

## Progresia neoplaziei de cervix uterin și activarea limfangiogenezei

L. Șaptefrați

Catedra Histologie, Citologie și Embriologie, USMF „Nicolae Testemițanu”

### Progression of Neoplasm in the Cervix Accompanied by Limfangiogenesis

The difficulty of creating a complete molecular characterization of uterine cervix cancer is the greatest problem in determining a proper course of therapy in treating the disease. Little data are available about D2-40 expression in both lymphatic endothelial cells and tumor cells of uterine cervix cancer. The aim of the present work was to study the involvement of lymphatics in the prognosis and tumor progression of the uterine cervix lesions. We used D2-40 immunostaining to highlight lymphatic vessels from squamous cell metaplasia (n=17), cervical intraepithelial neoplasia (n=11), carcinoma in situ (n=7), microinvasive carcinoma (n=10), and invasive carcinoma (n=49) using the avidin-biotin technique (LSAB+). We found inconsistencies between the interpretation of the lymphovascular invasion of the routine haematoxylin-and-eosin-stained cells and others observed immunohistochemically. Our results showed differences in the distribution and D2-40 expression in lymphatic vessels and tumor cells from the cervix lesions linked to their histopathology and the grade of the tumor.

**Key words:** uterine cervix cancer, lymphangiogenesis, immunohistochemistry.

### Прогрессирование неоплазии шейки матки и активация лимфангиогенеза

Недостаточно изученный молекулярный профиль рака шейки матки представляет собой главную проблему специфического лечения данного заболевания. В научной литературе имеются весьма скудные данные касательно экспрессии D2-40 как в эндотелиальных клетках лимфатических сосудов, так и в опухолевых клетках при раке шейки матки. Целью настоящего исследования было определение вовлечения лимфатических сосудов в прогрессировании неоплазии шейки матки. Для этого мы провели иммуногистохимическое исследование лимфатических сосудов с использованием маркера D2-40 (техника LSAB+) у 17 пациенток с плоскоклеточной метаплазией, 11 пациенток с дисплазией, 7 пациенток с карциномой in situ, 10 пациенток с микроинвазивной карциномой и 49 пациенток с инвазивной карциномой. Обнаружено значительное несоответствие в интерпретации лимфососудистой инвазии при исследовании гистологических срезов, окрашенных гематоксилин-эозином и срезов окрашенных по иммуногистохимической методике. Наши данные выявили существенные различия в распределении лимфатических сосудов и экспрессии D2-40 в опухолевых клетках в зависимости от степени и гистопатологического типа рака.

**Ключевые слова:** рак шейки матки, лимфангиогенез, иммуногистохимия.

### Introducere

Cancerul de col uterin până în prezent rămâne o problemă importantă din punct de vedere al particularităților biologice, al factorilor moleculari de prognostic și de terapie țintită. Incidența acestei tumori, mai ales când ne referim la leziunile invazive, a fost redusă esențial în multe țări prin introducerea programelor de *screening*.

În pofida celor expuse, în literatura de specialitate există modeste date despre markerii moleculari și despre valoarea lor predictivă în carcinomul de col uterin. Majoritatea cercetărilor efectuate au fost axate pe studiul celulelor tumorale în detrimentul stromei tumorale, căreia i s-a atribuit o atenție mult mai redusă. Să nu uităm că în progresia tumorală locală angiogeneza, adică formarea vaselor sangvine noi din vasele preexistente, are un rol decisiv. Mai bine de 30 de ani în urmă, Folkman (1971) a demonstrat că, în absența vaselor sangvine, tumorile nu pot crește în dimensiuni mai mult de 2-3 mm. De atunci și până în prezent în numeroase studii a fost investigat rolul angiogenezei în progresia tumorală și în invazia metastatică. La pacientele cu cancer de col uterin a fost demonstrată corelația directă între microdensitatea vasculară, secreția factorilor angiogenici, expresia receptorilor specifici cu stadiul tumorii și cu supraviețuirea.

Statutul nodulilor limfatici este un factor de prognostic bine cunoscut în majoritatea tumorilor umane și are o importanță majoră în stabilirea strategiei terapeutice. În pofida importanței acestui element, larg acceptat și recunoscut, limfangiogeneza este relativ puțin studiată. Acest lucru poate

fi explicat parțial prin lipsa de markeri specifici ai endoteliului limfatic, introduși în practică doar în ultimii ani. Există un șir întreg de întrebări la care nu avem răspunsuri, atunci când vorbim despre vasele limfatice (VL): 1) Este adevărat că VL apar din venulele postcapilare? 2) Se produce limfangiogeneza în tumorile de col uterin? 3) La ce etapă a cancerogenezei cervicale începe limfangiogeneza? 4) Cum pătrund celulele tumorale în VL? 5) Are oare densitatea microvasculară limfatică (DMVL) impact predictiv la pacientele cu cancer cervical, așa cum este demonstrat în tumorile cu alte localizări? Datele disponibile despre VL în cancerul de col uterin sunt puține și controversate. Mai mult, nu avem referințe despre VL în cervixul normal cât și în leziunile precursoare ale cancerului cervical.

Din aceste considerente ne-am propus să studiem VL și să evaluăm DMVL în funcție de sporirea gradului de severitate a neoplaziei de col uterin. Pentru atingerea acestui scop am utilizat cel mai specific marker al endoteliului limfatic – D2-40.

### Material și metode

Au fost investigate biopsiile țintite din cervixul uterin și speciamentele colectate prin conizație de la pacientele cu leziuni detectate macroscopic. Speciamentele au fost fixate în formol tamponat și incluzionate la parafină conform tehnicii histologice convenționale. Ulterior, s-au efectuat secțiuni de grosimea 3 mkm. Inițial secțiunile au fost colorate cu hematoxilină și cu eozină pentru stabilirea diagnosticului histopatologic și a gradului tumorii. Leziunile au fost divizate în metaplasie celulară scuamoasă (17), neoplazie cervicală

intraepitelială (11), carcinom *in situ* (7), carcinom microinvaziv (10) și carcinom invaziv (49). Specimenele de conizare ale cervixului uterin cu aspect normal au fost folosite drept control (5). În subgrupele de carcinom microinvaziv și invaziv, gradul tumorii G1 a fost atestat în 29 de cazuri, G2 – în 22 de cazuri și G3 – în 8 cazuri. Pentru evidențierea epitopilor de podoplanină ale celulelor endoteliale din VL, secțiunile au fost incubate timp de 30 minute cu anticorpii primari D2-40, RTU, DakoCytomation (Danemarca). Am folosit tehnica imunohistochimică avidin biotină cu utilizarea sistemului de lucru LSAB+. Drept control pozitiv intern au fost considerate celulele bazale ale epitelului stratificat scuamos al cervixului, cât și celulele endoteliale ale VL. Nucleele au fost colorate cu hematoxilina Lille modificată. Întreaga procedură imunohistochimică a fost executată cu ajutorul *DakoCytomation Autostainer*.

DMVL a fost calculată prin metoda *hot spot* (câmpurile fierbinți), utilizând următorul protocol: în fiecare secțiune au fost selectate trei câmpuri fierbinți (cu densitatea maximă a VL) la amplificarea  $\times 100$  a microscopului fonic, după care vasele erau numărate la amplificarea  $\times 200$ . Rezultatul final era considerat media aritmetică a acestor trei câmpuri. Numărarea urma toți pașii recomandați de Weidner et al. [2] și de Van der Auwera et al. [3]. Imaginile microscopice au fost capturate în formatul JPEG la microscopul *Nikon Eclipse E600*. Analiza statistică a fost efectuată cu ajutorul softului *SPSS 13.0 soft* și includea criteriul *chi pătrat* cât și criteriul *Student*, unde  $p < 0,05$  era considerat drept semnificativ.

## Rezultate

**Specificitatea D2-40.** În speciemenle normale, preluate prin conizații, produsul final al reacției a fost restricționat la nivelul endoteliului limfatic și nu a antrenat endoteliul vaselor sangvine. Pe de altă parte, D2-40 nu a fost exprimat doar de celulele endoteliale ale VL, ci și de celulele bazale ale epitelului stratificat scuamos ale exocolului. Reacția a fost exprimată la nivelul citolemei în cazul celulelor endoteliale limfatice și cu *pattern* difuz, în cazul celulelor bazale ale epitelului.

**Tipul și distribuția VL în cervixul uterin normal.** În lamina proprie superficială a cervixului normal VL erau rare și mici sau, eventual, lipseau. Am observat în toate cazurile VL localizate la o distanță mai mare de epiteliu – în lamina proprie profundă, unde densitatea lor varia de la 5 până la 6,6/ $\times 200$ , cu o medie de 5,8. În tunica musculară DMVL a fost de la 5,3 până la 7 cu o medie de 6,15.

**Tipul și distribuția VL în leziunile precursorare.** În metaplazia scuamocelulară distribuția și numărul VL nu se deosebea semnificativ de rezultatele obținute în cervixul normal. O creștere semnificativă a numărului de VL a fost observată în cazurile cu neoplazie intraepitelială cervicală severă. În aceste cazuri am observat prezența multiplexelor VL, cu o densitate de la 5,3 până la 11, cu o medie de 8,15, localizate imediat sub epiteliu. Prezintă interes faptul că în aceste cazuri expresia D2-40 în celulele bazale ale epitelului stratificat scuamos, de asemenea, a sporit semnificativ. În carcinoamele *in situ* DMVL a fost de la 6,3 până la 12,7, cu o medie de 9,55.

**VL în carcinoamele microinvazive și invazive.** VL intratumorale au fost depistate atât în cazurile cu microcarcinoame, cât și în cele cu carcinoame invazive. VL intratumorale erau foarte rare, cu un lumen mic, iregulate uneori conțineau celule tumorale. VL peritumorale erau mult mai numeroase, sinuoase,

largi, ocazional conțineau celule tumorale. DMVL în carcinoamele invazive a fost de la 0 la 13,7, cu o medie de 6,47, iar în carcinoamele microinvazive a fost de la 10 până la 20,7, cu o medie de 15,61/ $\times 200$ .

Expresia în celulele tumorale. Celulele tumorale pozitive la D2-40 au fost depistate în 43 de cazuri (72,9%). Reacția era considerată pozitivă când mai mult de 5% din celulele tumorale exprimau markerul cu *pattern* focal, difuz sau mixt. Am definit *pattern*-ul difuz drept o exprimare uniformă în celulele tumorale a D2-40, *pattern*-ul focal drept cuiburi de celule tumorale pozitive printre straturile de celule tumorale ce nu exprimă markerul, iar combinația celor două variante nominalizate alcătuia *pattern*-ul mixt. În 17 cazuri (28,8%), masive largi de celule tumorale negative erau decorate cu 1-2 fâșii de celule tumorale pozitive la D2-40. În 21 de cazuri (35,6%) reacția a fost pozitivă, de o manieră heterogenă sau omogenă, în toate celulele tumorale. *Pattern*-ul mixt a fost depistat doar în 5 cazuri (8,5%). Remarcăm faptul că în frontul de invazie a tumorii celulele tumorale localizate în grupuri mici exprimau D2-40. Nu a fost stabilită corelația între gradul tumorii și expresia D2-40 în celulele tumorale. În pofida acestui fapt, expresia markerului în celulele tumorale a predominat în cazurile G1 și G2 ale tumorii.

## Discuții

Discriminarea capilarelor sangvine de cele limfatice prin intermediul metodelor histologice este destul de dificilă. Apariția markerilor, cu o specificitate înaltă, cum ar fi VEGFR3, LYVE-1, Prox-1, podoplanina și D2-40 a adus contribuții valoroase în domeniul morfologiei și al distribuției VL, facilitând cuantificarea lor pe secțiunile histologice. Am selectat pentru acest studiu markerul D2-40, deoarece acesta are cea mai înaltă sensibilitate și specificitate pentru endoteliul VL, fapt confirmat în mai multe publicații [4]. Rezultatele noastre atestă că D2-40 se exprimă în endoteliul limfatic și nu se exprimă în endoteliul vaselor sangvine. Această proprietate poate fi utilizată pentru estimarea DMVL în relația cu eventualii factori de prognostic în tumorile maligne.

Pe de altă parte, am constatat exprimarea strictă a D2-40 în celulele bazale ale epitelului exocolului uterin. Aceste date sunt în acord cu alte cercetări care au dovedit exprimarea acestui marker la o varietate largă de celule normale cum ar fi podocitele, osteoblastele, alveolocitele de tip I, celulele mioepiteliale, celulele foliculare dendritice, celulele nediferențiate ale glandelor sebacee. Spectrul reacției pozitive în țesuturile normale arată că, în cervixul uterin normal și în cel patologic, markerul D2-40 este exprimat doar de VL și de keratinocitele bazale.

Am depistat un număr sporit de VL în lamina proprie superficială, în cazurile cu neoplazie intraepitelială severă, aspect relatat și de alți cercetători [5]. Formarea VL în lamina proprie superficială poate fi indusă de factorii solubili secretați de celulele bazale care în aceste cazuri exprimau mult mai intens D2-40.

VL au fost identificate în multe tumori, cum ar fi melanomul malign, cancerul mamar, carcinomul scuamocelular, carcinomul gastric. În majoritatea dintre aceste studii a fost stabilită corelația între DMVL, gradul tumorii și statutul ganglionilor limfatici. Un alt aspect comun al VL este faptul că densitatea limfaticelor peritumorale este semnificativ mai mare decât a celor intratumorale. Mai mult, în unele cazuri VL

nu au fost depistate în ariile tumorale, acestea fiind localizate doar în țesutul peritumoral.

În literatura de specialitate există puține studii axate pe limfangiogeneza în leziunile neoplazice ale cervixului uterin. O parte dintre ele au avut drept scop evaluarea valorii de prognostic a invaziei limfovaskulare în relație cu statutul ganglionilor limfatici regionali și cu metastazarea sistemică [6, 7]. S-a relatat că invazia limfovaskulară este semnificativ mai mare (cu mult decât cea prognozată inițial), la pacientele cu metastaze, în raport cu cele fără metastaze. În studiul prezent, am demonstrat că invazia limfovaskulară a fost stabilită la colorația cu hematoxilina-eozină în 27 cazuri din 59, iar pe secțiunile tratate imunohistochimic cu D2-40 invazia limfovaskulară a fost depistată doar în 14 cazuri. Rezultatele noastre sunt în contrast cu datele oferite de Miyakuni Y. și colab. (2008) care au arătat o supraestimare a invaziei limfovaskulare în adenocarcinomul endometrial prin imunocolorarea cu D2-40. Pe de altă parte, Urabe A. și col. (2006) relatează o supraestimare a invaziei limfovaskulare în examenul histologic de rutină, în carcinomul scuamos de col uterin. Aceasta sugerează necesitatea utilizării markerului D2-40 în asigurare de acuratețe a diagnosticului de invazie limfovaskulară în vederea suspectării metastazelor limfonodale.

Actualmente există opinia conform căreia invazia limfovaskulară precede metastazarea în ganglionii limfatici. Invazia celulelor tumorale în VL inițiale este un subiect aparte de dezbateri. Studiile recente arată că, în acest proces, activarea VEGFR3 (*vascular endothelial growth factor receptor 3*) este decisivă pentru înmugurirea VL [8].

Valoarea prognostică a DMVL mai este deocamdată controversată în multe tumori umane și este elucidată incomplet în tumorile de cervix uterin. Unii autori arată că DMVL crește semnificativ pe măsura progresiei neoplaziei cervicale. În studiul prezent uneori a fost destul de dificil de cuantificat VL, deoarece într-un număr important de cazuri de carcinom invaziv celulele tumorale erau pozitive la markerul D2-40. Din aceste considerente au fost numărate doar vasele cu un lumen definit. Am stabilit că valoarea DMVL, la pacientele cu neoplazie cervicală intraepitelială, este semnificativ mai mare decât la cele cu metaplazie scuamoasă. Acest fapt ne indică că limfangiogeneza este un eveniment precoce în evoluția neoplaziei. DMVL descrește semnificativ la pacientele cu carcinoame invazive, în special în ariile intratumorale. Bazându-ne pe aceste date, putem presupune că doar DMVL peritumoral în asociere cu invazia limfovaskulară are rol predictiv în apariția metastazelor în ganglionii limfatici.

Expresia D2-40 și a podoplaninei de către celulele tumorale a fost raportată în mai multe tumori umane, cum ar fi carcinomul scuamocelular, mezoteliomul, tumorile din celule germinative și tumorile cerebrale. În carcinomul invaziv al cervixului uterin D2-40/podoplanina au fost depistate în 71%

din cazuri (cu *pattern* difuz, în 12% din cazuri și respectiv cu *pattern* focal, în 59% din cazuri). Dumoff K. L. și colab. (2005) au depistat o corelație între prezența celulelor D2-40 pozitive, invazia limfovaskulară și prezența metastazelor limfonodale. Surprinzător, în altă lucrare efectuată de aceeași echipă, a fost relatat faptul că expresia slabă a podoplaninei în biopsiile inițiale ale pacientelor, care au făcut un tratament cu iradiere primară, corela cu riscul înalt al invaziei limfovaskulare și cu metastazarea în ganglionii limfatici [10]. În acest studiu am depistat celule tumorale pozitive pentru D2-40 în 43 din 59 de cazuri (72,9%), ceea ce este comparabil cu datele din literatură. Se cere de menționat că am introdus al treilea *pattern* al expresiei D2-40 în celulele tumorale, varianta mixtă, care nu a fost raportată în literatura de specialitate. Rezultatele noastre arată că doar un număr mic de cazuri poate fi atribuit acestei variante (8,5%). De asemenea, am stabilit o corelație între DMVL și gradul tumorii; este adevărat că această corelație a fost stabilită doar în cazul gradului G2. În cazurile cu un *pattern* focal, celulele D2-40 pozitive au fost localizate cel mai frecvent la interfața cu stroma tumorală și, având drept reper acest aspect, putem presupune că aceste celule sunt responsabile de progresia și de invazia tumorală.

#### Concluzii

1. DMVL atinge valori înalte în neoplazia intraepitelială, carcinomul *in situ* și în carcinomul microinvaziv al cervixului uterin.
2. Progresia neoplaziei de cervix uterin este acompaniată de activarea limfangiogenezei.
3. În pofida lipsei corelației între expresia D2-40 și parametrii histopatologici, menționăm predominarea *pattern*-ului difuz în carcinoamele invazive de tipul G1.

#### Bibliografie

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.*, 1971; 285(21): 1182-1186.
2. Weidner N., Semple J. P., Welch W. R., Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 1991; 324: 1-8.
3. Van der Auwera I., Cao Y., Pepper M. S. et al. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br. J. Cancer*, 2006; 95: 1611-1625.
4. Raica M., Cimpean A. M., Ribatti D. The role of podoplanin in tumor progression and metastasis. *Anticancer Res.*, 2008; 28: 5B: 2997-3006.

Lilian Șaptefrăți, dr., conferențiar  
Catedra Histologie, Citologie și Embriologie  
USMF „Nicolae Testemițanu”  
Chișinău, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 192  
Tel.: 205229  
E-mail: la\_saptefrati@yahoo.com

Recepționat 10.03.2009