

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
DIN CRAIOVA

TEZA DE DOCTORAT

REZUMAT

*ROLUL ANGIOGENEZEI ÎN INIȚIEREA ȘI PROGRESIA
LEZIUNILOR PREINVAZIVE ȘI INVAZIVE
SCUAMOASE ALE COLULUI UTERIN-
STUDIU HISTOPATOLOGIC ȘI IMUNOHISTOCHIMIC*

Doctorand: STEPAN MIOARA DESDEMONA

**Conducător Științific:
PROF. UNIV. SIMIONESCU CRISTIANA EUGENIA**

CRAIOVA 2013

CUPRINS

INTRODUCERE

STADIUL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL I

ASPECTE EPIDEMIOLOGICE ȘI FACTORI DE RISC IMPLICAȚI ÎN LEZIUNILE PREINVAZIVE ȘI INVAZIVE ALE COLULUI UTERIN	6
I.A. Epidemiologia leziunilor preinvazive și invazive ale colului uterin	6
I.B. Factori de risc în leziunile preinvazive și invazive ale colului uterin	10

CAPITOLUL II

ANGIOGENEZA - MECANISM DE BAZĂ PENTRU CARCINOGENEZĂ	17
---	----

CAPITOLUL III

ROLUL ANGIOGENEZEI ÎN LEZIUNILE PREINVAZIVE ȘI INVAZIVE ALE COLULUI UTERIN	35
MOTIVAȚIA ȘI OBIECTIVELE STUDIULUI	40

CONTRIBUȚII PROPRII

CAPITOLUL IV

MATERIAL ȘI METODE	41
IV.A. Materialul studiat	41
IV.B. Metode utilizate	42

CAPITOLUL V

REZULTATE	49
V.A. STUDIUL EPIDEMIOLOGIC AL LEZIUNILOR PREINVAZIVE ȘI INVAZIVE SCUAMOASE ALE COLULUI UTERIN	49
V.B. STUDIUL HISTOPATOLOGIC AL LEZIUNILOR PREINVAZIVE ȘI INVAZIVE SCUAMOASE ALE COLULUI UTERIN	53
V.C. STUDIUL IMUNOHISTOCHEMIC AL LEZIUNILOR PREINVAZIVE ȘI INVAZIVE SCUAMOASE ALE COLULUI UTERIN	70

CAPITOLUL VI

DISCUȚII	132
VI.A. ANALIZA EPIDEMIOLOGICĂ A LEZIUNILOR PREINVAZIVE ȘI INVAZIVE SCUAMOASE ALE COLULUI UTERIN	132
VI.B. ANALIZA HISTOPATOLOGICĂ A LEZIUNILOR PREINVAZIVE ȘI INVAZIVE SCUAMOASE ALE COLULUI UTERIN	135
VI.C. ANALIZA IMUNOHISTOCHEMICĂ A LEZIUNILOR PREINVAZIVE ȘI INVAZIVE SCUAMOASE ALE COLULUI UTERIN	141

CAPITOLUL VII

CONCLUZII	158
BIBLIOGRAFIE	161

INTRODUCERE

Cancerul cervical este al treilea neoplasm malign ca frecvență, al femeilor din întreaga lume, constituind în jur de 13% din toate cancerurile. În țara noastră cancerul cervical constituie prima cauză de deces a pacientelor cu vârste cuprinse între 25-44 de ani. Frecvența leziunilor preinvazive și invazive de la nivelul exocolului, precum și grupele de vârstă afectate și factorii de risc implicați indică aceste leziuni ca fiind o problemă de sănătate importantă în țara noastră și în întreaga lume.

Procesul de carcinogeneză de la nivelul exocolului constituie un model ideal de investigare, cu un spectru de leziuni care la un capăt prezintă leziunile intraepiteliale scuamose de grad scăzut, urmate de cele de grad înalt, iar la celălalt capăt, leziunile microinvazive, franc invazive și metastazante. În afara implementării programelor preventive de screening pentru depistarea precoce a carcinoamelor și a leziunilor preinvazive, numeroase studii au investigat mecanismele biomoleculare prezente în cadrul acestei filiații lezionale. În cadrul carcinogenezei cervicale, angiogeneza constituie un proces esențial, care asigură inițierea și progresia leziunilor neoplazice, și care furnizează la ora actuală numeroase ținte terapeutice, prin prisma complexității mecanismelor implicate.

Studiul factorilor angiogenici și cuantificarea angiogenezei cervicale, poate furniza informații importante despre fenotipul angiogenic al leziunilor preinvazive și invazive scuamose de la nivelul colului uterin. De asemenea, relația fenotipului angiogenic cu parametrii epidemiologici și patologici de interes prognostic pentru aceste leziuni poate furniza date în legătură cu potențialul evolutiv și poate crea modele de evaluare care să constituie baza unor trialuri de investigație pentru posibile ținte terapeutice.

Studiul a inclus 665 de cazuri care au fost analizate prin prisma datelor epidemiologice. Ulterior, analiza histopatologică realizată pe un lot de 650 de leziuni preinvazive și invazive scuamoase a investigat tipul și asocierea leziunilor (displazie/carcinom), gradul leziunilor, aspectele particulare ale carcinoamelor, prezența invaziei vasculare și perineurale.

Studiul imunohistochimic s-a realizat pe un lot de 57 biopsii pentru care au fost analizate microdensitatea vasculară, gradul de maturitate și proliferare al vaselor, precum și expresia unor factori de creștere și a receptorilor acestora, comparativ, pentru cele două categorii lezionale și în raport cu parametrii epidemiologici și histopatologici, în acest sens utilizând analiza statistică (medii, deviații standard și teste t-Student, Anova, Chi pătrat, Pearson).

Cuvinte cheie: angiogeneză, displazie, carcinom, microdensitate vasculară, imaturitate, proliferare, factori de creștere, fenotip angiogenic.

Capitolul I- „Aspecte epidemiologice și factori de risc implicați în leziunile preinvazive și invazive ale colului uterin”- descrie incidența cancerului cervical și a leziunilor precursore în lume și în România, în raport cu grupele de vârstă și patologia tumorală malignă în general. Totodată este discutat rolul programelor de screening pentru aceste leziuni și impactul asupra prognosticului pacientelor. De asemenea, sunt analizați principalii factori de risc implicați în apariția leziunilor displazice și invazive cervicale.

Capitolul II- „Angiogeneza - mecanism de bază pentru carcinogeneză”- descrie date istorice legate de angiogeneza, mecanismele angiogenezei tumorale, rolul factorilor proangiogeni și antiangiogeni, mecanismele de switch angiogenic al tumorilor, precum și rolul elementelor stromale în angiogeneză, modelele experimentale utilizate pentru investigare, posibilitățile de cuantificare ale procesului și perspectivele cercetării în această direcție.

Capitolul III- „Rolul angiogenezei în leziunile preinvazive și invazive ale colului uterin”- subliniază particularitățile procesului de angiogeneză tumorală în leziunile displazice și invazive cervicale, în acest sens fiind amintite studii clasice și recente.

OBIECTIVELE STUDIULUI

În acest studiu este propusă o evaluare complexă a angiogenezei cervicale în cadrul leziunilor preinvazive și invazive scuamoase, prin utilizarea unor metode clasice, precum și a unor tehnici reprezentate de imunohistochimie și morfometrie.

Principalele obiective specifice ale studiului includ:

- identificarea și definirea a parametrilor morfologici ce caracterizează leziunile precursore și invazive scuamoase cervicale în vederea utilizării acestora ca și criterii de apreciere a prognosticului în cadrul investigațiilor imunohistochimice;
- cuantificarea vaselor de neoformație în leziunile preinvazive și invazive scuamoase cervicale cu scopul de a evidenția gradul de implicare al angiogenezei în apariția și progresia leziunilor;
- identificarea gradului de maturitate al vaselor nou-formate în leziunile preinvazive și invazive scuamoase cervicale;
- stabilirea gradului activității proliferative a vaselor de neoformație;
- identificarea și cuantificarea proteinelor cu rol angiogenic și a receptorilor acestora în vederea stabilirii surselor proangiogenice, precum și a unor fenotipuri angiogenice specifice;
- identificarea unor mecanisme moleculare sinergice sau antagonice în modularea angiogenezei.

CAPITOLUL IV- „Material și Metode”- oferă informații despre materialul studiat și metodele utilizate în cercetare.

MATERIALUL STUDIAT

Prezentul studiu a fost realizat pe o perioadă de 4 ani (2009-2012), materialul biologic fiind reprezentat de piese de biopsie, conizație sau histerectomie, obținute de la pacientele internate în Clinicile de Obstetrică-Ginecologie ale Spitalului Clinic Județean de Urgență Craiova.

METODE UTILIZATE

Într-o primă etapă am urmărit **evaluarea epidemiologică** a unui număr de 665 de cazuri din punct de vedere al distribuției pe ani calendaristici, grupe de vârstă, medii de proveniență și factori de risc asociați.

Ulterior, analiza **histopatologică** s-a realizat pe 660 de piese chirurgicale și fragmente biopsice care au fost fixate în formol tamponat 10%, prelucrate prin tehnica clasică de includere la parafină, secționare la 3-5 μm și colorare cu Hemalaum-Eozină. S-a urmărit tipul și asocierea leziunilor (displazie/carcinom), gradul leziunilor, aspectele particulare ale carcinoamelor, prezența invaziei vasculare și perineurale.

Analiza **imunohistochimică** s-a realizat pe un lot de 57 de biopsii selectate din cazuistica analizată pentru care au fost analizate microdensitatea vasculară (CD105), gradul de maturitate al vaselor (CD105/α-SMA), gradul de proliferare vasculară și tumorală (Ki67/CD105), precum și expresia unor factori de creștere și a receptorilor acestora (VEGF, VEGFR1, VEGFR2, ANG2).

Panelul de anticorpi utilizați este redat mai jos:

Anticorpul	Clona/ Producător	Diluția	Demascarea antigenică	Control pozitiv
CD105 (endoglina)	SN6h/ Dako	1:1000	-	Rinichi
CD105 (endoglina)	Policlonal/ Thermo Scientific	1:50	Citrat, pH 6	Rinichi
α-SMA (smooth muscle actin)	1A4/ Dako	1:50	Citrat, pH 6	Colon
Ki67	MIB 1/ Dako	1:200	Citrat, pH 6	Carcinom mamar
VEGF	C1/ Dako	1:100	Citrat, pH 6	Rinichi
VEGFR1 (Flt-1)	C17/ Dako	1:150	Citrat, pH 6	Tegument
VEGFR2 (KDR/Flk-1)	Policlonal/ Abcam	1:300	Citrat, pH 6	Rinichi
ANG 2 (angiopoietina)	F1/ SantaCruz Biotechnology	1:50	Citrat, pH 6	Placenta

Au fost realizate reacții simple și duble; sistemele de lucru pentru reacțiile simple au fost reprezentate de LSAB2 System-HRP și CSAII (Biotin-Free Catalyzed Amplification System-CD105 monoclonal), dezvoltarea realizându-se cu DAB (diaminobenzidine).

În cazul reacțiilor duble, au fost utilizate secvențial sistemele LSAB2 System-HRP (pentru CD105- policlonal, Ki67), respectiv LSAB2 System-AP (pentru α -SMA), dezvoltarea realizându-se cu DAB (brun), respectiv Vulcan Fast Red (roșu).

Analiza morfometrică a analizat microdensitatea vaselor marcate CD105 și α -SMA prin metoda "hot spot", care a constatat în cuantificarea manuală a vaselor. Pentru cuantificare au fost calculate totodată scoruri compuse în cazul VEGF, VEGFR1, VEGFR2, ANG-2 care au luat în considerare procentul de celule marcate și intensitatea marcajului. În cazul Ki 67 a fost calculat indexul de proliferare, prin raportarea numărului de celule pozitive la numărul total de celule numărate la obiectiv microscopic de 40x.

Analiza statistică a utilizat valori medii, deviații standard și teste de comparație (t Student, Anova unifactorială, Chi pătrat, Pearson), realizate cu ajutorul softului SPSS10.

CAPITOLUL V- „Rezultate” și CAPITOLUL VI- „Discuții” redau rezultatele studiului, care sunt raportate la date clasice sau recente din literatura de specialitate.

Studiul epidemiologic a indicat o incidență maximă a leziunilor în decada a IV-a de viață, cu o vârstă medie a diagnosticului de 35,4 ani în cazul leziunilor CIN, respectiv 53,2 ani pentru carcinoamele scuamoase. În acest studiu au fost constatate diferențe de distribuție ale cazurilor în funcție de mediul de proveniență, iar factorii de risc asociați au fost identificați în 65,4% din cazuri fiind reprezentați de fumat, contraceptive orale și infecția HPV atât în leziunile CIN, cât și în carcinoame

Datele din literatură indică o vârstă medie de diagnostic pentru carcinoamele scuamoase de aproximativ 51 de ani, în timp ce pentru leziunile displazice, această vârstă este cuprinsă între 25-35 de ani, motivul pentru care screening-ul pentru cancerul cervical este indicat pentru pacienți cu vârsta de 25-30 de ani [7]. Unele studii au arătat că leziunile displazice de grad scăzut au tendință mai mare de a regresa, în timp ce leziunile de grad înalt cel mai probabil persistă sau progresează [168]. Datele din literatură indică o acțiune sinergică în cazul factorilor de risc, existând așa numita ipoteză multifactorială a cancerului cervical, care susține o interacțiune a leziunilor inflamatorii cu perturbări hormonale și expunerea la substanțe chimice, inclusiv cele din compoziția fumului de țigară și care conduc la apariția leziunilor [24].

Studiul histopatologic a indicat prezența leziunilor CIN în 79,2% cazuri, carcinoamelor în 6,3% cazuri și asocierilor în 14,5% cazuri, mai ales în leziunile de grad înalt; microcarcinomul a fost prezent asociat leziunilor franc invazive într-un procent de 11,1%. Leziunile precursorare de grad înalt (58,9%) și carcinoamele slab diferențiate (48,1%) au fost cele mai frecvente, aspectul clasic keratinizat sau nekeratinizat fiind observat în 85,2% din cazurile analizate. Este descrisă prezența carcinoamelor bazaloide și papilare scuamoase în 14,8% din cazuri, precum și a invaziei perineurale și vasculare în 5,9%, respectiv 10,3% din cazuri.

Gradarea histologică corectă a leziunilor CIN este importantă în vederea atitudinii terapeutice, intrucât aceasta este diferită pentru CIN I, CIN II și CIN III [115]. În cazul carcinoamelor scuamoase cervicale, a fost propus un sistem de gradare complex, care a inclus aprecierea gradului de keratinizare celulară, pleiomorfismul nuclear, paternul invaziei și răspunsul țesutului gazdă (infiltratul inflamator) [95]. În ceea ce privește formele keratinizate și non-keratinizate, frecvent pot fi văzute combinații ale acestor forme, ceea ce indică faptul că există un spectru larg de modificări biologice [168].

Datele din literatură indică faptul că majoritatea carcinoamelor scuamoase cervicale se dezvoltă din leziunile precursore, aproximativ 2/3 din leziunile CIN netratate evoluând către un carcinom invaziv, într-o perioadă variabilă de timp care poate fi cuprinsă între 3-20 de ani, fiind rareori raportate carcinoame scuamoase cervicale dezvoltate rapid, fără leziuni precursore în antecedente [99; 168]. Totodată acest aspect evolutiv al leziunilor displazice subliniază importanța căutării minuțioase a aspectelor lezionale de grad înalt și a focarelor de microinvazie pe secțiuni histologice seriate [32]. Datele din literatură indică faptul că probabilitatea invaziei vasculare crește cu profunzimea invaziei tumorale, prezența embolilor neoplazici reprezentând un factor de risc independent [168]. Totodată, invazia perineurală constituie un indicator independent de prognostic pentru carcinoamele cervicale [123].

Analiza imunohistochimică a urmărit caracterizarea și cuantificarea comparativă a angiogenezei cervicale în leziunile displazice și invazive cervicale, în raport cu parametrii epidemiologici și histopatologici de interes.

Imunomarcajul *CD105* a fost utilizat în vederea cuantificării microdensității vasculare, fiind identificat în toate cazurile în citoplasma celulelor endoteliale. MVD *CD105* a crescut cu gradul leziunilor, dar fără diferențe între carcinoame și displazii ceea ce indică prezența neoformării vasculare în ambele tipuri lezionale.

Microdensitatea vasculară ca metodă de cuantificare a angiogenezei tumorale a fost asociată cu prognosticul pacienților, un număr crescut de vase de neoformație fiind asociat cu un risc crescut de progresie tumorală și metastazare, precum și cu o perioadă de supraviețuire mai mică [38]. Legătura dintre *CD105* și angiogeneza tumorală a fost sugerată de numeroase studii în care s-a constatat o supraexpresie a proteinei la nivelul celulelor endoteliale în cazul tumorilor cu localizare la nivelul colonului, glandei mamare, plămânilor, țesutului cerebral, prostatei, precum, și la nivel cervical, în comparație cu țesuturile normale [179].

Imunoreacția *CD105/α-SMA* a fost utilizată pentru aprecierea gradului de maturitate al vaselor de neoformație, marcajul *α-SMA* fiind identificat în toate cazurile la nivelul pericitelor și miofibroblaștilor stromali. MVD *α-SMA* a fost superioară în cazul leziunilor CIN de grad scăzut (nesemnificativ statistic) și a carcinoamelor bine diferențiate (semnificativ statistic) comparativ cu leziunile de grad înalt, în care gradul de imaturitate vasculară a fost superior. Gradul de imaturitate vasculară a fost proporțional cu microdensitatea vaselor nou-formate.

Pericitele au fost asociate cu stabilitatea microvasculară, cu toate că mecanismele biomoleculare implicate nu sunt pe deplin cunoscute [165]. Unele studii au arătat că pierderea pericitelor și chiar alterarea conexiunilor acestora sunt responsabile de instabilitatea vasculară, prezența hemoragiilor și creșterea riscului de metastazare [14].

Imunomarcajul *Ki67* a fost utilizat pentru stabilirea gradului de proliferare tumorală (*Ki67*) și vasculară (*Ki67/CD105*), reacția fiind prezentă la nivel nuclear în toate cazurile. Indexul de proliferare *Ki67* a fost semnificativ mai mare în cazul leziunilor displazice și invazive de grad înalt, precum și în carcinoame comparativ cu leziunile displazice. În cazul leziunilor CIN, valoarea medie a numărului de vase *CD105* pozitive, care au prezentat activitate proliferativă a fost de 8,5%, iar în cazul carcinoamelor de 15,6 %.

Cu toate că celulele endoteliale sunt activate încă din stadiile inițiale ale angiogenezei, proces biomolecular dovedit a fi prezent în cazul leziunilor preinvazive cervicale, majoritatea acestora sunt negative pentru *Ki67*, indicând o activitate proliferativă scăzută [145]. De asemenea, în cazul carcinoamelor cervicale, vasele de neoformație cu activitate proliferativă sunt relativ rare [145].

Imunoexpresia *VEGF* a fost identificată în 89,4% din cazurile analizate la nivelul citoplasmei celulelor displazice și neoplazice, existând diferențe semnificativ superioare în cazul leziunilor CIN III și carcinoamelor de grad înalt, precum și în cazul carcinoamelor comparativ cu leziunile displazice. S-au constatat diferențe semnificative ale scorului VEGF în raport cu indexul de proliferare Ki67, în cazul carcinoamelor, precum și în raport cu MVD CD105 atât în cazul leziunilor CIN, cât și în cazul carcinoamelor.

Cele mai multe studii din literatura de specialitate indică o creștere a expresiei VEGF în cazul tumorilor invazive, agresive, aspect observat în carcinoamele gastrice, ovariene, colorectale, mamare, pulmonare [44]. La nivelul colului uterin este demonstrată implicarea HPV în angiogeneza tumorală într-o manieră VEGF dependentă, deoarece prin intermediul proteinelor oncogenice, pe de o parte conduce la inactivarea unor gene supresoare tumorale (p53, pRb), iar pe de altă parte este activat factorul HIF-1, trigger al procesului de neoformare vasculară [147].

Imunoreacția *VEGFR1* a fost identificată în 82,4% din cazurile analizate la nivelul citoplasmei celulelor displazice și neoplazice, existând diferențe semnificative ale scorului VEGFR1 în raport cu gradul de diferențiere al carcinoamelor, leziuni în care valorile scorului VEGFR1 au fost semnificativ superioare leziunilor CIN.

Imunomarcajul *VEGFR2* a fost identificată în 78,9% din cazurile analizate, fără a fi identificate diferențe statistice ale scorului în raport parametrii de interes, inclusiv cu marcajele VEGF și VEGFR1.

În principiu, activarea VEGFR1 induce migrarea celulelor endoteliale, fără a avea efecte proliferative celulare semnificative, existând și forme solubile care au efect inhibitor asupra VEGF [159]. Sistemul VEGF-VEGFR2 reprezintă cel mai important stimulator al angiogenezei tumorale și totodată ținta ideală pentru terapia angiogenică [46]. Unele trialuri clinice realizate pe loturi de pacienți cu cancer colorectal, mamă, renal sau pulmonar și în care s-a administrat terapie anti- VEGF-A/VEGFR, au avut ca rezultat o creștere semnificativ statistică a intervalului liber de supraviețuire, cu efecte adverse minime [163].

Marcajul *ANG-2* a fost identificată în 64,9% din cazurile investigate la nivel citoplasmatic apical din celulele displazice și neoplazice, scorurile fiind semnificativ inferioare în cazul leziunilor CIN comparativ cu carcinoamele, respectiv în carcinoamele slab diferențiate comparativ cu cele bine/ moderat diferențiate.

Angiopoetina 2 (ANG2) constituie un factor de creștere endotelial specific, care antagonizează activitatea ANG1, promovează activitatea proinflamatorie vasculară și are rol în destabilizarea endoteliului și remodelarea vasculară. Supraexpresia ANG-2 în tumori este asociată cu reducerea numărului de pericite aflate în contact direct cu celulele endoteliale [68; 211]. În prezența VEGF, angiopoietina 2 promovează creșterea și ramificarea vasculară, în timp ce în absența VEGF, conduce la distrugerea celulelor endoteliale și regresia vaselor nou-formate [72; 110].

CAPITOLUL VII- „Concluzii” redă concluziile studiului.

Analiza datelor epidemiologice

- variația incidenței leziunilor între anii analizați a fost de 11%;
- incidența maximă a leziunilor a fost observată în decada a IV-a de viață, cu o vârstă medie a diagnosticului de 35,4 ani în cazul leziunilor CIN, respectiv 53,2 ani pentru carcinoamele scuamoase;
- factorii de risc identificați în 65,4% din cazuri, au fost reprezentați de fumat, contraceptive orale și infecția HPV;

Analiza histopatologică

- leziunile CIN au reprezentat 79,2%, carcinoamele 6,3% și asocierile acestora 14,5%; microcarcinomul a fost identificat în 11,1% din leziunile invazive analizate;
- leziunile precursor de grad înalt au predominat, fiind identificate în 58,9% din cazuri;
- în raport cu gradul tumoral, cele mai frecvente carcinoame scuamoase au fost slab diferențiate, urmate de cele moderat diferențiate, aspectul clasic keratinizat sau nekeratinizat al carcinoamelor fiind observat în 85,2% din cazuri;
- au fost identificate cazuri de carcinom bazaloid (8,8%) și carcinom papilar scuamos (6%), precum și prezența invaziei vasculare (5,9%) și perineurale (10,3%);

Analiza imunohistochimică

- valorile MVD CD105 au fost semnificativ superioare în leziunile de grad înalt, dar fără diferențe statistice între displazii și carcinoame, ceea ce arată un proces de neoformare constant de-a lungul progresiei tumorale;
- gradul de imaturitate vasculară cuantificat cu ajutorul reacției CD105/ α -SMA a fost superior în cazul leziunilor de grad înalt și proporțional cu densitatea vaselor de neoformație;
- în cazul leziunilor CIN, valoarea medie a numărului de vase CD105 pozitive, care au prezentat activitate proliferativă a fost de 8,5%, iar în cazul carcinoamelor de 15,6 %, fără diferențe în raport cu gradul leziunilor, ceea ce poate sugera existența unui compartiment proliferativ vascular constant;
- vasele cu activitate proliferativă au prezentat unele aspecte morfologice de maturitate;
- imunomarcajul VEGF s-a asociat cu gradul leziunilor, indexul Ki67 și MVD CD105, fiind superior pentru carcinoame;
- s-au constatat diferențe semnificative ale scorului VEGFR1 în raport cu gradul de diferențiere al carcinoamelor, leziuni în care valorile scorului VEGFR1 au fost semnificativ superioare leziunilor CIN;
- scorurile superioare ale marcajului VEGFR1 la nivelul celulelor tumorale, comparativ cu VEGFR2 sugerează mecanisme de reglare autocrină a angiogenezei cervicale realizate mai ales prin intermediul VEGFR1;
- imunoreacția ANG-2 a fost semnificativ inferioară în cazul leziunilor CIN comparativ cu carcinoamele, respectiv în carcinoamele slab diferențiate comparativ cu cele bine/moderat diferențiate, aspect care poate fi pus pe seama rețelei vasculare deja destabilizate;

- profilul imunohistochimic caracterizat prin pozitivitatea CD105, Ki67 la nivel tumoral și vascular, VEGF, VEGFR1 și negativitatea α -SMA și ANG-2 a corespuns unor carcinoame moderat/ slab diferențiate, desemnând leziuni agresive;
- în cazul leziunilor CIN III, profilul angiogenic a fost mai degrabă apropiat de cel al carcinoamelor scuamoase cervicale decât de cel al leziunilor precursorare, caracterizându-se prin valori mari ale MVD CD105, grade de imaturitate și proliferare vasculară și tumorală ridicate, precum și scoruri VEGF și ANG-2 specifice unui imunofenotip agresiv;
- pentru leziunile scuamoase de la nivelul colului uterin, aprecierea microdensității vasculare (CD105), a maturității (α -SMA), proliferării (Ki67) și stabilității (ANG-2) vaselor nou formate, precum și evaluarea VEGF și VEGFR1 se dovedesc utile pentru a caracteriza fenotipuri angiogenice agresive surprinse în stadii preinvazive sau invazive.

Bibliografie selectivă

- [7] Arbyn M, Antoine J, Valerianova Z, Mägi M, Stengrevics A, Smailyte G, Suteu O, Micheli A. Trends in cervical cancer incidence and mortality in Bulgaria, Estonia, Latvia, Lithuania and Romania. *Tumori*. 2010;96(4):517-23.
- [14] Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15(1):102-11.
- [24] Castellsagué X, Muñoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis- role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31):20-8.
- [32] Dalla Palma P, Giorgi Rossi P, Collina G, Buccoliero AM, Ghiringhello B, Gilioli E, Onnis GL, Aldovini D, Galanti G, Casadei G, Aldi M, Gomes VV, Giubilato P, Ronco G; NTCC Pathology Group. The reproducibility of CIN diagnoses among different pathologists: data from histology reviews from a multicenter randomized study. *Am J Clin Pathol*. 2009;132(1):125-32.
- [38] Duff SE, Li C, Garland JM, Kumar S. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J*. 2003;17(9):984-92.
- [44] Ferrara N. The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat*. 1995;36(2):127-37.
- [46] Folkman J, History of Angiogenesis in: Figg DF, Folkman J (eds.), *Angiogenesis- An Interogative Approach From Science To Medicine*, Springer, New York, 2008.
- [68] Hammes HP, Lin J, Wagner P, Feng Y, Vom Hagen F, Krzizok T, Renner O, Breier G, Brownlee M, Deutsch U. Angiopoietin-2 causes pericyte dropout in the normal retina: evidence for involvement in diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2004;53(4):1104-10.
- [72] Hammes HP, Lin J, Wagner P, Feng Y, Vom Hagen F, Krzizok T, Renner O, Breier G, Brownlee M, Deutsch U. Angiopoietin-2 causes pericyte dropout in the normal retina: evidence for involvement in diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2004;53(4):1104-10.
- [95] Krinstensen G, Trope C. Modern prognostic factors in cervical cancer with special attention to early disease. *CME J Gynecol Oncol*. 2001;6:196-203.
- [99] Kruse AJ, Baak JP, Janssen EA, Kjellebold KH, Fiane B, Lovslett K, Bergh J, Robboy S. Ki67 predicts progression in early CIN: validation of a multivariate progression-risk model. *Cell Oncol*. 2004;26(1-2):13-20.
- [110] Maisonnier PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos

- GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 1997;277(5322):55-60.
- [115] Martin CM, O'Leary JJ. Histology of cervical intraepithelial neoplasia and the role of biomarkers. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011;25(5):605-15.
- [123] Memarzadeh S, Natarajan S, Dandade DP, Ostrzega N, Saber PA, Busuttill A, Lentz SE, Berek JS. Lymphovascular and perineural invasion in the parametria: a prognostic factor for early-stage cervical cancer. *Obstet Gynecol*. 2003;102(3):612-9.
- [145] Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Cancer*. 2009;45(11):1924-34.
- [147] Recommendations on cancer screening in the European union. Advisory Committee on Cancer Prevention. *Eur J Cancer*. 2000;36(12):1473-8.
- [163] Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilenbaum R, Johnson DH. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2006; 355:2542–50.
- [165] Sennino B, Falcón BL, McCauley D, Le T, McCauley T, Kurz JC, Haskell A, Epstein DM, McDonald DM. Sequential loss of tumor vessel pericytes and endothelial cells after inhibition of platelet-derived growth factor B by selective aptamer AX102. *Cancer Res*. 2007;67(15):7358-67.
- [168] Simionescu C, Cernea N, Maragaritescu CI, Georgescu C, Iliescu D. *Patologia colului uterin*. Editura Medicală Universitară Craiova, 2009.
- [179] Takahashi N, Haba A, Matsuno F, Seon BK. Antiangiogenic therapy of established tumors in human skin/severe combined immunodeficiency mouse chimeras by anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies, and synergy between anti-endoglin antibody and cyclophosphamide. *Cancer Res*. 2001;61(21):7846-54.
- [211] Zhang L, Yang N, Park JW, Katsaros D, Fracchioli S, Cao G, O'Brien-Jenkins A, Randall TC, Rubin SC, Coukos G. Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, supporting angiogenesis in ovarian cancer. *Cancer Res*. 2003;63(12):3403-12.