,289$ ,  $p = 0,008$ ). Totodată, numărul vaselor limfatice intratumorale a fost într-o relație inversă cu vârsta ( $r = -0,242$ ,  $p = 0,026$ ), receptorii hormonal ER ( $r = -0,339$ ,  $p = 0,002$ ) și PR ( $r = -0,245$ ,  $p = 0,024$ ).

În tumorile G2 și G3, D2-40pt a corelat cu D2-40it ( $r = 0,542$ ,  $p = 0,000069$  și  $r = 0,558$ ,  $p = 0,000206$ , respectiv). În cazul tumorilor G3, s-au stabilit corelații inverse dintre numărul vaselor limfatice intratumorale și celulele tumorale ER+ ( $r = -0,406$ ,  $p = 0,016$ ) precum și vârsta pacientelor ( $r = -0,432$ ,  $p = 0,009$ ).

ber of lymphatic vessels from intratumoral (D2-40it) and peritumoral (D2-40pt) stroma separately, 3 microscopic fields for each, at  $\times 200$  magnification. We considered lymphatic vessels as being intratumoral if they were completely located within the tumor nest. The final value of LVD for each case was expressed by the arithmetic average of the three fields.

#### Data analysis

A MS Excel 2010 database was used to store the data that were statistically analyzed with SPSS statistical software package (*SPSS Statistics 23.0*; IBM, Chicago, IL, USA). We used Pearson's correlation coefficient and considered a  $p < 0,05$  as statistically significant.

### Results

Most of tumors (48 cases out of 84/ 57,1%) were moderately differentiated (G2); 35 cases (41,7%) were poorly differentiated (G3) and only 1 case (1,2%) had a high grade of differentiation (G1).

Immunohistochemical staining revealed 44 cases of luminal B subtype (51,2%), 16 cases of luminal A (19%), 13 cases of HER2+ (15,5%) and 12 cases (14,3%) of triple-negative breast carcinomas.

D2-40 stained the endothelium of lymph vessels according to the manufacturer's guide (Figure 1A). The D2-40-positive lymphatic vessels were unevenly distributed, had irregular morphology and thin-walled lumens. Intratumoral lymphatic vessels were very rare (mean and std. deviation being  $1,07 \pm 2,76$  vs  $1,87 \pm 3,03$  for D2-40pt), with opened lumens (Figure 1B) and occasionally contained invading tumor-cell clusters (Figure 1C). The peritumoral lymphatic vessels were enlarged and dilated (Figure 1D). Notably, maximal values of both D2-40it and D2-40pt were achieved in case of triple-negative breast carcinomas (19 and 17, respectively).

For luminal A, a positive correlation was detected between D2-40it and ER ( $r = 0,611$ ,  $p = 0,012$ ) and a negative correlation between D2-40pt and age ( $r = -0,533$ ,  $p = 0,033$ ).

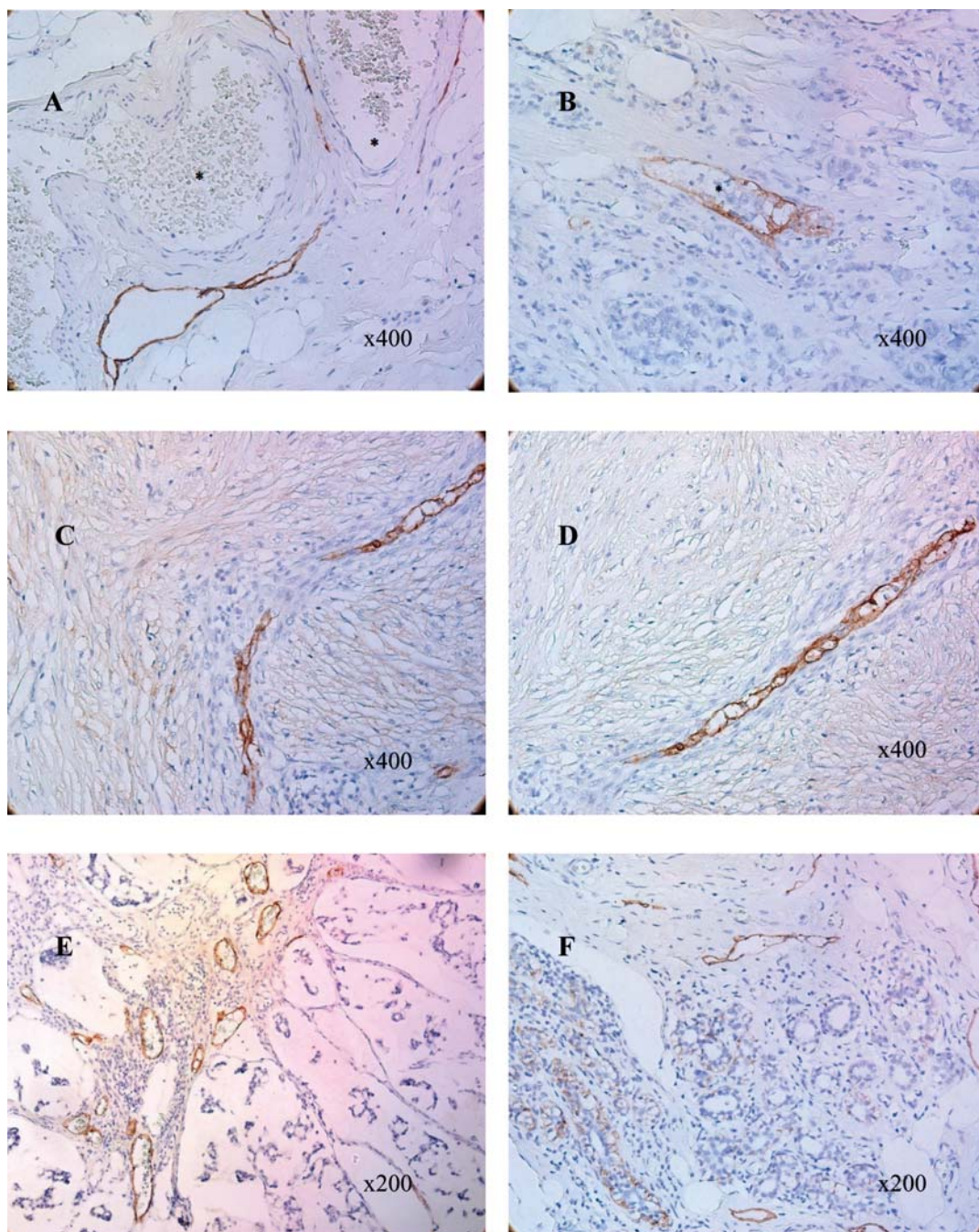
D2-40pt positively correlated with D2-40it ( $r = 0,676$ ,  $p = 0,011$ ) in HER2+ subtype. Same positive correlation was found in triple-negative breast carcinomas ( $r = 0,631$ ,  $p = 0,028$ ). D2-40pt negatively correlated with age in this molecular subtype ( $r = -0,584$ ,  $p = 0,046$ ).

Analyzing overall molecular subtypes, we have found a positive correlation between D2-40it and tumor's grade ( $r = 0,289$ ,  $p = 0,008$ ). The amount of intratumoral lymphatic vessels negatively correlated with age ( $r = -0,242$ ,  $p = 0,026$ ), and hormone receptors ER ( $r = -0,339$ ,  $p = 0,002$ ) and PR ( $r = -0,245$ ,  $p = 0,024$ ).

In G2 and G3 tumors, D2-40pt correlated with D2-40it ( $r = 0,542$ ,  $p = 0,000069$  and  $r = 0,558$ ,  $p = 0,000206$ , respectively). In case of G3 tumors intratumoral lymphatic vessels negatively correlated with the number of ER+ carcinoma cells ( $r = -0,406$ ,  $p = 0,016$ ) and patients' age ( $r = -0,432$ ,  $p = 0,009$ ).

### Discussion

Multiple studies in the field indicate that tumor-associated lymphangiogenesis does occur in various human cancers.



**Fig. 1** Diverse localizări ale vaselor limfatice în carcinoame mamare.

(A) Vase limfatice D2-40+ într-o zonă neafectată. De remarcat vasele sangvine colorate negativ (asterisc); (B) Carcinom mamar invaziv. Invazie limfovaculară (asterisc); (C, D) Carcinom mamar invaziv, vase intratumorale D2-40+; (E, F) Carcinom mamar invaziv. Vase limfatice în aria peritumorală (colorație imunohistochimică anti-D2-40, contracolorare cu hematoxină Mayer).

**Fig. 1** Different localization of lymphatic vessels in breast carcinomas.

(A) Lymphatic vessels D2-40+ in an unaffected region. Note the negatively colored blood vessels (asterisk); (B) Invasive breast carcinoma. Lymphovascular invasion (asterisk); (C, D) Invasive breast carcinoma, intratumoral D2-40+ vessels; (E, F) Invasive breast carcinoma. Lymphatics in the peritumoral area (anti-D2-40 immunohistochemical staining, Mayer's hematoxylin counterstaining).

## Discuții

Multiple studii de specialitate indică faptul că limfangogeneza asociată tumorii are loc în diferite tipuri de cancere. Aceasta promovează metastazarea și are o valoare prognostică pentru pacienți. Mai exact, prezența vaselor limfatice peri-

It promotes metastasis and has prognostic value for patients. Specifically, the presence of peritumoral lymphatic vessels significantly correlated with lymph node metastasis, being more prevalent in node-positive vs node-negative patients. Peritumoral lymphatic vessels were also identified as a key prognos-

tumorale susține metastazarea limfonodală, ultima fiind mai intensă la pacienții cu limfonoduli pozitivi vs negativi. Vasele limfatice peritumorale au fost, de asemenea, recunoscute drept un indicator cheie a prognosticului influențând rata de supraviețuire a pacienților cu cancer mamar [5]. Din păcate, actualul studiu nu dispune de date cu privire la metastazarea în nodurile limfatice santinelă și / sau organele la distanță.

Unele studii au demonstrat absența limfangiogenezei în cancerul de sân, în timp ce altele au raportat prezența vaselor limfatice în cancerul mamar. Padera *et al.*, precum și Leu *et al.* consideră că practic nu există vase limfatice în cadrul masei tumorale [11, 12]. Însă, în lucrarea dată am demonstrat că limfangiogeneza are loc și în interiorul cuibului tumoral, fapt confirmat prin identificarea directă a vaselor limfatice intratumorale D2-40+.

În literatura de specialitate sunt disponibile puține date referitor la specificul limfangiogenezei în diferite subtipuri moleculare ale carcinoamelor mamare, deși este recunoscut că metastazarea decurge în mod diferit [17]. Similar rezultatelor noastre, Arnaout-alkarain *et al.* au demonstrat că prezența vaselor limfatice D2-40+ corelează cu vârsta mai tânără a pacienților; gradul înalt al tumorii, gradul nuclear înalt și numărul de celule ER pozitive [18]. Aceste observații susțin ideea că, cu cât vârsta este mai tânără cu atât este mai mare rata limfangiogenezei, respectiv, cu atât mai rău este prognosticul.

Corelațiile negative dintre D2-40it și expresia receptorilor hormonal (ER și PR) sugerează că estrogenii și progesteronul ar putea avea roluri protectoare. Această ipoteză este susținută și de valorile maxime atât a D2-40it, cât și a D2-40pt în cazurile de carcinoame mamare triplu-negative, ce nu exprimă ER și PR. Raica *et al.* a demonstrat, de asemenea, că în subtipul triplu-negativ de cancer mamar se atestă o densitate mai mare a vaselor limfatice și supraexprimarea VEGF-C și D [19]. În unul din studiile noastre, am demonstrat că în tumorile triplu-negative, mastocitele intratumorale corelează puternic cu cele peritumorale [20]. Aceste celule sunt capabile de a stimula limfangiogeneza; respectiv, aceeași dinamică a fost observată în studiul actual și în cazul vaselor limfatice.

Contrar celor menționate mai sus, Morfoisse *et al.* recent au demonstrat că estradiolul stimulează activarea transcripțională a genelor legate de limfangiogeneza: VEGFR-3, VEGF-D, Lyve-1 și genele HAS, astfel stimulând dezvoltarea capilarelor limfatice. Pierderea ER $\alpha$  s-a soldat cu reducerea expresiei genelor limfangiogene VEGFR-3 și Lyve-1, atât *in vivo* cât și *in vitro* [21]. Mai mult, Brown *et al.* au demonstrat că dezvoltarea postnatală a vaselor limfatice ovariene este asociată cu creșterea foliculilor ovarieni. Potrivit acestui grup de cercetători, vasele limfatice ovariene se dezvoltă conform unui model temporal corespunzător apariției foliculilor secundari, producători de estrogeni. Astfel, factorii de creștere limfangiogeni sunt reglați impresionant de agenți foliculogeni, FSH și estradiol [22].

Interrelațiile dintre vasele limfatice intratumorale și peritumorale în carcinomul mamar sunt puțin reflectate în literatura de specialitate. Rezultatele studiului de față sugerează o corelație pozitivă, puternică dintre limfangiogeneza tumorală și micromediul înconjurător, intensitatea fiind în funcție de subtipul molecular a carcinomului mamar.

tic indicator for the survival rate of patients with breast cancer [5]. Unfortunately, information regarding metastasis to sentinel lymph nodes and / or distant organs was not available in our study.

Several studies have demonstrated the absence of lymphangiogenesis in breast cancer whereas others have reported the presence of lymphatic vessels in breast cancer. Padera *et al.*, as well as Leu *et al.* consider that there are virtually no lymphatic vessels within the tumor mass [11, 12]. However, we have proved that lymphangiogenesis does take place inside of tumor nest by directly identifying D2-40 positive intratumoral lymphatic vessels.

Few data are available concerning the specific profile of lymphangiogenesis in different molecular subtypes of breast carcinomas, despite being shown that their metastatic portrait is different [17]. Similar to our findings, Arnaout-alkarain *et al.* indicated that the presence of D2-40 positive lymph vessels correlated with younger age, high tumor grade, high nuclear grade, and amount of estrogen receptors [18]. These support the idea that the younger the age – the higher the lymphangiogenesis' rate – the worse the prognosis.

Negative correlations between D2-40it and the expression of hormone receptors (ER and PR) suggest that estrogens and progesterone could have a protective role. This idea is supported by maximal values of both D2-40it and D2-40pt in case of triple-negative breast carcinomas. Raica *et al.* has also demonstrated that triple-negative subtype of breast cancer correlates with higher LVD and overexpression of VEGF-C and D [19]. In one of our studies, we demonstrated that in triple-negative tumors, intratumoral mast cells strongly correlate with peritumoral ones [20]. These cells are able to stimulate lymphangiogenesis; the same dynamics being observed in the current study and in the case of lymphatic vessels.

Conversely, Morfoisse *et al.* have recently showed that estradiol targets VEGFR-3, VEGF-D, Lyve-1, and HAS gene expression, thus stimulating development of lymphatic capillaries. Loss of ER $\alpha$  reduces lymphangiogenic gene expression VEGFR-3 and Lyve-1 *in vivo* and *in vitro* [21]. Moreover, Brown *et al.* have shown that ovarian lymphatic vasculature develops postnatally and is associated with ovarian follicle growth. According to this group of scientists, the ovarian lymphatic vasculature develops in conformity to a temporal pattern corresponding to the establishment of estrogenic secondary follicles; thus lymphangiogenic growth factors are strikingly regulated by folliculogenic stimuli, FSH, and estradiol [22].

The interrelationships between intratumoral and peritumoral lymphatic vessels in breast carcinoma are poorly reflected in the literature. The results of the present study suggest a positive, strong correlation between tumor lymphangiogenesis and the surrounding microenvironment, the intensity being depending on the molecular subtype of breast carcinoma.

## Conclusions

Intratumoral lymphatic vessel density correlates with the expression of hormone receptors. The lymphangiogenesis rate is higher in younger patients. The development of intratumoral and peritumoral lymphatic vessels is directly related.



## Concluzii

Densitatea vaselor limfatice intratumorale corelează cu expresia receptorilor hormonal. Intensitatea limfangiogenezei este mai înaltă la pacienții mai tineri. Densitatea vaselor limfatice intratumorale este direct proporțională cu numărul vaselor peritumorale.

## Declarația de conflict de interese

Nimic de declarat.

## Contribuția autorilor

Toți autorii au contribuit în mod egal la această lucrare.

## Mulțumiri

Această cercetare a fost susținută de grantul CNFIS-FDI-2018-0459 oferit de către Ministerul Educației și Cercetării din România. Aducem sincere mulțumiri echipei Disciplinei de Histologie și Centrului de Cercetare în Angiogeneză, Universitatea de Medicină și Farmacie „Victor Babeș”, Timișoara, România.

## Referințe / references

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Ca Cancer J Clin*. 2018; 68:394-424.
- Qian C., Berghuis B., Tsarfaty G., Bruch M., Kort E., Ditlev J. et al. Preparing the “soil”: the primary tumor induces vasculature reorganization in the sentinel lymph node before the arrival of metastatic cancer cells. *Cancer Res*. 2006; 66 (21):10365-10376.
- Alitalo K, Tammela T, Petrova T. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 2005; 438: 946-953.
- Schoppmann S. Lymphangiogenesis, inflammation and metastasis. *Anticancer Res*. 2005; 25 (6 C): 4503-4511.
- Christiansen A., Detmar M. Lymphangiogenesis and Cancer. *Genes and Cancer*, 2011; 2 (12): 1146-1158.
- Pak K, Jo A, Choi H, Choi Y, Kim H, Cheong J. The different role of intratumoral and peritumoral lymphangiogenesis in gastric cancer progression and prognosis. *BMC Cancer*, 2015; 15 (1):1-8.
- Ren W, Gao L, Xu Y, Zhao L, Zhi K.Q, Qi H, Li P. Study on relationship between expression of podoplanin and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Shanghai Journal of Stomatology*, 2012; 21 (4): 437-441.
- Roma A, Magi-Galluzzi C, Kral M, Jin T, Klein E, Zhou M. Peritumoral lymphatic invasion is associated with regional lymph node metastases in prostate adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2006; 19 (3): 392-398.
- Kaneko I, Tanaka S, Oka S, Kawamura T, Hiyama T, Ito M, Yoshihara M, Shimamoto F, Chayama K. Lymphatic vessel density at the site of deepest penetration as a predictor of lymph node metastasis in submucosal colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*, 2007; 50 (1):13-21.
- El-Gohary Y, Metwally G, Saad R, Robinson M, Mesko T, Poppiti R. Prognostic significance of intratumoral and peritumoral lymphatic density and blood vessel density in invasive breast carcinomas. *Am J Clin Pathol*, 2008; 129 (4): 578-586.
- Padera T, Kadambi A, Di Tomaso E, Carreira C, Brown E, Boucher Y, Choi N, Mathisen D, Wain J, Mark E, Munn L, Jain R. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science*, 2002; 296 (5574): 1883-1886.
- Leu A, Berk D, Lybousaki A, Alitalo K, Jain R. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res*, 2000; 60: 4324-4327.
- Zhang S, Zhang D, Yi S, Gong M, Lu C, Cai Y, Tang X, Zou L. The relationship of lymphatic vessel density, lymphovascular invasion, and lymph node metastasis in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 2017; 8 (2): 2863-2873.
- Allred C, Harvey J, MD B, Clark G. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*, 1998; 11: 155-168.
- Wolff A, Hammond M, Allison K, Harvey B, Mangu P, Barlett J, Bilous M, Ellis I, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins R, Press M, Spears P, Vance G, Viale G, Mcshane L, Dowsett M. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *J Clin Oncol*, 2019; 36 (20): 2105-2122.
- Coates A, Winer E, Goldhirsch A, Gelber R, Gnani M, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn H.-J., Panel Members. Tailoring therapies – improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol*, 2015; 26 (8): 1533-1546.
- Raica M, Cimpean A, Ceausu R, Ribatti D, Gaje P. Interplay between mast cells and lymphatic vessels in different molecular types of breast cancer. *Anticancer Res*, 2013; 33 (3): 957-964.
- Arnaout-Alkarain A, Kahn H, Narod S, Sun P, Marks A. Significance of lymph vessel invasion identified by the endothelial lymphatic marker D2-40 in node negative breast cancer. *Mod Pathol*. 2007; 20 (2): 183-191.
- Raica M, Cimpean A, Ceausu R, Ribatti D. Lymphatic microvessel density, VEGF-C, and VEGFR-3 expression in different molecular types of breast cancer. *Anticancer Res*, 2011; 31 (5): 1757-1764.
- Carpenco E, Ceaușu R, Cimpean A, Gaje P, Șaptefrăți L, Fulga V, David V, Raica M. Mast cells as an indicator and prognostic marker in molecular subtypes of breast cancer. *In Vivo*, 2019; 33 (3):743-748.
- Morfoisse F, Tatin F, Chaput B, Therville N, Vaysse C, Metivier R. et al. Lymphatic vasculature requires estrogen receptor  $\alpha$  signaling to protect from lymphedema. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018; 38: 1346-1357.
- Brown H, Robker R, Russell D. Development and hormonal regulation of the ovarian lymphatic vasculature. *Endocrinology*, 2010; 151 (11): 5446-5455.