

6. Drosse I., Volkmer E., Capanna R., De Biase P., Mutschler W., Schieker M. Tissue engineering for bone defect healing: An update on a multi-component approach *Injury*, V. 39, Suppl. 2, September 2008, p. S9-S20.
7. Farge D. Les greffes. *Traité de Médecine* 4 edition, Paris, 2004, p. 3086-3145.
8. Fraser J. K., Wulur I., Alfonso Z., Hedrick M. H. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnology*, 2006 Apr; 24(4): 150-154.
9. Fukuchi Y., Nakajima H., Sugiyama D. et al. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *STEM CELLS* 2004; 22: 649-658.
10. Gautschi O. P., Frey S. P., Zellweger R. Bone morphogenetic proteins in clinical applications, *ANZ. J. Surg.*, 77 (2007): 626-631.
11. Hak D. J. The Use of Osteoconductive Bone Graft Substitutes in Orthopaedic Trauma, *Am. Acad. Orthop. Surg.*, Vol. 15, No. 9, September 2007, p. 525-536.
12. Kanczler J. M., Oreffo R. O. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone, *Eur. Cell. Mater.*, 15 (2008): 100-114.
13. Malaval L., Wade-Guéye M. N., Boudiffa M., Jia Fei., Ralph Zirngibl., Frieda Chen., Laroche N., Roux J.-P. et al. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis *The Journal of Experimental Medicine*, 2008, Vol. 205, N. 5, p. 1145-1153.
14. Muschler G. F., Nakamoto C., Griffith L. G. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J. Bone. Joint. Surg. Am.*, 2004; 86: 1541-1558.
- 15) Nacu V. Compozite morfoinductive grafts in healing of the experimental defect in short bones. *J. Morphology.*, Vol. 129: 4: 2006: 89-90.
16. Nacu V. Recuperarea defectului de dimensiune critică al osului parietal la iepure prin grefe compozite. *Curierul medical*, 2008, nr. 6, p. 66-72.
17. Popescu Negreanu T. Utilizarea bioceramicilor și materialelor compozit pe bază de biovitroceramică și collagen în ortopedie. *Revista de ortopedie și traumatologie* Vol. 11, 2001, nr. 1-2. p. 3 - 13.
18. Stangenberg L., Schaefer D. J., Buettner O. et al. Differentiation of osteoblasts in three-dimensional culture in processed cancellous bone matrix: quantitative analysis of gene expression based on realtime reverse transcription-polymerase chain reaction, *Tissue Eng.*, 11 (2005): 855-864.
19. Verega G. The lateral brachial osteofasciocutaneous flap: a new variant of distal migration. *Romanian Journal of Hand and Reconstructive Microsurgery*, vol. 7, no. 3- 4, a. 2002, p. 9-19.
20. Берсенев А. Б. Клеточная трансплантология – история, современное состояние и перспективы. *Журнал Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*; 2005, № 2, с. 56-61.
21. Владимирская Е. Б., Майорова О. А., Румянцев С. А., Румянцев А. Г. Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками, ИД Медпрактика-М., М. 2005, 392 с.
22. Лаврищева Г. И., Карпов С. П., Бачу И. С. Регенерация и кровоснабжение кости. Кишинев. Штиинца, 1981.
23. Марин И. М. Хирургическое лечение доброкачественных опухолей костей. Кишинев “Штиинца”, 1981, 191 с.
24. Топор Б. М. Комбинированные пластические материалы из костного матрикса и эмбриональных тканей. Дис. д-ра хаб. мед. наук. М. 1991, 354 с.

Viorel Nacu, dr., conferențiar
Catedra Chirurgie operatorie și Anatomie topografică
USMF „Nicolae Testemițanu”
Chișinău, Ștefan cel Mare, 192
Tel.: 205242
E-mail: nacu_viorel@yahoo.com

Recepționat 25.05.2009

Limfangiogeneza normală și tumorală

L. Șaptefrăți

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

Normal and Tumoral Lymphangiogenesis

In many malignant tumours the lymphatic system represents the main path for metastatic dissemination of the tumor cells in the lymph nodes. As is well known, the status of the lymph nodes is the prognostic factor in numerous human tumors and has great importance in establishing of the therapeutic strategy. Nevertheless, recent scientific data about lymphatic metastases, especially in the early stages of the tumoral proliferation, is insufficient. It is known that metastases of the tumour cells involve blood and lymphatic vascular systems. Tumoral cells influence these systems via secretion of growth factors necessary for formation of certain vascular networks which may facilitate the spread of metastasis. It is not yet clear, however, whether tumor cells invade the existent peripheral lymphatic vessels or invade the newly-created vessels which are formed during tumoral lymphangiogenesis. This is due to the later introduction of specific markers for lymphatic endothelium, insufficient knowledge of the factors which are implicated in the lymphangiogenesis, and the absence of experimental models which can permit the quantitative evaluation of metastases in the lymph nodes. Molecular control of the tumoral lymphangiogenesis and knowledge of the mechanism of lymphatic tumoral metastasis will offer new therapeutic tactics in treating human cancer. The aim of the study was the critical analysis of the literature regarding the structure, functions, and development of lymphatic vessels and their importance in tumoral pathology. Current understanding of the roles of lymphangiogenic factors, the mechanism of lymphatic metastases, and the inhibited therapeutic opportunity of lymphangiogenesis will also be presented.

Key words: lymphatic endothelial cell, lymphangiogenesis, cancer.

Нормальный и опухолевый лимфангиогенез

Лимфатические сосуды представляют собой главный путь метастатической диссеминации опухолевых клеток в региональные лимфатические узлы. Состояние лимфатических узлов является хорошо известным фактором прогноза онкологических заболеваний и имеет решающее значение при выборе тактики лечения. Тем не менее в современной научной литературе недостаточно данных, проливающих свет на процесс лимфатического метастазирования, особенно на ранних стадиях его развития. Диссеминация опухолевых клеток через кровеносное и лимфатическое русла на сегодняшний день является общепризнанным фактом. Злокачественные клетки

способны воздействовать на кровеносные и лимфатические сосуды с помощью выделяемых факторов роста, вызывая тем самым возникновение собственной сосудистой сети, призванной обеспечить рост и инвазию опухоли. До сих пор точно не установлено: проникают ли опухолевые клетки в существующие лимфатические сосуды или же в сосуды, возникшие в результате лимфангиогенеза. Такое состояние дел объясняется поздним появлением иммуногистохимических маркеров для эндотелиальных клеток лимфатических сосудов, недостаточным изучением факторов, вовлеченных в процесс лимфангиогенеза, а также отсутствием экспериментальной модели, позволяющей дать количественную оценку метастазов в лимфатических узлах. Понимание механизмов опухолевого лимфангиогенеза и лимфатического метастазирования вплоть до молекулярного уровня позволило бы существенно продвинуться в лечении онкологических заболеваний. Автором статьи дан критический анализ научной литературы с точки зрения развития, структуры и функций лимфатических сосудов, а также их роли в онкологической патологии. Современные видения касательно роли факторов лимфангиогенеза, механизма лимфатического метастазирования и потенциальных терапевтических возможностей ингибирования лимфангиогенеза нуждаются в дальнейшем изучении.

Ключевые слова: лимфатические сосуды, лимфангиогенез, иммуногистохимия, рак, антилимфангиогенная терапия.

Introducere

Este cunoscut faptul că diseminarea tumorală reprezintă un proces complex, care se produce prin câteva mecanisme generale: invazie tisulară locală, invazie cavităților/suprafețelor, diseminare hematogenă și limfatică. Datele științifice actuale despre metastazarea pe cale limfatică, mai ales în fazele ei inițiale, sunt cel puțin lacunare. Pe parcursul ultimului deceniu, savanții preocupați de studiul vaselor limfatice și-au propus să răspundă la un șir de întrebări cum ar fi: Care sunt criteriile de diferențiere a capilarului limfatic de capilarul sangvin sau de un vas de neoformație imatur? Care sunt markerii specifici pentru vasele limfatice? Care sunt fazele limfangiogenezei tumorale? Care sunt relațiile dintre celulele tumorale și vasele limfatice în procesul de diseminare metastazică? O parte dintre aceste întrebări au fost acoperite cu răspunsuri incomplete, însă suntem deocamdată departe de înțelegerea bazelor fundamentale ale limfangiogenezei, și, cu atât mai mult, de aplicarea cunoștințelor existente cu scop terapeutic în patologia umană.

Studiile lui Folkman J. din ultimele patru decenii au polarizat atenția cercetătorilor asupra vaselor sangvine. Printr-o serie de experimente elegante (majoritatea confirmate pe material uman), Folkman J. a demonstrat caracterul angiogen-dependent al proliferării și al diseminării tumorilor maligne. Altfel spus, fără cooptarea vaselor sangvine și angiogenează (formarea de noi vase sangvine din vase preexistente) proliferarea tumorală este imposibilă. În pofida celor menționate, nu putem ignora binecunoscuta observație clinică: multe cancere metastazează preponderent pe calea vaselor limfatice. În acest articol încercăm să facem o trecere în revistă a datelor recente despre limfangiogeneza normală, precum și a semnificației acestui proces în patologia oncologică.

Structura, funcția și dezvoltarea sistemului limfatic

Sistemul limfatic completează funcțiile vaselor sangvine, prin reglarea echilibrului fluidelor tisulare, facilitarea transportului proteinelor interstițiale, absorbția lipidelor din tubul digestiv și implicarea în realizarea unor funcții imunologice. Lichidul și macromoleculele interstițiale sunt colectate de capilarele limfatice care încep cec (orb) în țesutul conjunctiv fibros lax sub formă de saci cu pereți ușor permeabili. Permeabilitatea capilarelor se datorează unui tip special de joncțiuni, caracterizate prin suprapuneri citoplasmice, cât și filamentelor de ancorare dintre celulele endoteliale și fibrele de collagen ale matricei extracelulare, care asigură crearea fisurilor intercelulare

temporale. Absența membranei bazale continue facilitează pătrunderea lichidului în aceste vase și restabilirea volumului interstițial normal, ceea ce duce la relaxarea filamentelor de ancorare și la reîntoarcerea celulelor endoteliale limfatice în poziția de repaus, fenomen care previne fluxul retrograd. Studiile efectuate de Weber E. și colab. [1] sugerează existența încă a unui mecanism de drenare: matricea extracelulară prin intermediul citokinelor poate stimula restructurarea citoscheletului celulelor endoteliale, pentru mărirea influxului de lichid interstițial.

Capilarele limfatice drenează limfa în vasele limfatice precolectoare. În unele segmente ale pereților acestora pot fi identificate celulele musculare netede, membrana bazală continuă pentru celulele endoteliale, ocazional valvulele. Aceste segmente alternează cu alte segmente morfologic asemănătoare cu capilarele limfatice. Limfaticele precolectoare, la rândul său, se varsă în limfaticele colectoare. Aceste vase au un perete format din trei tunici: intima, media și adventiția. Tunica internă formează un aparat valvular, iar în tunica medie se conțin celule musculare netede dispuse circumferențial. De menționat, că toate vasele limfatice susnumite sunt lipsite de pericite. Circulația limfei prin vasele limfatice este asigurată de contracția celulelor musculare netede, pulsația arterelor adiacente, cât și de contracția musculaturii scheletale. Limfaticele colectoare sunt drenate în trunchiurile limfatice și apoi în ductul toracic, limfa fiind trecută printr-o serie de ganglioni limfatici sau formațiuni limfoepiteliale. Prin transportul limfocitelor în ganglionii limfatici și apoi în circulația sistemică, vasele limfatice dețin un rol esențial în inițierea răspunsului imun.

Dezvoltarea embrionară a vaselor limfatice a fost studiată extensiv la începutul secolului XX, dar datele s-au acumulat lent datorită absenței markerilor specifici. Histogeneza vaselor limfatice a fost un permanent subiect de controversă. În acest sens sunt vehiculate două teorii: apariția vaselor limfatice din mezenchim, trecând prin stadiul de limfangioblaste; și apariția vaselor limfatice prin înmugurire din vasele venoase preexistente. Majoritatea autorilor susțin teoria înmuguririi, invocând dezvoltarea tardivă a vaselor limfatice în comparație cu cele sangvine. Astfel, sacii limfatici pot fi identificați pentru prima dată la conceptul uman de 6-7 săptămâni, adică peste patru săptămâni după apariția primelor vase sangvine. Acești saci au pereții formați din celule endoteliale și sunt localizați adiacent venelor. Cu excepția *cisterna chyli*, sacii limfatici se transformă în ganglioni limfatici primari.

Populația de celule endoteliale este, cel puțin parțial, eterogenă. Celulele endoteliale ale vaselor limfatice sunt diferite de cele din vasele sangvine, formând o linie stabilă, specializată, fără interconversii fenotipice. Modelul stadial al dezvoltării celulelor endoteliale limfatice se bazează pe expresia secvențială a markerilor limfatici și cuprinde 4 stadii:

1) Celule endoteliale limfatice competente. Competența este capacitatea celulelor de a răspunde la un semnal inițial inductor. Prezența sistemului vascular sangvin nu este suficientă pentru a iniția limfangiogeneza; în celulele precursorare trebuie să se exprime adițional câteva gene care să inducă fenomenul de competență.

2) Celule endoteliale limfatice orientate. În timpul orientării, celulele obțin abilitatea de a da naștere unui tip celular particular; la câteva ore de la expresia LYVE-1 se observă expresia Prox-1, restricționată la o subpopulație de celule endoteliale de pe una dintre marginile venei. În aceste condiții, celulele endoteliale venoase pot fi considerate sursa celulelor endoteliale limfatice progenitoare.

3) Celule endoteliale limfatice specificate. Specificația este stadiul în care celulele se diferențiază în fenotipul dorit. Prin urmare, specificația este prima etapă spre diferențierea finală a vaselor limfatice. În acest stadiu se exprimă mai mulți markeri ai endoteliului limfatic și se reduce semnificativ expresia markerilor endoteliului sangvin (CD34, laminina). Un semn care caracterizează faza de specificație este înmugurirea celulelor endoteliale limfatice imature de la nivel venos, aspect care se accentuează odată cu înaintarea în vârstă a embrionului.

4) Diferențiere și maturare. Diferențierea finală este rezultatul inductiv al structurilor din jur, în timpul căreia vasele limfatice se răspândesc de la sacii limfatici și celulele endoteliale limfatice se află în faza finală de diferențiere. Odată cu diferențierea și cu progresia limfangiogenezei se exprimă și markerii specifici pentru endoteliul limfatic. Profilul complet al acestor markeri se identifică numai înainte de naștere.

În literatura de specialitate sunt date care nu susțin originea unică a celulelor endoteliale limfatice [2]. Prin urmare este posibil ca, în embriogeneza sistemului limfatic, să fie implicate ambele procese, atât înmugurirea din venele preexistente, cu dezvoltarea sistemului limfatic periferic și separarea ulterioară de sistemul venos, cât și diferențierea limfangioblastului din celulele mezenchimale.

Markerii vaselor limfatice

Discriminarea capilarelor limfatice de cele sangvine în microscopia optică este foarte dificilă și se bazează pe lumenul festonat, neregulat, absența eritrocitelor în lumen, și a pericitelor în peretele vasului limfatic. Este practic imposibilă identificarea vaselor limfatice în cazul tumorilor maligne, care își constituie propria rețea vasculară atât sangvină, cât și limfatică. Majoritatea markerilor imunohistochimici utilizați pentru identificarea endoteliului vaselor sangvine sunt pozitivi și pentru endoteliul limfatic. Prin urmare devine evidentă supraestimarea numărului de vase sangvine în studiile care și-au propus aprecierea microdensității vasculare din tumorile maligne prin includerea în numărare și a vaselor limfatice.

Aceasta explică parțial divergențele de date oglindite în studiile axate pe microdensitatea vasculară în tumorile maligne. Singura investigație capabilă să ofere un anumit grad de certitudine în acest caz este imunohistochimia prin utilizarea markerilor specifici pentru aceste două sisteme vasculare. Cerințele față de un marker ideal de vas limfatic sunt mari. Astfel, acesta trebuie să fie exprimat doar de celulele endoteliale limfatice (specificitate), să fie exprimat în toate vasele limfatice (greu de obținut prin prisma heterogenității marcante al celulelor endoteliale limfatice) și să-și păstreze expresia în stările patologice. Niciunul dintre markerii utilizați în prezent nu acoperă ideal toate aceste calități. Totuși apariția markerilor specifici, cum ar fi VEGFR-3, LYVE-1, Prox-1, podoplanina și D2-40, a adus contribuții valoroase în domeniul morfologiei și al distribuției vaselor limfatice, facilitând cuantificarea lor pe secțiunile histologice.

Unul dintre primii markeri identificați a fost VEGFR-3 (*vascular endothelial growth factor receptor 3*), care în țesuturile adultului este restricționat la nivelul endoteliului vaselor limfatice. Acest marker este exprimat la embrionii de șoarece (celulele endoteliale limfatice), embrionii de păsări (celulele notocordului) și la embrionii umani (celulele endoteliale limfatice, cu unele excepții). Pe de altă parte, VEGFR-3 este exprimat de unele capilare sangvine tumorale și în țesutul de granulație din timpul vindecării plăgilor, astfel acest marker nu are o specificitate absolută pentru endoteliul limfatic. Din aceste considerente este utilizat, în special, în imunofenotipizarea limfaticelor dermei normale și în studiile vaselor limfatice în cultură.

LYVE-1 (*lymphatic vessel-1*), un alt marker al endoteliului limfatic, a fost descoperit drept o variantă a CD44 (receptorul celular pentru hialuronan), exprimat de celulele endoteliale limfatice. Markerul nu are o specificitate absolută pentru celulele endoteliale ale vaselor limfatice, fiind exprimat de capilarele sinusoide ale ficatului și ale splinei, celulele Kupffer, capilarele pulmonare, celulele pancreatice exocrine și de celulele zonei reticulate din corticosuprarenală. Un tip mai performant de anticorp policlonal anti-LYVE-1 a fost propus de Akishima și colab. [3]. Acești anticorpi au o sensibilitate mai mare (identifică vasele limfatice mici din intestin, plămân, cord, rinichi, dermă, tiroidă, pancreas, stroma prostatică, ovariană și testiculară), fără a reacționa cu celulele corticosuprarenale și ale pancreasului exocrin, însă păstrând reactivitatea pentru sinusoidale hepatice și splenice. Dar atenție, expresia sa pare să fie blocată de celulele tumorale mamare, ceea ce poate explica raportările divergente cu privire la limfangiogeneza în cancerul mamar. Cu toate aceste inconveniente, LYVE-1 este markerul cel mai frecvent utilizat la ora actuală pentru identificarea calitativă și cea cantitativă a vaselor limfatice, probabil și din cauza că nu se exprimă de celulele endoteliale ale vaselor sangvine CD34 pozitive.

Podoplanina este o mucoproteină membranară integrală, descoperită în premieră în podocitele renale, de unde vine și denumirea. Acest marker este specific pentru vasele limfatice și nu este exprimat de endoteliul vaselor sangvine. În afară de podocite, podoplanina mai este exprimată și de osteoblaste, alveolocitele de tip I, celulele

mezoteliale, celulele reticulare, celulele mioepiteliale și de celulele foliculare dendritice. Funcția podoplaninei în celulele endoteliale limfatice nu este cunoscută. Markerul este exprimat de celulele endoteliale ale limfaticelor mici, inclusiv în vasele limfatice la o serie de tumori, unde este coexprimat cu CD31 și CD34 și este asociat cu VEGFR3. Vasele limfatice mari, cu celule musculare în perete, au endoteliul negativ pentru podoplanină. Utilitatea podoplaninei devine evidentă, în special, în cazurile cu celule endoteliale limfatice, la care expresia LYVE-1 este negativă.

Prox-1 (*Prospero homeobox gene-1*) este un marker cu o expresie predominant nucleară, dar poate fi exprimat și de citoplasmă. La adult este mai frecvent exprimat în ficat și în inimă. Markerul își păstrează specificitatea pentru celulele endoteliale din limfaticele tumorale, dar din cauza expresiei predominant nucleare, greu de detectat, nu este utilizat pe scară largă. În pofida celor menționate, este singurul marker de limfangiogenează, care nu necesită efectuarea altor markeri de proliferare celulară.

D2-40 nu este un marker al celulelor endoteliale limfatice, ci este un anticorp monoclonal care se leagă de o sialoglicoproteină de pe suprafața acestor celule. Are o specificitate înaltă față de endoteliul vaselor limfatice și nu este exprimat de celulele endoteliale ale vaselor sangvine. Este util pentru identificarea invaziei tumorii primare prin vasele limfatice. Un dezavantaj al acestui anticorp este că poate fi exprimat de o varietate mare de celule normale și tumorale.

Bazele moleculare ale limfangiogenezei

În anul 1989 Ferrara N. și Henzel W. J. [4] comunică purificarea unui mitogen specific pentru celulele endoteliale, care a fost numit VEGF (factor de creștere vascular endotelial). Ulterior, au fost identificate cinci gene care codifică VEGF: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D și VEGF-E. A fost demonstrat experimental că din această familie cel puțin doi factori – VEGF-C și VEGF-D au abilitatea de a induce limfangiogeneza. Efectul VEGF se produce prin legarea de receptori specifici: VEGFR-1, VEGFR-2 și VEGFR-3. VEGFR-1 leagă VEGF-A și VEGF-B; VEGFR-2 leagă VEGF-A, VEGF-C și VEGF-D; iar VEGFR-3 leagă doar VEGF-C și VEGF-D. Există dovezi ponderabile experimentale că cei doi liganzi ai VEGFR-3, VEGF-C și VEGF-D au o acțiune limfangiogenică. Unele date [5] însă mărturisesc faptul că VEGF-D nu este indispensabil pentru inducția angiogenezei și că VEGF-C sau un alt factor neidentificat ar putea înlocui funcția VEGF-D.

Se pare că VEGF-A este implicat în limfangiogeneza embrionară. Acest factor provoacă înmugurirea vaselor limfatice din sacii limfatici primitivi, probabil, prin intermediul VEGFR-2. Călea de semnal comună prin VEGFR-2 a VEGF-A și VEGF-C, ultimul fiind agent limfangiogenetic demonstrat, este un alt argument pentru implicarea VEGF-A în limfangiogeneza embrionară. Este necesar de menționat că, în afară de factorii nominalizați, în procesul de limfangiogenează sunt implicați și alți factori de creștere, reprezentanți ai diferitor familii, cum ar fi PDGF (factorul derivat din plachete sangvine), FGF-2 (factorul de creștere fibroblastic-2), angiopoietina-2, neuropilina-2 și Prox-1.

Regenerarea vaselor limfatice

În literatura de specialitate există puține surse referitoare la regenerarea vaselor limfatice. Acest proces presupune creșterea și reconectarea limfaticelor noi la vasele limfatice funcționale. Unul dintre experimentele care aduc argumente în favoarea regenerării vaselor limfatice a fost publicat de Shimoda și colab. [6], care au secționat tunica musculară a intestinului subțire la șobolani și au urmărit procesul de regenerare a vaselor prin activitatea 5-nucleotidazei, expresia VEGF-C și a VEGFR-3 prin microscopia optică și electronică. După o săptămână de la intervenția chirurgicală, s-a observat proliferarea vaselor sangvine, dar nu și limfaticelor la nivelul mioectomiei. Limfaticele preexistente restante aveau aspect de involuție, fiind de dimensiuni mici, cu lumenul obturat de celule endoteliale. După două săptămâni s-a constatat apariția unor vase limfatice mici care formau arcade anastomozante, delimitate de celule endoteliale alungite. Acestea, ulterior, dădeau naștere la vase limfatice mai mari, cu segmente dilatate varicos. După 6 săptămâni s-a dezvoltat o rețea neregulată de vase limfatice, interpătrunsă de celule musculare netede și miofibroblaste. Porțiunile terminale ale vaselor limfatice de regenerare au prezentat dilatări atât în direcția seroasei, cât și a submucoasei. Dezvoltarea noilor vase limfatice a fost corelată cu expresia VEGF-C în celulele stromale din vecinătate, iar VEGFR-3 a fost imunolocalizat în endoteliul vaselor 5-nucleotidază pozitive. Acest experiment demonstrează că regenerarea vaselor limfatice intestinale este posibilă și susține originea noilor vase din cele preexistente, prin înmugurire, după modelul limfangiogenezei normale.

În țesutul de granulație, din plăgile cutanate profunde, formarea vaselor sangvine predomină limfangiogeneza. Vasele limfatice sunt concentrate, în special, la periferia țesutului de granulație, bogat în vase sangvine. În câteva modele experimentale raportate s-a constatat că angiogeneza precede limfangiogeneza, așa cum se întâmplă în cazul dezvoltării sistemului circulator embrionar. În timpul procesului de reparare tisulară vasele limfatice nou formate se conectează cu cele preexistente, nu și cu vasele sangvine. Rămâne să se demonstreze dacă limfangiogeneza din timpul reparării tisulare implică incorporarea unor progenitori sau apare prin înmugurire din vene preexistente, repetând etapele din timpul embriogenezei.

Limfangiogeneza tumorală

În multe tumori maligne, sistemul limfatic reprezintă principala cale de diseminarea metastatică a celulelor tumorale în ganglionii limfatici și, posibil, prin ductul toracic, pe cale sangvină, în diferite organe. În prezent, nu este deocamdată precizat faptul dacă celulele tumorale invadează vasele limfatice periferice preexistente sau vasele de neoformație, apărute în rezultatul limfangiogenezei tumorale [7].

Statutul ganglionilor limfatici este un factor de prognostic bine cunoscut în majoritatea tumorilor la om și are o importanță majoră în stabilirea strategiei terapeutice. În pofida importanței acestui element, larg acceptat și recunoscut, rolul limfangiogenezei este mult mai puțin studiat. Acest lucru poate fi explicat prin introducerea târzie în practică a

markerilor specifici pentru endoteliul limfatic, cunoașterea deocamdată lacunară a factorilor implicați în limfangiogeneza, cât și prin absența unui model experimental care să permită evaluarea cantitativă a metastazelor în ganglionii limfatici.

Există două căi de influență paracrină a factorilor de proliferare și de supraviețuire între celulele tumorale și endoteliocitele din vecinătate: celulele tumorale stimulează angiogeneza activând celulele endoteliale; celulele endoteliale activate pot produce cel puțin 20 de mitogeni și factori antiapoptotici pentru celulele tumorale. În tumorile umane solide celulele maligne din frontul de invazie pot avea anumite proprietăți biologice deosebite de cele din ariile centrale ale tumorii, având un rol-cheie în progresia tumorală [8]. Din această perspectivă au fost efectuate mai multe studii experimentale, care au dovedit implicarea celulelor tumorale în procesul de neoformare a vaselor limfatice, atât peritumorale, cât și intratumorale. În multe studii a fost raportată corelația semnificativă între nivelurile de VEGF-C, invazia vaselor limfatice și metastazele din ganglionii limfatici. Unele studii [9] indică că supraexpresia de VEGF-C/-D în asocieri cu formarea vaselor limfatice *de novo* (limfangiogeneza) sunt necesare, dar nu și suficiente pentru diseminarea metastatică a celulelor tumorale în ganglionii limfatici. Pe lângă acești factori, pentru invazia metastatică sunt necesare și alte citokine/chemochine, cum ar fi factorul de creștere a hepatocitelor, factorul BB de creștere a trombocitelor, chemochina CCL21.

Apariția markerilor specifici pentru celulele endoteliale a permis identificarea și cuantificarea limfaticelor tumorale care, anterior, rămăneau neobservate. Până în prezent investigațiile imunohistochemice, cu utilizarea markerilor specifici pentru endoteliu limfatic, au demonstrat prezența limfaticelor intratumorale în câteva varietăți de tumori umane, semnificația funcțională a acestor vase rămânând deocamdată controversată. Vasele intratumorale au frecvent arhitectură reticulară, cu lumene înguste și slab definite. Morfologic aceste limfatice sunt diferite atât de vasele peritumorale, cât și de cele din țesutul normal. Este evident că vasele limfatice intratumorale de neoformație, cu pereții subțiri și cu joncțiuni intercelulare simple, pot servi drept căi optime pentru migrarea celulelor tumorale, în pofida faptului că rețeaua limfatică de neoformație este mai puțin ramificată comparativ cu rețeaua matură. Dar aceste limfatice nu au suportul structurilor adiacente, de aceea sunt influențate ușor de presiunea fluidului interstițial. În general, este acceptat că presiunea interstițială înaltă, generată de proliferarea rapidă a celulelor tumorale previne diseminarea acestora în limfaticele de neoformație. În pofida celor menționate, într-o serie întregă de studii densitatea limfaticelor intratumorale a fost raportată drept un factor predictiv independent al prognosticului nefavorabil, cât și în incidența apariției metastazelor în așa tumori cum ar fi melanomul malign, carcinoamele mamar, endometrial, de colon, pulmonar, prostatic, ovarian, pancreatic, de cap și de gât.

Majoritatea datelor care susțin existența limfangiogenezei intratumorale provin din rezultatele obținute experimental pe șoareci [10]. Celulele endoteliale ale vaselor limfatice intratumorale LYVE-1 pozitive au un potențial proliferativ,

demonstrat prin imunoreacția pentru proteina nucleară Ki67; nu au fost observate celulele endoteliale pozitive pentru acest marker la vasele LYVE-1 pozitive din aria tumorală. Aceasta demonstrează că limfaticele intratumorale sunt vase de neoformație și nu preexistente, incluse în proliferarea tumorală [10].

Relația potențială între vasele limfatice intratumorale și metastazele din ganglionii limfatici poate fi studiată pe secțiuni din tumoarea primară prin utilizarea dublei imunocolorări pentru LYVE-1 și citokeratina MNF116. Grupuri de celule maligne au fost identificate în vasele largi peritumorale, LYVE-1 pozitive și sunt absente în cele mici intratumorale. Prezența densității mari de vase limfatice nu corelează obligatoriu cu metastazele din ganglionii limfatici (așa cum s-a observat în carcinoamele bucale și ale laringelui).

Într-un număr mult mai mare de tumori au fost raportate vase limfatice peritumorale (limfaticele din imediata apropiere a tumorii) care, de regulă, au un lumen larg, cu celule endoteliale proliferante și care frecvent conțin celule tumorale în lumen. Se sugerează ca aceste vase reprezintă limfaticele preexistente compresate într-un cadru peritumoral de expansiunea masei tumorale [11]. Pe de altă parte, a fost raportată proliferarea celulelor endoteliale limfatice din aceste vase în unele tumori, ceea ce confirmă limfangiogeneza vaselor limfatice peritumorale. Adicional, limfangiogeneza tumorală este asociată cu metastazarea regională și cu prognosticul nefavorabil în melanomul malign, iar identificarea factorilor limfangiogenici are o semnificație de prognostic în carcinomul de cervix uterin, ovar, mamar și gastrointestinal.

Prezența vaselor limfatice peritumorale reprezintă o modalitate facilă de diseminare a celulelor maligne. Din acest motiv, unii autori consideră că vasele limfatice preexistente sunt suficiente pentru metastazare. Diseminarea tumorală pe cale limfatică ar fi, astfel, facilitată de densitatea intrinsecă a vaselor limfatice în organele în care se dezvoltă tumoarea. Chiar dacă unele studii au arătat că densitatea crescută a limfaticelor se corelează cu fenotipul tumoral și cu un potențial mai mare de metastazare, sunt necesare cercetări care ar preciza semnificația prognostică a limfaticelor peritumorale.

În pofida faptului că importanța limfaticelor intratumorale versus limfatice peritumorale pentru invazia metastatică mai rămâne un subiect de dezbatere, este cert că limfaticele asociate tumorii au un rol important în metastazarea ei [12]. Viitoarele studii experimentale și clinicopatologice, axate pe limfangiogeneza, vor permite înțelegerea controlului molecular al acestui proces și vor permite identificarea obiectivelor terapeutice noi în vederea restricției proliferării tumorale.

Expresia VEGF-C a fost demonstrată în tumorile maligne de sân, colon, plămân, tiroidă, stomac, în carcinoamele scuamocelulare, sarcoame și în melanoame. În tumorile care supraexprimă VEGF-C se constată prezența a numeroase vase limfatice mici în zona centrală și largi în aria peritumorală. Sunt date, care mărturisesc despre acțiunea dilatatoare a VEGF-C asupra vaselor limfatice peritumorale, ceea ce ar facilita transportul celulelor tumorale [13]. Din aceste considerente, unii autori [12] admit posibilitatea că *in vivo* VEGF-C/-D prin mecanisme paracrine pot contribui la apariția metasta-

zelor în ganglionii limfatici, fără a induce limfangiogeneza. Analiza secțiunilor groase a relevat că limfaticele intratumorale formează canale care se conectează cu vasele limfatice de la periferie. De asemenea, pe secțiuni colorate cu LYVE-1 s-a constatat o creștere de 4,6 ori a densității vaselor limfatice la tumorile care supraexprimă VEGF-C. În anumite arii tumorale, densitatea vaselor limfatice era atât de mare, încât ajungea la valori similare cu cea a vaselor sangvine.

Diseminarea precoce pentru multe carcinoame se produce pe calea vaselor limfatice, dar mecanismele intime prin care celulele maligne invadează sistemul limfatic nu sunt cunoscute [14]. Lucrurile se complică și din cauza că progresia tumorală poate cauza distrugerea vaselor limfatice cu reducerea semnificativă atât a numărului limfaticelor intratumorale, cât și a celor peritumorale. Mai mult, în rezultatul progresiei tumorale aceste două tipuri de vase pot deveni indiscernibile [8].

Tradițional, până la introducerea tehnicii imunohistochemice pe scară largă, se considera că sistemul limfatic nu este implicat activ în metastazare, deși adenopatia tumorală era un criteriu de prognostic fundamental. Se credea că celulele maligne trec pasiv în vasele limfatice, împreună cu lichidul interstițial, iar limfangiogeneza nu este o componentă a tumorigenezei. Studiile recente, bazate pe utilizarea markerilor celulei endoteliale limfatice au demonstrat existența vaselor limfatice largi și a limfangiogenezei active în aria peritumorală.

Sistemul limfatic reprezintă o cale aproape ideală pentru metastazare din mai multe motive: vasele limfatice inițiale au un lumen larg, nu au membrană bazală continuă, viteza fluxului este redusă și componența chimică a limfei este similară cu cea a lichidului interstițial, care menține viabilitatea celulelor maligne. Deși nu există în prezent dovezi convingătoare, accesul celulelor maligne în sistemul limfatic pare logic datorită structurii semnificativ mai simple a capilarelor limfatice. Metastazarea pe cale hematogenă are o eficiență redusă, un număr însemnat de celule maligne din sângele circulant fiind dormante sau apoptotice. Eficiența metastazării este mai mare pe cale limfatică, în acest mediu asigurându-se viabilitatea celulelor maligne diseminate. Există opinii, conform cărora invazia limfatică are loc pasiv prin faptul că celulele tumorale din frontul de invazie erodează pereții limfaticelor și pătrund în ganglionii limfatici prin drenare pasivă [14]. Alți autori însă invocă interacțiuni mult mai complexe între celulele tumorale și endoteliul limfatic [15].

Aproape toate investigațiile asupra mecanismelor metastazării s-au concentrat asupra comportamentului celulelor maligne în sângele circulant (intravazare, supraviețuire, extravazare). În acest aspect se impune înțelegerea interacțiunii între celulele maligne și vasele limfatice, precum și punerea la punct a unui model de metastazare pe cale limfatică, similar cu cel propus pentru metastazele hematogene.

În prezent cunoaștem foarte puțin despre comportamentul celulelor tumorale care au ajuns în circulația limfatică. Studiile care se bazează pe tehnici de injectare a vaselor limfatice nu au reușit să demonstreze o rețea funcțională în tumori. În țesuturile normale fibrele țesutului conjunctiv sunt aranjate ideal pentru a dirija fluidul în vasele limfatice. În tumori,

stroma este frecvent modificată și, posibil, nu direcționează fluxul spre vasele limfatice în manieră organizată.

VEGF-C este principalul candidat responsabil de metastazele în ganglionii limfatici, deoarece se corelează cu acestea în cancerele tiroidian, esofagian, prostatic, gastric, pulmonar, endometrial etc. Supraexpresia VEGF-C are drept rezultat creșterea semnificativă a numărului de metastaze, aspect demonstrat pe model de *AngioMouse* cu proteină fluorescentă verde [16]. Examinarea histologică a preparatelor efectuate de la acest model a relevat că incidența metastazelor identificate prin fluorescență crește cu 60%, în comparație cu tumori care nu supraexprimă VEGF-C.

Expresia de VEGF-C în linia celulară umană de cancer mamar MCF-7 demonstrează sporirea ratei de metastazare în ganglionii limfatici în prezența creșterii densității limfaticelor intratumorale și, în particular, a celor peritumorale. Mai mult, anticorpii solubili anti-VEGFR-3 au inhibat limfangiogeneza și metastazarea ulterioară. Fenomenul similar de sporire a densității limfaticelor intra- și peritumorale a fost observat și în modelul alternativ de linie celulară umană de cancer mamar MBA-MD-435, care expresa VEGF-C [16], or creșterea densității acestor vase a sporit numărul metastazelor în ganglionii limfatici și metastazele pulmonare viscerale [16].

Mai mulți autori au relatat prezența metastazelor în carcinomul mamar în absența limfangiogenezei tumorale. După ultimele date [12], supraexpresia de VEGFR-3 în angiogeneza tumorală, menține populația celulelor endoteliale predominant în stare embriologică primitivă, decât în stare de diferențiere, proprie vaselor mature. În speciemenle umane cu cancer mamar limfaticele intratumorale sunt frecvent colabate și se identifică prost cu markerii de proliferare. În contrast, în ariile peritumorale limfaticele au o densitate sporită și frecvent conțin embolii tumorale [12]. Acest fapt demonstrează posibilitățile tehnice limitate a utilizării unui singur marker, cum ar fi LYVE-1, care poate eșua în identificarea relevantă a vaselor, în particular a subtipurilor de limfatice.

Implicațiile terapeutice ale limfangiogenezei

Terapia pro- și antiangiogenică nu mai este considerată o noutate și se aplică cu succes într-o mare varietate de afecțiuni umane. Nu aceleași afirmații pot fi făcute și despre limfangiogenază. Caracterizarea relativ recentă a unora dintre etapele limfangiogenezei, bazată pe existența markerilor specifici pentru endoteliul limfatic, a permis formularea unor ipoteze terapeutice mult mai rapid decât în cazul angiogenezei. Spre deosebire de angiogenază, spectrul de aplicabilitate a eventualei terapii limfangiogenice este întrucâtva restrâns și în prezent se referă doar la limfostază și la diseminarea celulelor maligne pe cale limfatică. Majoritatea argumentelor care pledează în favoarea introducerii terapii limfangiogenice provin din studii experimentale.

Limfedemul este definit ca acumulare progresivă a fluidului bogat în proteine în spațiile interstițiale, ca rezultat al obstrucției anatomice sau funcționale a sistemului limfatic. Limfedemul primar este rar, dar cel secundar este raportat la un mare număr de cazuri (după chirurgia radicală și după radioterapie, efectuate pentru tumori maligne sau în boli

infecțioase, așa cum este filarioza). În prezent, opțiunile terapeutice în tratamentul limfedemului sunt limitate și doar restaurarea vaselor limfatice poate fi considerată optimă [17]. La animale, formarea de noi vase limfatice (limfangiogeneza) este rapidă. Cel mai bun exemplu în acest sens îl reprezintă reimplantările de membre, drenajul limfatic fiziologic instalându-se după restaurarea completă a vaselor limfatice.

Suportul molecular al cercetărilor provine tot din observații experimentale. Supraexpresia VEGF-C în pielea șoarecelui transgenic induce proliferarea celulelor endoteliale limfatice și hiperplazie de vase limfatice dermice. În plus, administrarea de VEGF-C recombinant stimulează specific limfangiogeneza în membrana corioalantoidă. De asemenea, injecția subcutanată a unui adenovirus care codifică VEGF-C poate genera vase limfatice dermice la șoarecele normal și la șoarecele *chy* (cu limfedem primar). Hiperplazia limfatică a fost demonstrată cu markeri limfatici (LYVE-1, VEGFR-3) și prin rată crescută de proliferare în celulele endoteliale obținută la imunoreacția cu Ki67 [17]. Deși aceste studii au arătat că VEGF-C poate induce limfangiogeneza *in vivo*, încă nu a fost demonstrat că limfangiogeneza combate disfuncția vasculară limfatică și previne modificările cronice. Doar aceste dovezi ar putea susține utilizarea VEGF-C drept remediu terapeutic la bolnavii cu limfedem.

Pentru rezolvarea parțială a acestei probleme, Shin W. S. și colab. [18] au pus la punct un model experimental ingenios de limfedem cronic la nivelul urechii de iepure. Prin injectarea VEGF-C uman recombinant, s-a demonstrat ameliorarea funcției limfatice și, în plus, s-a determinat restabilirea arhitecturii tisulare normale. Autorii au făcut concluzia, de altfel susținută de datele statistice, că administrarea VEGF-C în limfedemul postchirurgical are efect marcant limfangiogenic. Fără a avea încă certitudinea eficienței terapiei genice cu VEGF-C/D în limfedemul uman, soluția este promițătoare.

Datele referitoare la potențiala aplicare a terapiei antilimfangiogenice în tumorile maligne sunt puține, iar rezultatele obținute până în prezent sunt în mare parte controversate. Opțiunile terapeutice în vederea inhibiției VEGFR-3 includ utilizarea anticorpilor monoclonali, a inhibitorilor micromoleculari, a peptidelor și a tehnicilor antisens. Viziunea lui Folkman despre antiangiogeneza, ca opțiune de tratament în cancer, a fost cu succes realizată în terapia anti-VEGF a carcinomului colonorectal metastatic.

Rezultate notabile au obținut He și colab. [19], care au studiat efectul blocării VEGFR-3 (cu VEGFR-3-Ig) în evoluția tumorilor, induse cu linii de celule maligne pulmonare umane cu potențial metastatic crescut și redus. La animalele din lotul de control au fost observate numeroase vase limfatice LYVE-1 pozitive la periferia tumorii, care conțineau celule maligne. La animalele tratate adițional cu VEGFR-3-Ig, vasele limfatice peritumorale au fost rare, iar incidența metastazelor în ganglionii limfatici a fost semnificativ mai mică. De remarcat faptul că s-a reușit inhibarea parțială a metastazării în ganglionii limfatici, dar nu s-a modificat incidența metastazelor pulmonare. Pe baza acestor rezultate, se poate afirma că inhibarea VEGFR-3 ar putea suprima parțial limfangiogeneza tumorală și metastazarea pe cale limfatică, dar cu cea mai

mare probabilitate, această metodă nu este suficientă pentru supresie totală.

Inhibitorii VEGFR-3 ar putea fi utili în terapia anticanceroasă și prin mecanisme diferite de limfangiogeneza. De exemplu, sarcomul Kaposi este caracterizat prin prezența unor celule fusiforme în zona centrală, care ar putea deriva din endoteliul limfatic. VEGF-C induce proliferarea semnificativă a acestor celule *in vitro* și ar putea avea un rol crucial în creșterea, migrarea și în diseminarea lor [19]. În aceste condiții, inhibarea VEGFR-3 ar putea fi utilă pentru a suprima progresia sarcomului Kaposi, acționând direct asupra celulelor maligne.

Inactivarea potențială a VEGFR-3 implică anticorpi de blocare a VEGF-C/D. Anticopii monoclonali anti-VEGF-D, în model experimental, au inhibat angiogeneza, limfangiogeneza și diseminarea metastatică pe cale limfatică [11]. Nu au fost raportate până în prezent studii similare bazate pe anticorpi anti-VEGF-C.

După cum am menționat, factorii esențiali în limfangiogeneza sunt VEGF-C și VEGF-D. Acești factori provin din propeptide – predecesori și, pentru a fi activați, trebuie să fie clivați de enzimele responsabile cum ar fi proproteinele convertazele, proteazele serice, plasmina. Astfel inhibitorii proproteineconvertazelor și ai plasminei care restricționează clivajul VEGF-C și VEGF-D ar putea fi eventualii candidați pentru terapia antitumorală sau/și în terapia adjuvantă în scopul prevenirii proliferării tumorale, a metastazării sau a recurențelor. Există opinii, conform cărora blocada cascadei de semnalizare intracelulară, utilizată în inhibiția angiogenezei tumorale, ar putea fi utilă și în inhibarea semnalizării VEGFR-3.

Unele relații de tipul receptor-ligand între celulele tumorale și țesuturile gazdă, precum și factori solubili, cunoscuți sub denumirea de chemochine (reglează migrarea celulelor hemopoietice), pot contribui la pătrunderea celulelor tumorale în vasele limfatice și la diseminarea lor în ganglionii limfatici. Mai mult, aceste relații pot crea un gradient chimic favorabil pentru popularea la distanță a anumitor organe și țesuturi de către celulele metastatice circulante. Astfel, liniile celulare de melanom uman și de cancer mamar au o afinitate crescută pentru endoteliul limfatic, ceea ce rezultă în apariția metastazelor în ganglionii limfatici la modelele animale, proces care poate fi inhibat prin administrarea de anticorpi anti-CCL21 (anticheochine homeostatice).

Expresia moleculelor de adezivitate, care în mod normal sunt implicate în traficul celulelor imunocompetente dintre compartimentele vascular și interstițial al țesutului, poate fi importantă atât în invazia celulelor tumorale în limfatice, cât și de ieșirea acestora din spațiul limfovacular în timpul metastazării [20]. Bevacqua S. J. și colab. [20] au demonstrat *in vitro* corelația potențial de adezivitate și abilitatea de metastazare la liniile celulare umane de melanom malign și de cancer mamar. O moleculă particulară de adezivitate, L-selectina, orchestrează intravazarea limfocitelor circulante din interstițiul tisular în vasele limfatice, direcționându-le spre ganglionii limfatici. Astfel, celulele tumorale care exprimă L-selectina stimulează metastazarea în ganglionii limfatici

regionali. În studii experimentale a fost dovedit că acest proces poate fi inhibat prin administrarea anticorpilor monoclonali anti-L-selectina [15].

Cu toate cele menționate, este important să ținem cont nu numai de avantajele, ci și de riscurile terapiei antilimfangiogeneze, mai ales la pacienți cu tumori maligne și cu limfedem secundar, la care o astfel de terapie ar putea stimula creșterea tumorală și metastazarea. Această problemă, pe model animal, ar putea fi rezolvată prin realizarea de implanturi tumorale tratate combinat chirurgical, prin iradiere/chimioterapie și prin transfer genic local VEGF-C.

Concluzie

Invazia limfatică a celulelor tumorale în ganglionii limfatici regionali este un fenomen comun pentru multe cancere umane. Descoperirea markerilor specifici pentru celulele endoteliale limfatice cum ar fi LYVE-1, podoplanina, Prox-1, D2-40, VEGFR3 în ultimul deceniu au stimulat esențial studiile axate pe biologia vaselor limfatice, inclusiv limfangiogeneza și implicațiile ei clinice, mai ales în elucidarea mecanismelor dezvoltării, ale progresiei și ale metastazării tumorale. Diseminarea tumorală se pare că depinde atât de limfaticele preexistente, cât și de limfangiogeneza VEGF-C/-D/VEGFR-3 mediată. Înțelegerea complexității dezvoltării, structurii și patofiziologiei sistemului limfatic în termeni de influență a factorilor limfangiogenetici, a receptorilor specifici și a imunomodulării tumorale, poate rezulta în apariția noilor opțiuni terapeutice în tratamentul cancerului.

Bibliografie

1. Weber E., Rossi A., Solito R., Sacchi G., Agliano M., Gerli R. Focal adhesion molecules expression and fibrillin deposition by lymphatic and blood vessel endothelial cells in culture. *Microvasc. Res.*, 2002 Jul; 64(1): 47-55.
2. Wilting J., Tomarev S. I., Christ B., Schweigerer L. Lymphangioblasts in embryonic lymphangiogenesis. *Lymphat. Res. Biol.*, 2003; 1: 33-40.
3. Akishima Y., Ito K., Zhang L., Ishikawa Y., Orikasa H., Kiguchi H., Akasaka Y., Komiyama K., Ishii T. Immunohistochemical detection of human small lymphatic vessels under normal and pathological conditions using the LYVE-1 antibody. *Virchows. Arch.*, 2004 Feb; 444(2): 153-7.
4. Ferrara N., Henzel W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Growth Factors*, 1990; 4(1): 53-9.
5. Baldwin M. E., Halford M. M., Roufail S., Williams R. A., Hibbs M. L., Grail D., Kubo H., Stacker S. A., Achen M. G. Vascular endothelial growth factor D is dispensable for development of the lymphatic system. *Mol. Cell. Biol.*, 2005 Mar; 25(6): 2441-9.
6. Shimoda H., Takahashi Y., Kato S. Regrowth of lymphatic vessels following transection of the muscle coat in the rat small intestine. *Cell. Tissue. Res.*, 2004 Jun; 316(3): 325-38.

7. Celula endotelială și angiogeneza tumorală. Manualul cursului. Sub redacția Raica M., Timișoara, 19 aprilie, 2007.
8. Gombos Z., Xu X., Chu C. S., Zhang P. J., Acs G. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin. Cancer Res.*, 2005 Dec 1; 11(23): 8364-71.
9. Zlotnik A. Chemokines in neoplastic progression. *Semin. Cancer Biol.*, 2004 Jun; 14(3): 181-5.
10. Beasley N. J., Prevo R., Banerji S., Leek R. D., Moore J., van Trappen P., Cox G., Harris A. L., Jackson D. G. Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res.*, 2002 Mar 1; 62(5): 1315-20.
11. Stacker S. A., Achen M. G., Jussila L., Baldwin M. E., Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, 2002 Aug; 2(8): 573-83.
12. Williams C. S., Leek R. D., Robson A. M., Banerji S., Prevo R., Harris A. L., Jackson D. G. Absence of lymphangiogenesis and intratumoural lymph vessels in human metastatic breast cancer. *J. Pathol.*, 2003 Jun; 200(2): 195-206.
13. He Y., Rajantie I., Pajusola K., Jeltsch M., Holopainen T., Yla-Herttuala S., Harding T., Jooss K., Takahashi T., Alitalo K. Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res.*, 2005 Jun 1; 65(11): 4739-46.
14. Pepper M. S. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin. Cancer Res.*, 2001 Mar; 7(3): 462-8.
15. Qian F., Hanahan D., Weissman I. L. L-selectin can facilitate metastasis to lymph nodes in a transgenic mouse model of carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci., U S A.* 2001 Mar 27; 98(7): 3976-81.
16. Skobe M., Hawighorst T., Jackson D. G., Prevo R., Janes L., Velasco P., Riccardi L., Alitalo K., Claffey K., Detmar M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat. Med.*, 2001 Feb; 7(2): 192-8.
17. Yoon Y. S., Murayama T., Gravereaux E., Tkebuchava T., Silver M., Curry C., Wecker A., Kirchmair R., Hu C. S., Kearney M., Ashare A., Jackson D. G., Kubo H., Isner J. M., Losordo D. W. VEGF-C gene therapy augments postnatal lymphangiogenesis and ameliorates secondary lymphedema. *J. Clin. Invest.*, 2003 Mar; 111(5): 717-25.
18. Shin W. S., Szuba A., Rockson S. G. Animal models for the study of lymphatic insufficiency. *Lymphat. Res. Biol.*, 2003; 1(2): 159-69.
19. He Y., Kozaki K., Karpanen T., Koshikawa K., Yla-Herttuala S., Takahashi T., Alitalo K. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2002 Jun 5; 94(11): 785-7.
20. Bevacqua S. J., Welch D. R., Diez de Pinos S. M., Shapiro S. A., Johnston M. G., Witte M. H., Leong S. P., Dorrance T. L., Leibovitz A., Hendrix M. J. Quantitation of human melanoma, carcinoma and sarcoma tumor cell adhesion to lymphatic endothelium. *Lymphology*, 1990 Mar; 23(1): 4-14.

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

Recepționat 26.05.2009