

**Universitatea de Vest “Vasile Goldiș” din Arad
Facultatea de Medicină, Farmacie și Medicină Dentară**

Rezumat teză de doctorat

Relația dintre explorarea imagistică și profilul angiogenic și limfangiogenic al cancerului bronhopulmonar

**Conducător de doctorat
Prof. Univ. Dr. Gheorghe Ciobanu**

**Doctorand
Amalia Birău**

- Arad, 2012 -

Cuprins

1. Introducere.....	3
2. Date din literatură.....	3
2.1. Anatomia și histologia plămânului.....	3
2.2. Anatomia radiologică.....	3
2.3. Patologia tumorilor pulmonare.....	4
2.4. Diagnosticul imagistic al tumorilor pulmonare.....	4
2.5. Angiogeneza și limfangiogeneza tumorală.....	4
3. Cercetări originale.....	4
3.1. Motivație și obiective.....	4
3.2. Pacienți, material și metode.....	5
3.3. Rezultate.....	8
3.3.1. Raportarea datelor statistice asupra cazuisticii proprii.....	8
3.3.2. Valoarea diagnostică a metodelor imagistice.....	8
3.3.3. Raportarea rezultatelor morfologice.....	9
3.3.4. Valoarea prognostică a microdensității vasculare.....	9
3.3.5. Particularități ale expresiei VEGF în carcinoamele bronhopulmonare.....	11
3.3.6. Expresia VEGF-C în carcinoamele bronhopulmonare.....	11
3.3.7. Expresia D2-40 în diferite tipuri histopatologice ale carcinoamelor bronhopulmonare.....	12
3.3.8. Evaluarea angiogenezei - indicator al heterogenității vaselor sanguine în carcinoamele bronhopulmonare.....	12
4. Concluzii	13
5. Bibliografie selectivă.....	15

1. Introducere

Cancerul bronhopulmonar (CBP) a devenit la sfârșitul secolului XX una din principalele cauze mondiale de deces (*Alberg și colab, 2003*). CBP a crescut alarmat în ultimile decenii, în special în țările dezvoltate din punct de vedere economic. Este mai frecvent în mediul urban față de mediul rural. Vârsta medie la diagnostic este de 50 de ani la bărbați și peste 60 de ani la femei (*Alberg și colab., 2003*). Dacă în urmă cu 20 de ani lucrările științifice evidențiau un raport bărbați/femei de 9/1, astăzi s-a modificat ajungând 2/1.

Angiogeneza este o condiție esențială pentru creșterea tumorilor maligne (*Folkman, 1971*). Partenerii implicați în procesul de angiogeneză sunt celulele endoteliale dar și celule inflamatorii, fibroblaste și alte celule stromale care invadează tumora și țesuturile peritumorale (*Ryu, 1979*). Ansamblu interacțiunilor dintre aceste celule reprezintă un aspect important în cadrul angiogenezei, a progresei și metastazării tumorale. Aceste procese sunt reglate prin semnale transmise către receptorii transmembranari, cum ar fi citokinele, factorii de creștere, sau pătrund direct în citoplasmă și nucleu ca în cazul hormonilor.

Tehnicile imagistice (examenul radiologic, ecografic, scintigrafic, computer tomografic, rezonanța magnetică și angiografia), utilizate după un algoritm rațional, pot determina localizarea, structura și vascularizația tumorii, extensia locală și la distanță, depistează adenopatiile locoregionale, pun în evidență metastazele osoase sau/și viscerale. Ele completează datele clinice și biologice, descriu imaginea obținută și au capacitate limitată în decelarea extensiei microscopice tumorale.

Un demers diagnostic bine condus, o stadializare corectă și un tratament bazat pe cunoașterea evoluției clinice a cancerului bronhopulmonar, conduc la selecția celei mai adecvate terapii multidisciplinare pentru fiecare pacient în parte (*Minna și colab., 1997*).

2. Date din literatură

Examinarea radiografiei urmărește: examenul părții osoase a toracelui: coloana, coastele, claviculele, omoplații, etc.; examenul opacității mediastinale – examenul desenului câmpurilor pulmonare și a altor modificări situate în plămân – examenul hemidiafragmelor și al sinusurilor costo- și cardiodiafragmatice.

Tomografia computerizată (CT) este extrem de utilă în caracterizarea formațiunilor tumorale, în stabilirea extensiei tumorale, în evidențierea adenopatiilor (în numai 64% din cazuri evidențiate prin examen radiologic standard, în 80% din cazuri prin tomografie convențională și în 95% din cazuri prin CT), cât și asupra prezenței metastazelor (hepatice, suprarenaliene) (*Zaharia și colab., 2000*).

Organizația Mondială a Sănătății, în 2004, a revizuit clasificarea histologică a tumorilor pulmonare maligne din 1999 din cauza multitudinii de forme histologice și a necesității de a corela un anumit tip histologic cu un anumit prognostic. Datorită prognosticului, evoluției și tratamentului diferite, CBP se clasifică în două grupe majore, cu importanță clinică practică:

- *non small cell carcinoma* (NSCLC = carcinomul fără celule mici), care cuprinde carcinomul scuamos, adenocarcinomul, carcinomul cu celule mari;
- *small cell carcinoma* (SCLC = carcinomul cu celule mici) (*Bogdan, 2008, Zander și colab. 2008*).

Angiogeneza tumorală este una din situațiile patologice în care este întâlnită inițierea unei noi rețele vasculare. În 1971, *Folkman* emite ipoteza angiogenezei tumorale conform căreia creșterea exponențială și metastazarea tumorală sunt strâns legate de asigurarea suportului vascular tumoral.

Limfangiogeneza tumorală - sistemul limfatic reprezintă o cale rapidă de metastazare tumorală. Folosirea markerilor limfatici a evidențiat prezența rețelei limfatice și în interiorul tumorii, și a determinat studierea amănunțită a formării acesteia.

3. Cercetări originale

3.1. Motivație și obiective

Scopul acestei lucrări a fost de a evalua corelarea metodelor radioimagistice cu angiogeneza și limfangiogeneza tumorală în cancerul bronhopulmonar.

Mi-am propus în această lucrare să analizez posibilitățile clinice și paraclinice ale diagnosticului cancerului bronho-pulmonar. În acest scop voi încerca să realizez:

- un studiu epidemiologic (date sintetice) al CBP în general;
- să stabilesc simptomatologia clinică asociată diagnosticului CBP;
- să stabilesc investigațiile radioimagistice care demonstrează diagnosticul CBP;

De asemenea studiul de față își propune să evidențieze valoarea explorărilor radioimagistice în diagnosticarea și supravegherea evolutivă a CBP.

Studiile au demonstrat faptul că angiogeneza este un proces esențial în dezvoltarea și progresia tumorilor maligne pulmonare. Deși au fost studiate și descrise multiple căi implicate în progresia și metastazarea carcinoamelor pulmonare, doar două căi moleculare sunt ținte terapeutice în practica clinică: cea a EGF și VEGF. Cu toate acestea rata de supraviețuire la cinci ani pentru pacienții în stadiile I-IV, conform clasificării TNM, este de 15%, procent care în ultimii 40 de ani s-a îmbunătățit doar cu 5%. Aceste date ne-au motivat în realizarea acestui studiu, considerând că este importantă evaluarea particularităților angiogenice și limfangiogenice din neoplaziile bronhopulmonare.

Cunoașterea particularităților de expresie ale VEGF în diferitele tipuri de carcinoame pulmonare poate fi utilă în abordarea viitoare a practicilor terapeutice și găsirea unor combinații optime care să permită o blocare eficientă a angiogenezei tumorale. Utilizarea unor medicamente care vizează secvențial diferiți factori pro-angiogenici sau combinarea medicamentelor cu mod diferit de acțiune-anticorpi monoclonali cu inhibitori ai receptorilor tirozin kinazici poate ajuta la țintirea mai eficientă a angiogenezei tumorale. Analiza tipurilor și morfologiei vaselor sanguine tumorale (imature, intermediare și mature) cu ajutorul dublei imunocolorări CD 34/Actină și a celor limfatice vizualizate cu D2-40 și VEGF-C în cadrul acestei teze pot constitui baza preclinică de dezvoltare a unor terapii eficiente personalizate pentru neoplaziile pulmonare.

3.2. Pacienți, material și metode

3.2.1. Selecția primară și secundară a cazurilor

Pentru studiul de față am selecționat un număr de 90 de pacienți care au fost diagnosticați cu tumori bronhopulmonare pe o perioadă de 3 ani, din cazuistica Spitalului Clinic nr. 4 Timișoara și a Spitalului Clinic de Pneumoftiziologie Arad. Toți pacienții incluși în studiu au prezentat toate datele clinice necesare prelucrării statistice și de asemenea, au fost cunoscute datele clinico-patologice pre- și postoperatorii specifice, cu referire particulară la elementele de extensie locală, la distanță și particularitățile procedurilor terapeutice (chirurgicale, chimioterapie).

Cazurile au fost introduse în studiu pe baza următoarelor criterii:

1. pacienții au fost internați pe o perioadă de 3 ani;
2. pacienții au fost investigați și confirmați cu CBP;
3. pacienții au fost stadializați conform clasificării TNM (OMS 2004);
4. pacienții au acceptat introducerea lor în studiu după ce le-au fost prezentate criteriile de confidențialitate, științifice și deontologice;

3.2.2. Procesarea primară a specimenelor biopsice

Specimenele tumorale au fost recoltate chirurgical din piesele de exereză, alegându-se zone reprezentative din tumoră și de la limita tumorii și prin bronhoscopie. Au fost evitate zonele cu necroze și hemoragii extinse. Biopsiile prelevate chirurgical au fost spălate cu ser fiziologic și fixate în formalină 10% tamponată (pH 7,2). Pentru a minimaliza denaturarea antigenilor, țesuturile nu s-au expus la temperaturi mai mari de 60°C în cursul incluzionării în parafină. S-a efectuat apoi secționare seriată la microtom (Shandon ME).

3.2.3. Metodele morfologice

A fost efectuată colorarea cu hematoxină-eozină și colorația tricroma Masson. Examinarea secțiunilor colorate ne-a permis stabilirea diagnosticului histopatologic, conform criteriilor acceptate de către OMS.

3.2.4. Metodele imunohistochimice

Tehnica imunohistochimică permite vizualizarea antigenelor tisulare sau celulare. Selecția cazurilor pentru colorarea imunohistochimică presupune stabilirea diagnosticului histopatologic pe preparate colorate morfologic, hematoxină-eozină sau tricromă. Primul pas în diagnosticul imunohistochimic este reprezentat de imunocolorarea cu vimentină, clona V9 a tuturor cazurilor selectate. Reacția pozitivă a elementelor de control pentru vimentină dovedește că procesarea primară a fost corectă și diagnosticul imunohistochimic va fi optim.

Pentru realizarea tehnicii imunohistochimice au fost utilizate automatele pentru imunohistochimie (DakoCytomation). Demascarea prin căldură s-a realizat fie folosind cuptorul cu microunde, fie prin metoda automată, cu ajutorul PT Link-ului.

Tehnica imunohistochimică a debutat cu deparafinarea și rehidratarea secțiunilor tisulare. Deparafinarea a inclus trei etape: deparafinarea la termostat, la o temperatură de 58 grade Celsius, timp de 30 minute, urmată de spălarea și îndepărtarea parafinei în două băi de benzen la temperatura camerei. Rehidratarea tisulară a avut ca scop aducerea secțiunilor tisulare în condiții similare cu cele "in vivo".

Demascarea antigenului, utilă pentru îndepărtarea resturilor de parafină și distrugerea punților metilenice care determină modificări conformaționale ale epitopilor, s-a realizat fie prin digestie enzimatică, utilizând proteinaza, fie prin căldură. Au fost utilizate soluții de demascare cu pH6 sau pH9 (DakoCytomation) diluție 1: 10, având un timp de demascare variabil între 5 și 30

minute în funcție de tipul antigenului studiat (vezi tabelul nr.1). Principalele sisteme de lucru folosite au fost: LSAB+, HRP, EnVision, Advance HRP.

După răcirea secțiunilor (în cazul demascării prin căldură) și spălarea cu apă distilată a acestora, automatul de imunohistochimie a fost programat pentru a realiza următoarele etape ale tehnicii: blocarea peroxidazei endogene cu apă oxigenată 3 %, incubarea cu anticorpul primar, 10 minute-12 ore, incubarea cu anticorpul secundar, 15 minute- 1 oră, incubarea cu anticorpul terțiar, 15 minute-1 oră, aplicarea cromogenului- 3,3 diaminobenzidină, contracolorarea cu hematoxilină Lille's modificată.

La finalul programului, secțiunile sunt introduse în alcool absolut, 5 minute, apoi uscate și clarefiate în benzen, 5 minute. Montarea se realizează în această situație folosind un mediu de montare permanent de tipul balsamului de Canada. Montarea în cazul dublei imunocolorări a fost realizată folosind un mediu de montare apos, datorită solubilizării în alcool a cromogenului de tip AEC.

Tehnica imunohistochimică și principalii anticorpi folosiți în cadrul studiului, sunt redați în tabelul următor:

Tabel nr. 1. Anticorpii utilizați în studiu

Anticorp	Sursa	Clona	Diluție	Sistem de detecție	Demascare Antigen	Incubare cu anticorp primar
CD34	Dako	Qbend10	RTU	LSAB+	30', pH6	30'
CD31	Dako	JNC6	1:25	LSAB+	30', pH6	30'
FVIII	Dako	Policlonal	1:400	EnVision	20', Prot K	30'
Endoglin	Dako	SN6h	1:25	Advance	30', pH6	30'
Actină	Dako	1A4	RTU	LSAB+	5', pH6	30'
Ki67	Dako	MIB-1	RTU	LSAB+	30', pH6	30'
Podoplanin	Santa Cruz	18H5	1:100	LSAB+	30', pH6	30'
D2-40	Dako	D2-40	RTU	LSAB+	30', pH6	30'
VEGF	Dako	VG1	1:25	LSAB+	15', pH8	30'
VEGFR-2	Neomarkers	Policlonal	1:100	EnVision	30, pH6	45'
VEGF-C	Neomarkers	H-190	1:200	Advance	30', pH6	30'
VEGFR3	Neomarkers	Policlonal	1:100	UltraVision	30', pH6	30'
PDGF	Abcam	Policlonal	1:50	Advance	30', pH6	45'
PDGFR beta	Abcam	Policlonal	1: 150	EnVision	30', pH6	30'

RTU: ready to use, Prot K: proteinază K

3.2.5. Metodele de evaluare și cuantificare a rezultatelor microscopice

Examinarea s-a efectuat cu ajutorul microscopului optic Eclipse600 Nikon, imaginile fiind preluate cu ajutorul camerei digitale Coolpix950. Analiza imaginii microscopice s-a efectuat cu

programul LuciaNet (Nikon), pe imagini achiziționate JPEG, la calibrare x400. Analiza imaginii s-a efectuat după metoda hot-spot, alegându-se câmpurile microscopice cu densitate maximă a semnalelor pozitive. S-a calculat numărul de semnale pozitive, aria, volumul echisferă și perimetrul.

Tipurile de vase sanguine asociate tumorii au fost evaluate pe preparatele dublu imunocolorate cu marker endotelial (CD34) și un marker al celulelor perivasculare, respectiv actina de tip mușchi neted. Vasele asociate tumorii au fost stratificate în funcție de prezența lumenului asociată cu prezența/absența celulelor perivasculare. Din acest punct de vedere, am raportat diferențiat vasele imature, intermediare și mature, conform criteriilor publicate de *Gee și colab (2003)*.

3.3. Rezultate

3.3.1. Raportarea datelor statistice asupra cazuisticii proprii

La lotul de pacienți studiați am interpretat și redat prin grafice și tabele următorii indicatorii: vârsta și mediul de proveniență a pacienților, distribuția pacienților pe sexe, patologia asociată cancerului bronhopulmonar, prezența sau absența factorilor de risc asociați, prezența manifestărilor clinice specifice și nespecifice, stadializarea și clasificarea histopatologică a cancerului bronhopulmonar.

3.3.2. Valoarea diagnostică a metodelor imagistice

Prezentul studiu include un număr de 90 cazuri examinate în Departamentul de Radiologie și Imagistică Medicală a Spitalului Clinic Nr. 4, Timișoara, Spitalul Clinic de Pneumoftiziologie Arad și Centrul de imagistică Euromedic Arad, pe o perioadă de 3 ani, investigate clinico-biologic, ecografic, radiologic, computer tomografic și histologic în vederea stabilirii diagnosticului, conduitei terapeutice și, în unele cazuri, de evaluare postterapeutică.

La lotul de pacienți studiați, evaluarea imagistică s-a realizat prin efectuare de radiografii pulmonare și computer tomografii (CT). Radiografia toraco-pulmonară efectuată în două incidente: de față și de profil lezional, fiind completată ori de câte ori a fost necesar cu alte incidente. În efectuarea imaginilor tomografice s-a utilizat aparatul *CT Bright Speed-16 slice* (GE=general electric).

Examenul CT nativ și cu substanță de contrast are un rol esențial în diagnosticul CBP, permițând evidențierea și delimitarea corectă a tumorii, a adenopatiilor mediastinale și a eventualelor determinări secundare tumorale. CT precizează relațiile tumorii și ale adenopatiilor

mediastinale cu bronhiile, vasele, peretele toracic și alte structuri ale mediastinului. Practic alături de endoscopia bronșică, tomografia computerizată permite aprecierea corectă a stadiului în care se află potențialul neoplasm bronhopulmonar, în funcție de care se stabilește atitudinea terapeutică ulterioară. (Ciprut T., 2004)

Bronhoscopia este metoda de elecție în vizualizarea directă a modificărilor macroscopice traheobronșice; completată cu tehnici de recoltare a materialului pentru examinări cito-histologice (puncție, aspirație, broșaj, biopsie), aceasta permite afirmarea cu certitudine a diagnosticului de malignitate în CBP; astăzi indicațiile bronhoscopiei s-au extins, ea fiind utilizată în mod curent și în tratamentul endobronșic al CBP. Evaluarea citologică are o mare valoare diagnostică, dar valoarea predictivă pozitivă sau negativă ca și acuratețea diagnostică depind în mod sigur de erori simple, de prezervarea țesutului, de calitatea procesului și experiența observatorului. În cazul CBP trebuie subliniată coroborarea metodelor imagistice în stadializarea acestor tumori și evidențierea unor complicații majore.

În finalul acestui studiu, trebuie subliniată valoarea metodelor imagistice moderne în evaluarea CBP, necesitatea coroborării datelor obținute prin diverse tehnici imagistice și, nu în ultimul rând, integrarea permanentă a datelor obținute în contextul clinic, eventual consultul interdisciplinar.

3.3.3. Raportarea rezultatelor morfologice

Analiza morfologică și gradul de diferențiere al tumorilor au fost evaluate pe secțiunile colorate cu metoda hematoxilină-eozină. Interpretarea formelor histopatologice s-a bazat pe criteriile Organizației Mondiale a Sănătății (Travis și colab, 2004). Dintre cele 90 de cazuri selecționate pentru studiul morfologic, 72 au fost carcinoame de tip scuamocelular, 8 carcinoame cu celule mari, 10 adenocarcinoame și 10 carcinoame cu celule mici.

3.3.4. Valoarea prognostică a microdensității vasculare

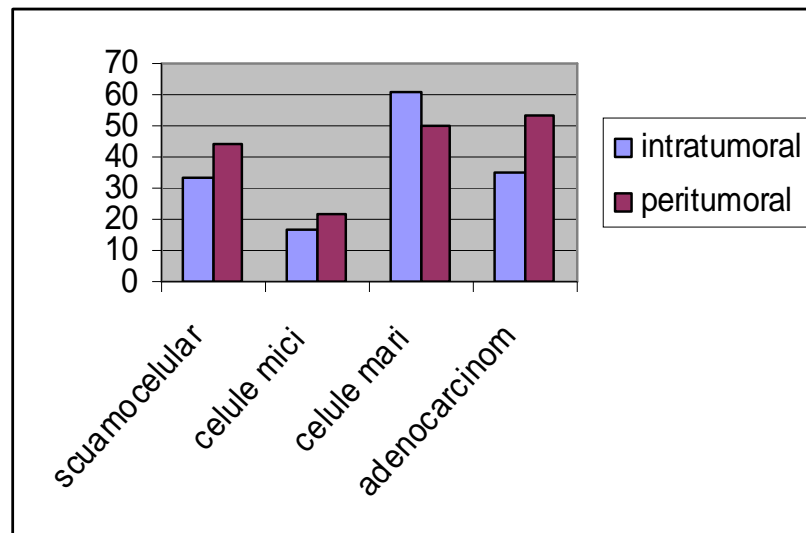
Aceste observații au fost efectuate pe secțiuni colorate cu anti-CD34, bazat pe faptul că în tumorile pulmonare și stroma tumorală, CD34 identifică selectiv numai celulele endoteliale, ceea ce facilitează numărarea vaselor sanguine. Evaluarea s-a efectuat pentru ariile intratumorală și peritumorală, alegându-se la mărire mică trei câmpuri cu densitate vasculară maximă, după metoda cunoscută sub numele de hot-spot (Weidner și colab, 1992). Media aritmetică a celor trei câmpuri a constituit rezultatul final pentru cazul respectiv. Aria intratumorală a fost definită ca zonă ocupată pe secțiune strict de către celulele tumorale dispuse compact, iar vasele au fost numărate

doar dacă au fost localizate în interiorul insulelor/plajelor de celule tumorale. Datele obținute au fost raportate comparativ pentru formele histopatologice de neoplasm pulmonar incluse în studiu și pentru țesutul pulmonar aparent normal, limitrof tumorii.

Tabel nr. 2. Raportarea valorilor MVD în funcție de forma histopatologică

Formă histopatologică	MVD Intratumoral			MVD Peritumoral		
	Max	Min	Medie	Max	Min	Medie
Carcinom scuamocelular	12	54	33	24	64	44
Carcinom cu celule mici	11	23	17	17	27	22
Carcinom cu celule mari	41	81	61	44	57	50.5
Adenocarcinom	14	56	35	21	86	53.5

Graficul nr. 1. Expresia grafică a valorilor MVD în tipurile histopatologice de tumori pulmonare evaluate.



Observațiile noastre efectuate asupra vaselor asociate tumorilor pulmonare relevă următoarele aspecte:

- CD34 este un marker cu specificitate și sensibilitate mare, util pentru calcularea MVD în aceste leziuni tumorale;
- MVD se corelează statistic semnificativ cu gradul de diferențiere și cu stadiul tumorii, dar nu cu forma histopatologică.

3.3.5. Particularități ale expresiei VEGF în carcinoamele bronhopulmonare

Am supus evaluării un număr de 42 de cazuri. Fragmentele biopsice au fost fixate și procesate primar urmând procedurile standard. Profilul histopatologic s-a realizat pe secțiuni colorate cu hematoxină-eozină. Secțiunile de la fiecare caz au fost imunocolorate, folosind anticorpi anti-VEGF-A. Deparafinarea și rehidratarea secțiunilor a fost urmată de demascarea prin căldură, automată, folosind PT link-ul (DakoCytomation, Denmark), timp de 15 minute. Soluția de demascare utilizată a avut pH 9 (DakoCytomation, Denmark). După blocarea peroxidazei endogene cu apă oxigenată 3%, a urmat incubarea cu anticorpul primar, clona VG-1, gata de folosire, (Labvision/Neomarkers, Fremont, CA, USA), timp de 30 minute la temperatura camerei. Tehnica imunohistochimică s-a bazat pe metoda avidină - biotină, folosind sistemul de lucru LSAB+ (Dako). Cromogenul folosit a fost 3, 3 diaminobenzidina, iar contracolorarea s-a realizat cu hematoxină Lille modificată. Etapele mai sus amintite au fost parcurse cu ajutorul automatului de imunohistochimie (DakoCytomation Autostainer). Imunoreacția pentru VEGF a fost evaluată în conformitate cu următorul scor: 0 (0% celule pozitive), 1 (< 10% celule pozitive), 2 (10-30%), 3 (>30%).

Cunoașterea particularităților de expresie ale VEGF în diferitele tipuri de carcinoame pulmonare poate fi utilă în abordarea viitoare a practicilor terapeutice și găsirea unor combinații optime care să permită o blocare eficientă a angiogenezei tumorale. Studiul nostru a indicat un scor maxim (3) al expresiei VEGF în adenocarcinoame, carcinoame epidermoide, hepatoid, neuroendocrine și absența acestuia în carcinoame cu celule mici și mari. În aceste ultime situații scorul VEGF a înregistrat valori între 0 și 2. Utilizarea unor medicamente care vizează secvențial diferiți factori pro-angiogenici sau combinarea medicamentelor cu mod diferit de acțiune- anticorpi monoclonali cu inhibitori ai receptorilor tirozin kinazici poate ajuta la inițierea mai eficientă a angiogenezei tumorale.

3.3.6. Expresia VEGF-C în carcinoamele bronhopulmonare

Studiul nostru a inclus un număr de 43 de cazuri. Fragmentele biopsice au fost fixate și procesate primar conform procedurilor standard. Profilul histopatologic s-a realizat pe secțiuni colorate cu hematoxină-eozină. Secțiuni de la fiecare caz au fost imunocolorate, folosind anticorpi anti- VEGF-C. Deparafinarea și rehidratarea secțiunilor a fost urmată de demascarea prin căldură, automată, folosind PT link-ul (DakoCytomation, Denmark), timp de 30 minute. Soluția de demascare utilizată a avut pH 6 (DakoCytomation, Denmark). După blocarea peroxidazei

endogene cu apă oxigenată 3%, a urmat incubarea cu anticorpii primari, clona H- 190, diluție 1:200, (Labvision / Neomarkers, Fremont, CA, USA), timp de 30 minute la temperatura camerei. Sistemul de lucru a fost reprezentat de EnVision Advance. Cromogenul folosit a fost 3, 3 diaminobenzidina, iar contracolorarea s-a realizat cu hematoxină Lille modificată. Etapele mai sus amintite au fost parcurse cu ajutorul automatului de imunohistochimie (DakoCytomation Autostainer). Imunoreacția pentru VEGF- C a fost evaluată în conformitate cu următorul scor: 0 (0% celule pozitive), 1 (< 10% celule pozitive), 2 (10-30%), 3 (>30%). Imaginile microscopice au fost preluate în format JPEG folosind programul Nikon Lucia G de analiză a imaginilor microscopice (Nikon, Tokyo, Japonia). Comitetul local de etică a aprobat protocolul studiului și consimțământul informat a fost obținut de la toți pacienții, în conformitate cu Declarația Asociației Medicale Mondiale de la Helsinki.

Am notat expresia VEGF-C cu scor maxim-3 în cazul carcinoamelor neuroendocrine (100% dintre cazuri), o pozitivare moderată pentru adenocarcinoame- 40% din totalul cazurilor incluse în studiu și apropiată de cea din adenocarcinoame 51.85% pentru cele epidermoide.

3.3.7. Expresia D2-40 în diferite tipuri histopatologice ale carcinoamelor pulmonare

Microdensitatea vasculară limfatică a prezentat valori mai mari în zona peritumorală comparativ cu aria intratumorală în adenocarcinoame și formele scuamocelulare ale carcinoamelor pulmonare. Un aspect particular a fost notat în cazul acestui ultim tip histopatologic, prezența de numeroase celule tumorale D2-40 pozitive în interiorul ariilor tumorale.

3.3.8. Evaluarea angiogenezei - indicator al heterogenității vaselor sanguine în carcinoamele bronhopulmonare

Aplicarea dublei imunocolorări CD34/ actina de tip mușchi neted a indicat o heterogenitate a vaselor tumorale pentru diferite tipuri, dar și în cadrul aceluiași tip histopatologic.

Vasele sanguine din zonele peritumorale și intratumorale sunt diferite ca și mărime, neregulate ca formă, cu numeroase ramuri. Vasele sanguine sunt dispuse în jurul celulelor tumorale, distribuite relativ uniform pe toată suprafața tumorală. Am găsit o mare variabilitate în ceea ce privește morfologia lor: dimensiuni variabile, lumene neregulate și înguste, intensă ramificare. Prezența cordoanelor și a celulelor endoteliale izolate sugerează existența angiogenezei prin mecanism de sprouting. Doar ocazional, intratumoral am observat vase sanguine cu lumen larg, cu endoteliu proeminent la lumen, un aspect care sugerează fenomenul de intususcepție. În

zona peritumorală, vasele sanguine au prezentat constant lumen larg, forme relativ regulate și au fost de obicei înconjurate de infiltrat inflamator.

Media vaselor imature și intermediare a prezentat valori aproape similare (16,66%) pentru tipurile imature în cazul adenocarcinoamelor pulmonare. Comparativ cu carcinoamele cu celule mici și adenocarcinoamele pulmonare, carcinoamele scuamocelulare au prezentat o corelație mare între numărul total de vase sanguine a tipului patologic și tipul de vase imature. De asemenea s-a observat o corelație reprezentativă cu tipul de vase intermediare dar nu a fost obținută nici o corelație cu tipul de vase mature.

5. Concluzii

1. CBP a fost diagnosticat mai frecvent la: bărbați, fumători, cu vârsta cuprinsă între 60-70 ani, cu afecțiuni preexistente (bronhopneumopatie cronică obstructivă, tuberculoză pulmonară, fibroză pulmonară, alte neoplazii), grupe considerate cu risc crescut.
2. Principalul simptom de alarmă al bolnavilor cu CBP a fost tusea (23,33%). Alte simptome cu frecvență crescută ale CBP au fost hemoptizia (16,66%) și scăderea ponderală (10%).
3. Radiografia pulmonară și examenul de spută au ridicat suspiciunea de neoplasm bronhopulmonar, confirmarea acestui diagnostic necesitând investigații suplimentare.
4. Bronhoscopia cu metodele de prelevare endobronșică (microlavajul bronșic, lavajul bronhoalveolar, biopsiile pulmonare multiple, biopsia pulmonară transbronșică) a permis diagnosticul pozitiv, histopatologic și stadializarea prechirurgicală.
5. Tomografia computerizată a fost metoda principală de diagnostic complet (pozitiv și de stadiu); net superioară radiografiei.
6. Examenul CT nativ și cu substanță de contrast are un rol esențial în diagnosticul CBP, permițând evidențierea și delimitarea corectă a tumorii, a adenopatiilor mediastinale și a eventualelor determinări secundare tumorale.
7. Dintre metodele radioimagistice tomografia computerizată permite aprecierea corectă a stadiului în care se află potențialul neoplasm bronhopulmonar, în funcție de care se stabilește atitudinea terapeutică ulterioară.
8. CBP a prezentat următoarele tipuri histologice : carcinom de tip scuamocelular (80%), adenocarcinom (11,11%), carcinom cu celule mici (11,11%), carcinom cu celule mari (8,88%).

9. Expresia VEGF-ului în diferitele tipuri de carcinoame pulmonare poate fi utilă în abordarea viitoare a practicilor terapeutice și găsirea unor combinații optime care să permită o blocare eficientă a angiogenezei tumorale.
10. Studiul nostru a indicat un scor maxim (3) al expresiei VEGF în adenocarcinoame, carcinoame epidermoide, hepatoid, neuroendocrine și absența acestuia în carcinoame cu celule mici și mari. În aceste ultime situații scorul VEGF a înregistrat valori între 0 și 2.
11. CD34 este un marker cu specificitate și sensibilitate mare, util pentru calcularea MVD în aceste leziuni tumorale.
12. MVD (microdensitatea vasculară) se corelează statistic semnificativ cu gradul de diferențiere și cu stadiul tumorii, dar nu cu forma histopatologică.
13. Cunoașterea particularităților de expresie ale VEGF în diferitele tipuri de carcinoame pulmonare poate fi utilă în abordarea viitoare a practicilor terapeutice și găsirea unor combinații optime care să permită o blocare eficientă a angiogenezei tumorale.
14. Expresia VEGF-C cu scor maxim – 3 a fost observată în cazul carcinoamelor neuroendocrine, o pozitivare moderată pentru adenocarcinoame și apropiată de cea din adenocarcinoame, 51.85% pentru cele epidermoide.
15. În carcinoamele pulmonare cu celule mari, adenocarcinoame, carcinoame scuamocelulare, carcinoame hepatoide, carcinoame cu celule mici și carcinoamele pulmonare neuroendocrine LVD, evaluată prin expresia D2-40, a arătat valori descrescătoare în aria peritumorală.
16. LVD cu valori descrescătoare în aria intratumorală a fost observată în următoarele tipuri de carcinoame pulmonare: hepatoid, carcinoame cu celule mari, carcinoame scuamocelulare, adenocarcinoame, carcinoame neuroendocrine, carcinoame cu celule mici.
17. Expresia D2-40 în celulele tumorale a fost absentă în toate cazurile de adenocarcinoame, hepatoid, carcinoamele cu celule mari.
18. Celule tumorale D2-40 pozitive, evaluate +2 au fost observate în unul din cele 3 cazuri de carcinoame cu celule mici și în carcinoamele neuroendocrine.
19. Evaluarea tipurilor de vase sanguine prin dubla imunocolorare CD 34/SMA în carcinoamele pulmonare a arătat o marcată heterogenitate.

20. Vasele imature și intermediare au fost mai frecvente în adenocarcinoame și carcinoame pulmonare scuamocelulare; carcinoamele pulmonare cu celule mici au prezentat doar vase sanguine imature.
21. Am observat o creștere progresivă a cazurilor noi de cancer (toate localizările) cu menținerea unei proporții relativ constante a cazurilor de CBP; această distribuție evidențiază frecvența crescută și constantă a CBP-ului în populație raportată la celelalte forme de cancer, fapt care motivează suplimentar acest studiu.

6. Bibliografie selectivă

1. **Aoki, T., H. Nakata, H. Watanabe, K. Nakamura, T. Kasai, H. Hashimoto, K. Yasumoto, and M. Kido.**, Evolution of peripheral lung adenocarcinomas: CT findings correlated with histology and tumor doubling time. *AJR Am J.Roentgenol*, 2000, 174:763-768.
2. **Aikawa H, Takahashi H, Fujimura S, Sato M, Endo C, Sakurada A, Kondo T, Tanita T, Matsumura Y, Ono S, Saito Y, Sagawa M.**, Immunohistochemical study on tumor angiogenic factors in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res.* 1999; 19(5B):4305-9.
3. **Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA.**, Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Cell Biol*, 1998, 95: 548–553.
4. **Bogdan MA.**, Pneumologie, Editura Universitară „Carol Davila”, București 2008.
5. **Baluk P, Morikawa S, Haskell A, Mancuso M, McDonald DM.**- Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol.*, 2003, 163(5):1801-15
6. **Bremnes R M, Carlos Camps, Rafael Sirera,** Angiogenesis in non-small cell lung cancer: The prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood, *Lung Cancer*, 2006, 51 (2): 143-158.
7. **Bild E, Miron L.** Terapia cancerului: ghid practic. Elemente fundamentale de diagnostic și tratament multimodal, Editura Tehnopress, Iași, 2003, 72-94.

8. **Brychtova S, Bezdekova M, Brychta T, Tichy M.**, The role of vascular endothelial growth factors and their receptors in malignant melanomas. *Neoplasma*, 2008, 55(4):273-279.
9. **Folkman J** - Antiangiogenesis: new concept for therapy of solid tumors, *Ann Surg*, 1972, 175: 409–16 .
10. **Furuya, K., S. Murayama, H. Soeda, J. Murakami, Y. Ichinose, H. Yabuuchi, Y. Katsuda, M. Koga, and K. Masuda**, New classification of small pulmonary nodules by margin characteristics on high-resolution CT. *Acta Radiol*, 1999, 40:496-504.
11. **Li X, Zhang Q, Lu B, Qiu X, Luo Y, Zhang W, Xu S**, Expression of DLL4 and VEGF in Lung Adenocarcinoma and their Relationship with Angiogenesis in Tumor, *Zhongguo Fei Ai Za Zhi.*, 2009, 12(2):117-121.
12. **Marius Raica, Irina Draga Căruntu, Anca Maria Cîmpeanu, Cristian Suci**, *Histologia organelor, curs pentru studenți*, Lito UMF “Victor Babeș”, Timișoara, 2009
13. **Xufeng Guo, Yongbing Chen, Zhonghua Xu, Zhonghen Xu, Yongyue Qian, and Xueyan Yu**, Prognostic significance of VEGF-C expression in correlation with COX-2, lymphatic micro vessel density, and clinicopathologic characteristics in human non-small cell lung cancer, *Acta Biochim Biophys Sin* (2009): 217–222.
14. **Zaharia C, Țârlea A, Lupescu I, Georgescu Ș.**, *Diagnosticul imagistic al cancerului bronhopulmonar*. Ed. Universal, București, 2000, 90-158.
15. **Zhang BC, Gao J, Wang J, Rao ZG, Wang BC, Gao JF.** - Tumor-associated macrophages infiltration is associated with peritumoral lymphangiogenesis and poor prognosis in lung adenocarcinoma, *Med Oncol*. 2011, 28(4):1447-1452.
16. **Zhao YY, Xue C, Jiang W, Zhao HY, Huang Y, Feenstra K, Resau JH, Qian CN, Zhang L.** - Predictive value of intratumoral microvascular density in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving chemotherapy plus bevacizumab, *J Thorac Oncol.*, 2012, 7(1): 71-75.

