

DENSITATEA MACROFAGELOR ÎN CADRUL PROGRESIEI NEOPLAZIEI DE CERVIX UTERIN

Lilian Șaptefrați, Vitalie Mazuru, Lucian Rudico, Valeriu David, Veaceslav Fulga
Catedra Histologie, Citologie și Embriologie

Summary

Macrophagal density within the cervical neoplasia progression

In this study we present the density, distribution and morphological peculiarities of CD68 positive macrophages within the progression of uterine cervix neoplasia. Based on obtained results, we can conclude that CD68 positive macrophage density increases gradually as cervical neoplasia progresses reaching the highest value in the squamous cell invasive carcinoma stage. CD68 positive macrophages are ubiquitous in the neoplastic epithelium, where they present different size and frequently may be multinucleated.

Rezumat

În acest studiu prezentăm densitatea, distribuția și particularitățile morfologice ale macrofagelor CD68 pozitive în cadrul progresiei neoplaziei de cervix uterin. În baza rezultatelor obținute, putem concluziona că densitatea macrofagelor CD68 pozitive sporește pe măsura progresiei neoplaziei de col uterin, atingând valori maxime în cazurile cu carcinoame scuamocelulare franc invazive. Macrofagele CD68 pozitive sunt omniprezente în epiteliul neoplazic, unde au dimensiuni mai mari și pot fi multinucleate.

Introducere

Dvorak H.F. (1986) a definit tumora drept o plagă care nu se vindecă [2]. Infiltrarea leucocitelor în țesutul neoplazic poate fi privită drept un răspuns antitumoral, dar sunt numeroase date științifice care confirmă că macrofagele și limfocitele activate din acest infiltrat sunt surse majore de citokine proinflamatoare, factori de creștere și factori angiogenici. Mai mult, există opinii conform cărora inflamația protejează tumorile de răspunsul imun [12]. Datele recente sugerează că macrofagele au un rol important în invazia tumorală, în proliferarea celulară și supraviețuirea metastazelor apropiate și la distanță [8].

În condiții normale, din monocitele sanguine extravazate în țesutul conjunctiv se dezvoltă un tip specific de macrofage „rezidente”, care îndeplinesc un șir de funcții cum ar fi: recunoașterea, captarea și digestia celulelor alterate, a ECM, microorganismelor și substanțelor exogene; implicarea în reacțiile imune; remodelarea tisulară; reglarea turnoverului celular normal [17]. Pe de altă parte, macrofagele reprezintă componentul major al infiltratului inflamator în tumorile primare și secundare, unde au un fenotip distinctiv și sunt numite macrofage asociate tumorii (TAM) [8]. TAM au un fenotip relativ imatur, caracterizat prin expresia slabă a antigenilor macrofagelor diferențiate, carboxipeptidazei M, CD51, prin expresia înaltă a IL-1 și IL-16, expresia joasă a factorului necrozei tumorale- α (TNF- α) [7]. Bineînțeles, expresia acestor markeri variază în limite largi în funcție de tumori și chiar diferite arii tumorale [8]. Spre deosebire de macrofagele țesutului normal, TAM din tumorile experimentale au abilități foarte reduse de a leza celulele tumorale, de a prezenta antigenele tumorale T-limfocitelor și de a expresa citokinele imunostimulatorii pentru proliferarea și funcția antitumorală ale limfocitelor T și NK [3]. Macrofagele au abilitatea de a-și modifica rapid profilul funcțional drept răspuns la modificările din microanturajul lor, transformându-se într-un suport pentru celulele tumorale [12, 16]. După modelul clasificării Th1/Th2, două extreme ale macrofagelor au primit nume de M1 și M2 macrofage [10]. Macrofagele M1 au acțiune antitumorală, exprimă lipopolisaharidele și interferonul- γ . Macrofagele M2 susțin progresia tumorală, exprimă IL-4, IL-13 și alte citokine proprii limfocitelor Th2 [15].

În progresia tumorală, TAM sunt implicate prin mai multe mecanisme. Astfel, TAM situându-se sub membrana bazală în zona de invazie tumorală, facilitează acest proces prin mecanismul de inducție a ciclooxygenazei-2 [15]. TAM secretă intens MMPs (metaloproteinaze

matriceale), în special MMP9 [5, 8,]. În mai multe tumori infiltrația cu TAM corelează pozitiv cu proliferarea tumorală, estimată prin MIB-1, Ki67 sau indicele mitotic [8]. Acest lucru se explică prin faptul că TAM elimină mai mulți factori care stimulează proliferare și supraviețuirea celulelor tumorale. Printre acești factori pot fi menționați EGF (epidermal growth factor), PDGF (plateled-derived growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), HGF (hepatocyte growth factor) și bFGF (basic fibroblast growth factor) [9].

Majoritatea autorilor corelează numărul mare de macrofage în tumori cu un prognostic nefavorabil [8]. În literatura de specialitate există puține date despre rolul macrofagelor în neoplazia de col uterin. Conform Kobayashi A. și col (2008), densitatea macrofagelor CD68 pozitive crește pe măsura sporirii severității neoplaziei, iar expresia MMP-9 de către aceste celule este maximală în CIN3 (neoplazie cervicală intraepitelială) [5]. Davidson B. și col (1999) susțin că densitatea macrofagelor nu corelează cu supraviețuirea în cancerul cervical [1], iar Gonçalves M.A. și Donadi E.A. (2004) afirmă că prezența macrofagelor ar putea fi un indicator al regresiei leziunii [4].

Material și metode

Specimenele și procesarea primară. În studiul prezent au fost prelevate și incluse biopsiile țintite din leziuni evidente macroscopic, materialul postoperator și piesele de conizație. Materialul colectat a fost prelucrat după tehnica histologică uzuală, fixat în formalină și incluzionat în parafină.

Histopatologie. Din fiecare bloc au fost efectuate secțiuni în serii cu grosimea de 3 μm grosime. Secțiunile inițiale au fost colorate cu metoda hematoxină-eozină pentru diagnosticul patologic și stabilirea gradului de diferențiere al tumorii. Leziunile au fost clasificate după cum urmează: CIN1 (*neoplazie cervicală intraepitelială 1*) (n=17), CIN2 (n=11), CIN3 (n=7), carcinom microinvaziv (n=10) și carcinom invaziv (n=49). Cazurile control (n=5) au fost reprezentate de speciamentele normale rezultate în urma procedurii de biopsie.

Imunohistochimie. Pentru evidențierea macrofagelor, am recurs la colorația secțiunilor cu anticorpii primari monoclonali anti-CD68, clona PG-M1, RTU, DakoCytomation (Danemarca). Demascarea antigenului a fost efectuată prin digestie enzimatică. Sistemul de lucru compatibil a fost cel de tip LSAB2, iar cromogenul aplicat 3,3'' diaminobenzidina dihidroclorid, vizualizat printr-o reacție de culoare brună. Nucleii au fost colorați cu hematoxină Lille modificată. Montarea s-a realizat în mediu de montare permanent (balsam de Canada). Întreaga procedură imunohistochimică a fost executată cu ajutorul DakoCytomation Autostainer. Drept control pozitiv intern au fost considerate macrofagele CD-68 pozitive.

Metoda de cuantificare hot spot. este cea mai utilizată metodă manuală de cuantificare a structurilor histologice. La microscopul optic ariile de cuantificare se aleg la o mărire ×200, ceea ce corespunde suprafeții de 0,74 mm². Metoda constă în alegerea a trei zone cu densitatea cea mai mare a macrofagelor, numărarea fiind urmată de calcularea mediei aritmetice.

Analiza statistică. A fost efectuată cu programul SPSS13-0, și a inclus testul Chi pătrat și testul Student, valorile p<0.05, fiind considerate semnificative.

Rezultate

Specificitatea imunocolorării anti-CD68. Produsul final de reacție pentru CD36, macrofagele, s-au colorat în brun cu DAB. Reacția a fost exprimată la nivelul citoplasmei cu pattern difuz.

Distribuția macrofagelor CD68 pozitive în cervixul uterin normal. În speciamentele normale macrofagele erau prezente în stroma subepitelială, mai ales în profunzimea ei, fiind mai puține în epiteliul stratificat scuamos (Tab. 1). Numărul macrofagelor CD68 pozitive sporea în cazul infiltratelor limfo-histiocitare subepiteliale.

Macrofagele CD68 pozitive în leziunile precursore. În CIN1, distribuția macrofagelor CD68 pozitive nu se deosebea de cervixul uterin normal, se constata doar o ușoară creștere a densității acestora. În CIN2, numărul macrofagelor era mai mare, mai ales pe contul infiltrării

epiteliului neoplazic (Tab. 1). Macrofagele intraepiteliale CD68 pozitive erau de dimensiuni mai mari și infiltrau toate straturile epiteliului scuamos, fiind mai puține totuși în stratul superficial. În stromă, macrofagele CD68 pozitive erau localizate mai frecvent la interfața cu epiteliul stratificat scuamos, aderând intim la membrana bazală a acestuia, de asemenea în apropierea vaselor sanguine. O distribuție similară a macrofagelor a fost observată și în cazurile cu CIN3, doar că a fost observată o creștere a densității macrofagelor CD68 pozitive în profunzimea epiteliului neoplazic (Tab. 1-3).

Tabelul 1

Densitatea macrofagelor CD68+ intra- și periepiteliale în cadrul progresiei neoplaziei de col uterin

	Cazuri control (normă)	CIN1	CIN2	CIN3	Carcinom micro-invaziv	Carcinom invaziv
Macrofage CD68+ periepiteliale	106,6±4,9 n=5	118,9±5,5 n=17	125,8±8,8 n=11	123,0±12,1 n=7	309,1±21,1 n=10	405,1±11,3 n=49
Macrofage CD68+ intraepiteliale	51,2±5,1 n=5	56,5±3,6 n=17	78,5±5,2 n=11	104,0±8,0 n=7	207,1±17,8 n=10	194,3±6,4 n=49

Tabelul 2

Compararea densității macrofagelor intraepiteliale CD68+ dintre cazurile control, CIN1-3, carcinom microinvaziv scuamocelular și carcinom invaziv scuamocelular al colului uterin

Diagnosticul histologic	t	p
Control, CIN1	2,19	<0.05
Control, CIN2	9,84	<0.001
Control, CIN3	13,94	<0.001
Control, Carcinom microinvaziv	25,71	<0.001
Control, Carcinom invaziv	58,37	<0.001
CIN1, CIN2	12,16	<0.001
CIN1, CIN3	15,08	<0.001
CIN1, Carcinom microinvaziv	26,48	<0.001
CIN1, Carcinom invaziv	109,56	<0.001
CIN2, CIN3	7,49	<0.001
CIN2, Carcinom microinvaziv	22,04	<0.001
CIN2, Carcinom invaziv	63,66	<0.001
CIN3, Carcinom microinvaziv	16,15	<0.001
CIN3, Carcinom invaziv	28,60	<0.001
Carcinom microinvaziv, Carcinom invaziv	2,25	<0.05

Macrofagele CD68 pozitive în carcinoamele microinvazive și invazive. În cazurile cu carcinoame microinvazive, densitatea macrofagelor CD68 pozitive creștea vertiginos (Tab. 1-3) atât în epiteliul neoplazic, cât și în stroma conjunctivă. Cele mai multe macrofage CD68 pozitive au fost prezente în aria de invazie a carcinomului, unde aceste celule erau mai voluminoase, de asemenea ocazional se întâlneau macrofage multinucleate. Macrofagele CD68 pozitive erau localizate în stroma peritumorală, în imediata apropiere de vasele patului microcirculator, plajele tumorale și, foarte frecvent, chiar în insulele de celule tumorale. Numărul de macrofage CD68 pozitive era maximal în cazurile cu carcinoame scuamocelulare invazive (Tab. 1-3). În aceste cazuri, macrofagele erau omniprezente fiind localizate în stroma peritumorală, în insulele de celule tumorale, în infiltratele inflamatorii, în zonele de necroză a tumorii, în jurul vaselor sanguine și limfatice din ariile peritumorale.

În 16 din 49 cazuri studiate cu carcinoame scuamocelulare invazive au fost observate macrofage multinucleate gigantice. Remarcăm faptul, ca astfel de structuri au fost întâlnite, în exclusivitate, în interiorul insulelor de celule tumorale.

Tabelul 3

Compararea densității macrofagelor periepiteliale CD68+ dintre cazurile control, CIN1-3, carcinom microinvaziv scuamocelular și carcinom invaziv scuamocelular al colului uterin

Diagnosticul histologic	t	p
Control, CIN1	4,78	<0.001
Control, CIN2	5,59	<0.001
Control, CIN3	3,23	<0.01
Control, Carcinom microinvaziv	28,76	<0.001
Control, Carcinom invaziv	109,27	<0.001
CIN1, CIN2	2,35	<0.05
CIN1, CIN3	0,87	1*
CIN1, Carcinom microinvaziv	27,91	<0.001
CIN1, Carcinom invaziv	137,14	<0.001
CIN2, CIN3	0,53	1*
CIN2, Carcinom microinvaziv	25,49	<0.001
CIN2, Carcinom invaziv	90,15	<0.001
CIN3, Carcinom microinvaziv	22,97	<0.001
CIN3, Carcinom invaziv	58,14	<0.001
Carcinom microinvaziv, Carcinom invaziv	13,96	<0.001

* Între grupele comparate nu au fost stabilite deosebiri veridice

Discuții

Componentul inflamator al neoplaziei include o populație celulară diversă: macrofage, limfocite, neutrofile, eozinofile și mastocite. Infiltrarea leucocitelor în focarul neoplazic poate fi privită sub aspect de răspuns antitumoral. Există, însă, multe studii convingătoare care pun în evidență că limfocitele și macrofagele recrutate din patul microcirculator în focarul neoplazic reprezintă sursa majoră de „citokine proinflamatorii”, factori de proliferare și factori angiogenici. Compoziția, distribuția și numărul limfocitelor ce infiltrază tumoarea pot avea impact asupra diagnosticului, pronosticului și tratamentul pacienților cu maladie oncologică.

Macrofagele, prin prisma spectrului său funcțional, sunt celule universale ale organismului, cu o vădită heterogenitate. Această heterogenitate apare în timpul diferențierii lor din precursorii monocitari și este determinată de stimuli genetici, tisulari, imuni. În această ordine de idei, antigenele microbiene, produșii tumorali, complexe imune influențează heterogenitatea și statutul de activare al acestor celule. Sub acțiunea moleculelor microbiene, celulelor canceroase, citokinelor macrofagele răspund prin sinteza substanțelor proinflamatorii/microbicide/tumoricide. Acest răspuns poartă denumirea de „activare clasică” și se realizează când asupra lor acționează interferonul- γ (IFN γ), TNF α , acidul lipoteicoic, proteinele șocului hipertermic, componentele ECM. Macrofagele rezultate în urma activării clasice (M1) și produșii lor joacă un rol important în apărarea contra patogenilor intracelulari, iar în anumite condiții și contra celulelor tumorale. M1, de obicei, produc cantități mari de IL-12 și IL-23 și cantități mici de IL-10. De asemenea sunt promotori puternici ai răspunsului imun T_H1 mediat (Limfocitele T-helper subgrupa 1), manifestă o activitate antiproliferativă și citotoxică, datorită abilității lor de a secreta compuși azotați reactivi, NO, peroxid de hidrogen, superoxid, cât și citokinelor proinflamatorii (TNF, IL-1, IL-6) [11].

Datele noastre vin să confirme multe alte studii similare vis-a-vis de distribuția TAM. TAM se situează sub membrana bazală a epitelului neoplazic, în zona de invazie tumorală, în jurul vaselor microcirculației, în ariile stromale hipoxice și perinecrotice a tumorii. De rând cu

fibroblastele TAM sunt apte de a secreta intens MMP [14], respectiv de a degrada matricea extracelulară (ECM) în cadrul invaziei tumorale. Hipoxia inhibă migrarea macrofagelor, astfel TAM sunt imobilizate în ariile hipooxigenate ale tumorii [6]. Hipoxia supresează activitatea antitumorală a TAM, abilitatea de a fagocita celulele moarte și a prezenta antigenul limfocitelor T, reduc sinteza a TNF- α [8]. Migrarea TAM în zonele hipoxice/necrotice este extrem de importantă pentru supraviețuirea celulelor tumorale, care au nevoie de vascularizare.

Cele expuse mai sus pledează în mod evident pentru implicarea TAM în angiogeneza tumoral-indusă prin formarea vaselor sangvine noi și remodelarea lor ulterioară într-o rețea vasculară funcțională. Fiind recrutate din sângele periferic, TAM migrează în zonele de hipoxie a tumorii, unde este nevoie acută de o rețea vasculară pentru supraviețuirea celulelor tumorale, fiind aici activate de către factorii de semnalizare locali. În urma activării, la care sunt supuse, macrofagele recrutate se diferențiază spre un fenotip polarizant ce sintetizează intens factori proangiogeni. Acest lucru contribuie la formarea vaselor sangvine noi, fapt ce va determina creșterea locală a tumorii și supraviețuirea celulelor canceroase. Mai mult, sunt date despre implicarea TAM și în procesul de limfogeneză tumorală [13].

O perioadă îndelungată de timp prezența macrofagelor în zona tumorală și peritumorală a fost interpretată drept un răspuns adecvat al organismului gazdă la tumoarea în creștere, această prezență fiind considerată o încercare a organismului de a inhiba procesul tumoral. Cu timpul, însă, a devenit tot mai clar că TAM sunt niște actori activi în progresia tumorii și răspândirea celulelor neoplazice. Studiile experimentale și preclinice au fost susținute de un număr mare de studii clinice, care au găsit corelații semnificative între densitatea macrofagală crescută și prognosticul prost. TAM favorizează progresia tumorii prin multiple mecanisme: creșterea tumorii, invazie, imunosupresie și supraviețuirea celulelor neoplazice, remodelarea stromală, angiogeneză, limfangiogeneză, metastazare. Datorită acestei implicări multicomponente în procesul de progresie TAM au devenit o țintă terapeutică atractivă. Au fost identificate 3 verigi patogenetice de perspectivă, asupra cărora să se influențeze medicamentos: 1) inhibiția recrutării lor în zona leziunii; 2) inhibiția efectului lor proangiogen și remodelării stromale; 3) reversia imunosupresiei cu restabilirea abilităților sale citotoxice antitumorale.

Concluzii

1. Densitatea macrofagelor CD68 pozitive sporește pe măsura progresiei neoplaziei de col uterin, atingând valori maxime în cu carcinoame scuamocelulare franc invazive.
2. Macrofagele CD68 pozitive sunt omniprezente în epiteliul neoplazic, unde au dimensiuni mai mari și pot fi multinucleate.

Bibliografie

1. Davidson B. et al. Macrophage infiltration and angiogenesis in cervical squamous cell carcinoma – clinicopathologic correlation. In: Acta Obstet Gynecol Scand. 1999, vol. 78, nr. 3, p. 240-244.
2. Dvorak H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. In: N Engl J Med. 1986, vol. 315, nr. 26, p. 1650-1659.
3. Elgert K.D., Alleva D.G., Mullins D.W. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. In: J Leukoc Biol. 1998, vol. 64, nr.3, p. 275-290.
4. Gonçalves M.A., Donadi E.A. Immune cellular response to HPV: current concepts. In: Braz J Infect Dis. 2004, vol. 8, nr. 1, p. 1-9.
5. Kobayashi A. et al. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. In: Mucosal Immunol. 2008, vol. 1, nr. 5, p. 412-420.
6. Leek R.D. et al. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. In: Br J Cancer. 1999, vol. 79, nr. 5-6, p. 991-995.
7. Leek R.D., Harris A.L. Tumor-associated macrophages in breast cancer. In: J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2002, vol. 7, nr. 2, p. 177-189.

8. Lewis C.E., Pollard J.W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. In: Cancer Res. 2006, vol. 66, nr. 2, p. 605-612.
9. Lin E.Y. et al. Vascular endothelial growth factor restores delayed tumor progression in tumors depleted of macrophages. In: Mol Oncol. 2007, vol. 1, nr. 3, p. 288-302.
10. Martinez F.O. et al. Transcriptional profiling of the human monocyte-to macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. In: J Immunol. 2006, nr. 199, p. 7303–7311.
11. Mazuru V. Rolul pivotal al macrofagelor in progresia tumorală. In: Curierul medical. 2010, nr. 4 (316), p. 5-61.
12. Nelson D., Ganss R. Tumor growth or regression: powered by inflammation. In: J Leukoc Biol. 2006, vol. 80, nr. 4, p. 685-690.
13. Schoppmann S.F. et al. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. In: Am J Pathol. 2002, vol. 161, nr. 3, p. 947-956.
14. Tang Y. et al. Tumor-stroma interaction: positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN. In: Mol Cancer Res. 2004, vol. 2, nr. 2, p. 73-80.
15. Tjiu J.W. et al. Tumor-associated macrophage-induced invasion and angiogenesis of human basal cell carcinoma cells by cyclooxygenase-2 induction. In: J Invest Dermatol. 2009, vol. 129, nr. 4, p. 1016-1025.
16. Watkins S.K. et al. IL-12 rapidly alter the functional profiles of tumor-associated and tumor-infiltrating macrophages in vitro and in vivo. In: J Immunol. 2007, nr. 178, p. 1357–1362.
17. Быков В.Л. Цитология и общая гистология (функциональная морфология клеток и тканей человека). In: Изд. СОТИС, Санкт-Петербург, 2001, 520с.

PROLIFERAREA LIMFOVASCULARĂ ÎN NEOPLAZIA SCUAMO- CELULARĂ DE CERVIX UTERIN

Vitalie Mazuru, Veaceslav Fulga, Oxana Mazuru, Tatiana Globa, Lilian Șaptefrați
Catedra Histologie, Citologie și Embriologie

Summary

Lymphovascular proliferation within the squamous cell neoplasia of uterine cervix

The aim of this research was the study of proliferative lymphatics microvascular density in preneoplastic and neoplastic lesions of uterine cervix. *Material:* squamous metaplasia – (n=22) cases, CIN I – (n=16), CIN II – (n=14), CIN III – (n=6), microinvasive carcinoma – (n=15), invasive carcinoma – (n=32). *Methods:* for histopathologic diagnosis and lesion's stadialisation hematoxilin&eosin staining has been used. For identification of general LMVD and density of proliferative lymphatics the LSAB+/HRP Double Stain technique were performed. Two monoclonal antibodies have been used: anti D2-40 and anti Ki-67. Weidner hot spot modified method was used for lymphatic vessels quantification. *Results:* proliferative lymphatic vessels density in squamous metaplasia was equal with 0,93; CIN I – 1,4; CIN II – 3,33; CIN III – 4,56; microinvasive carcinoma – 3,01; invasive carcinoma – 2,14. Intratumoral lymphatics were small, flattened, without lumen. Peritumoral lymphatics were large, with distinct lumen. In peritumoral area were found 21 lymphatic vessels with tumor emboli inside, 8 of them were proliferative lymphatics. *Conclusions:* preneoplastic and neoplastic lesions of uterine cervix determine active formation of new lymphatic vessels. Lymphangiogenic switch begins in CIN I stage. In CIN III stage the LMVD is the highest. The intensity of tumor lymphangiogenesis is not smaller than in CIN stages. The spreading of tumor cells occurs through both types of lymphatic vessels: preexisting and newly formed.