

L. Șaptefrați¹, V. Mazuru², V. David², T. Globa²
TRANZIȚIA EPITELIO-MEZENCHIMALĂ ÎN NEOPLAZIA DE COL UTERIN

Catedra Histologie, Citologie și Embriologie, USMF „Nicolae Testemițanu” (1),

Laboratorul Morfologie, USMF „Nicolae Testemițanu” (2)

Chișinău, Republica Moldova

SUMMARY

EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN CERVICAL NEOPLASTIC

Keywords: tumor cells, carcinoma, immunohistochemistry, cervix, epithelial-mesenchymal transition.

In this work studied tissue taken using biopsy and cervical conization in patients with abnormal epithelial organ sites identified macroscopically. The lesions were classified as follows: CIN1 (n=17), CIN2 (n=11), CIN3 (n=7), microinvasive carcinoma (n = 10) and invasive carcinoma (n = 49). As a control (n = 5) were studied conization of the cervix intact (normal) histological. Immunohistochemical study was applied to the identification of epithelial cells and cells of mesenchymal origin. Epithelial cells were identified using polyclonal antibodies AE1/AE3 clone AE1/AE3, mesenchymal cells origin, respectively using anti-vimentin antibodies clone V9. In patients with microinvasive carcinoma and invasive carcinoma of the cervix in the area of infestation was found vimentin-expression and lack of expression on tumor cells AE1/AE3.

РЕЗЮМЕ

ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЙ ПЕРЕХОД В НЕОПЛАСТИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЯХ ШЕЙКИ МАТКИ

Ключевые слова: опухолевые клетки, карцинома, иммуногистохимия, шейка матки, эпителиально-мезенхимальный переход.

В настоящей работе были изучены ткани взятые при помощи прицельных биопсий и конизаций шейки матки у пациенток с патологическими участками эпителия органа, выявленных макроскопически. Поражения были классифицированы следующим образом: CIN1 (n=17), CIN2 (n=11), CIN3 (n=7), микроинвазивная карцинома (n=10) и инвазивная карцинома (n=49). В качестве контроля (n=5) были изучены конизации шейки матки с неизменной (нормальной) гистологической картиной. Было применено иммуногистохимическое исследование с идентификацией эпителиальных клеток и клеток мезенхимального происхождения. Эпителиальные клетки были выявлены при помощи поликлональных антител AE1/AE3 клон AE1/AE3, клетки мезенхимального происхождения – соответственно при помощи антител анти-виментина клон V9. У пациенток с микроинвазивной карциномой и инвазивной карциномой шейки матки в зоне инвазии была выявлена экспрессия виментина и отсутствие экспрессии AE1/AE3 опухолевых клеток.

Introducere. Cancerul de col uterin până în prezent rămâne o problemă din punctul de vedere al particularităților lui biologice, factorilor moleculari de prognostic și terapie țintită. Incidența acestei tumore, mai ales când vorbim despre leziunile invazive, a fost redusă drastic în multe țări prin introducerea programelor de screening.

În pofida celor expuse, în literatura de specialitate există puține date despre markerii moleculari și valoarea lor predictivă în carcinomul de col uterin. Imunohistochimic, celulele carcinomului de col uterin pot fi identificate cu aceiași markeri ca și în CIN, fiind pozitive pentru CK13, dar și CK8 și CK18 [1]. În diagnosticul cancerului de col uterin este foarte util cocktailul de anticorpi policlonali pancitokeratina AE1/AE3. În acest tip de pancitokeratină, AE1 con-

ține CK1, CK2, CK4, CK5, CK6 și CK8, iar AE3 respectiv CK9, CK10, CK14, CK15, CK16 și CK19. Un astfel de cocktail de anticorpi este de o mare sensibilitate și largă specificitate, ceea ce permite confirmarea originii epiteliale a tumorii.

Imunohistochimic au fost investigați atât markeri ce confirmă diferențierea celulelor scuamoase cât și markeri corelați cu evoluția și prognosticul tumorilor. Drept markeri ai gradului de diferențiere al celulelor scuamoase neoplazice sunt utilizate citokeratinele și involucrina, expresia lor corelându-se în mare parte cu diferențierea celulară. Involucrina poate fi identificată în marea majoritate a carcinoamelor scuamoase [2]. CK cu greutate moleculară mare (4, 5, 6, 8, 13, 14, 16, 17, 18, 19) sunt pozitive în carcinoamele scuamoase keratinizate bine diferențiate, în timp ce carcinoamele

nekeratinizate exprimă CK 6, 14, 17, 19 și ocazional CK 4, 5, 6, 8, 10, 13, 16 și 18 [2]. În acest context este clar că celulele carcinomului scuamos frank invaziv (CSFI) vor exprima pancitokeratina AE1/AE3.

Determinarea moleculelor de adeziune a demonstrat pierderea expresiei lor în formele agresive ale carcinoamelor cervicale. Mai multe studii au arătat pierderea expresiei E-cadherinelor în leziunile preinvazive și în carcinoamele scuamoase cervicale, dar semnificația acestui fenomen a rămas încă neclară [3]. Prezintă interes și expresia vimentinei de către celulele tumorale. Dacă celulele tumorale exprimă vimentina (proteina filamentelor intermediare ale celulelor de proveniență mezenchimală) avem argumente de a vorbi despre tranziția epitelio-mezenchimală a celulelor tumorale în carcinomul scuamocelular de col uterin.

Material și metodă. *Specimenele și procesarea primară.* În studiul prezent au fost prelevate și incluse biopsiile țintite din leziuni evidente macroscopic și piesele de conizație. Biopsiile au fost prelucrate după tehnica histologică uzuală, fixate în formalină și incluse în parafină.

Histopatologie. Din fiecare bloc au fost efectuate secțiuni în serii cu grosimea de 3 μm grosime. Secțiunile inițiale au fost colorate prin metoda hematoxilină-eozină pentru diagnosticul patologic și stabilirea gradului de diferențiere al tumorii. Leziunile au fost clasificate după cum urmează: CIN1 (cervical intraepithelial neoplasia) (n=17), CIN2 (n=11), CIN3 (n=7), carcinom microinvaziv (n=10) și carcinom invaziv (n=49). Cazurile control (n=5) au fost reprezentate de speciamele normale rezultate în urma procedurii de conizație. La subgrupele de carcinom microinvaziv și invaziv, gradul de diferențiere (G) a fost: G1 la 29 cazuri, G2 la 22 cazuri și G3 la 8 cazuri.

Imunohistochimie. Pentru evidențierea celulelor de proveniență mezenchimală secțiunile au fost incubate timp de 30 minute cu anticorpii primari anti-vimentină clona V9, DakoCytomation (Danemarca). Am folosit tehnica imunohistochimică avidin biotină cu utilizarea sistemului de lucru LSAB+. Drept control pozitiv intern au fost considerate celulele vimentin pozitive ale stromei conjunctive. Nucleii au fost colorați cu hematoxilină Lille modificată. Întreaga procedură imunohistochimică a fost executată cu ajutorul DakoCytomation Autostainer. Pentru evidențierea epitelului colului uterin timp de 30 minute a fost aplicat anticorpii policlonal primar AE1/AE3 clona AE1/AE3, DakoCytomation (Danemarca). Drept control pozitiv intern a fost considerat imunomarcajul pozitiv al epitelului stratificat al exocolului, dar și al epitelului simplu columnar al endocolului. Examinarea microscopică și obținerea imaginilor s-a efectuat cu microscopul Nikon Eclipse E600, imaginile microscopice fiind capturate în formatul JPEG.

Rezultate. *Specificitatea AE1/AE3 și vimentinei.* În speciamele normale de col uterin produsul final al

reacției AE1/AE3 a fost exprimat difuz citoplasmatic la nivelul straturilor intermediar și superficial (moderat pozitiv) ale epitelului stratificat scuamos. În fantele endocervixului produsul reacției era restricționat la nivelul polului bazal al epitelului simplu columnar. Vimentina se exprima în celulele stromei conjunctive, dar și în endoteliul vaselor sangvine cu patern citoplasmatic.

Leziunile precursorale ale cervixului uterin. Pe măsura sporirii severității CIN, expresia AE1/AE3 era mai pronunțată. Astfel, în CIN1 doar o parte din celulele epiteliale ale exocervixului exprimau difuz citoplasmatic markerul AE1/AE3, pentru ca în CIN2-3 toate straturile epitelului să fie pozitive pentru acest imunomarcaj. În leziunile precursorale ale cervixului uterin expresia vimentinei de către celulele stromale nu a prezentat particularități.

Carcinoamele microinvazive și invazive de col uterin. În toate cazurile de carcinoame scuamocelulare microinvazive și invazive celulele tumorale exprimau markerul AE1/AE3 cu pattern difuz sau mixt. În carcinoamele microinvazive invazia se realiza sub formă de cordoane subțiri, care pătrundeau în stromă, sau sub formă de masă compactă infiltrativă. În cazul invaziei celulelor tumorale în fantele endocervixului, epitelul acestuia exprima mai intens markerul AE1/AE3 pe tot teritoriul citoplasmei.

Remarcăm faptul că în aria de invazie a tumorii expresia AE1/AE3 avea un pattern focal. Noi am definit patternul focal drept cuiburi de celule tumorale pozitive printre straturile de celule tumorale, care nu exprimă sau exprimă slab markerul. Concomitent, în aceste cazuri, celulele tumorale exprimau vimentina. Expresia slabă a AE1/AE3 în ansamblu cu imunomarcajul pozitiv pentru vimentină de către aceste celule poate fi explicată prin pierderea fenotipului epitelial și achiziția fenotipului mezenchimal. În contrast, embolii vasculare de celule tumorale aveau un imunomarcaj intens pozitiv pentru AE1/AE3 și negativ pentru vimentină, caracteristic ariilor centrale ale tumorii.

Discuții. Markerul determinat de noi prin reacții imunohistochimice – pancitokeratina AE1/AE3, reprezintă un „coctail” de citokeratine în care AE1 include CK 1, 2, 4, 5, 6 și 8, iar AE3 cuprinde CK 9, 10, 14, 15, 16 și 19. Conform datelor obținute, expresia pancitokeratinei AE1/AE3 este mai pronunțată în leziunile preneoplazice severe ale colului uterin comparativ cu leziunile moderate sau cu epitelul normal al exocervixului. Mai mult, expresia acestui marker (cu pattern difuz) în carcinoamele scuamocelulare microinvazive și invazive a fost pronunțată în toate cazurile. Se pare că amplificarea expresiei pancitokeratinei AE1/AE3 pe măsura sporirii severității neoplaziei de col uterin se produce pe contul supraexpresiei CK 8/18, 19, dar mai ales a CK 5 [4]. Reieșind din aceste date, considerăm rațională și oportună utilizarea pancitokeratinei AE1/AE3

pentru diferențierea carcinomului scuamos cu celule fuziforme (carcinomul sarcomatoid) de tumorile de origine mezenchimală – leiomiom sarcom, fibrosarcom, rhabdomiosarcom.

După cum am stabilit prin cercetarea electronoptică [5], invazia tumorală este însoțită de modificări morfologice ale celulelor canceroase: formarea microfaldurilor polimorfe sau sferice, pierderea polarizării epiteliale și adezia celulară la componentele proteolizate ale ECM. Astfel, celulele tumorale din zona ariei de invazie pierd fenotipul epitelial și achiziționează fenotipul mezenchimal. Mai mult, în paralel cu expresia pronunțată a pancitokeratinei AE1/AE3 de către celulele tumorale situate în „miezul tumorii” am observat expresia doar focală a acestui marker de către celulele maligne din aria de invazie a tumorii, aceste celule exprimă slab sau deloc pancitokeratina AE1/AE3. Acest lucru se produce în paralel cu sporirea numărului de celule vimentin pozitive și α -SMA-pozitive în insulele tumorale din ariile de invazie [6]. Rezultatele noastre sunt confirmate de datele lui Lee M.Y. și colab. (2008) [7]. Astfel, există argumente suficient de convingătoare de a vorbi despre tranziția epitelio-mezenchimală în cazul cancerului de col uterin. Are loc pierderea polarității de către celulele epiteliale neoplazice și transformarea lor în celule mobile mezenchimal-like, apte de a invada țesuturile locale și de a metastaza în organele secundare [8].

Tranziția epitelio-mezenchimală (EMT) reprezintă un proces morfogenetic în urma căruia celulele epiteliale neoplazice achiziționează fenotipul mezenchimal. Astfel, celulele epiteliale tumorale devin mobile, obțin abilitatea de invazie, de penetrare a patului vascular și de diseminare la distanță (de metastazare). La momentul actual, se cunoaște foarte puțin despre EMT în cancerul de col uterin. Conform opiniei lui Lee M.Y. și colab. (2008), fenomenul EMT în cancerul de col uterin se produce drept urmare a supraexpresiei receptorului factorului de creștere epidermal (EGFR) [7]. Activarea acestui receptor de către liganzii săi sporește transcripția factorului Snail (inhibitorul transcripției E-cadherinei) și acumularea acestuia în nucleu. Drept urmare, este inhibată expresia E-cadherinei și indusă expresia vimentinei. Dacă această ipoteză este veridică, devine clar că blocarea activității și/sau expresiei EGFR ar fi o țintă terapeutică de perspectivă în vederea stopării progresiei cancerului de col uterin.

După cum am menționat mai sus, doar celulele tumorale din ariile de invazie a tumorii exprimau vimentina. Astfel, emitem ipoteza că fenotip mezenchimal au doar celulele tumorale din aceste arii (frontul de invazie al tumorii). Aceste celule fac parte din subclona celulelor ghid, restul celulelor tumorale vor exprima markeri epiteliali.

Concluzii

1. Pe măsura sporirii severității CIN, expresia AE1/AE3 este mai pronunțată. Astfel, în CIN 1 doar o parte din celulele epiteliale ale exocervixului exprimă difuz citoplasmatic markerul AE1/AE3, pentru ca în CIN 2-3 toate straturile epitelului să fie pozitive pentru acest imunomarcaj.

2. Expresia uniformă a markerului AE1/AE3, indiferent de tipul histopatologic al cancerului, este utilă pentru diferențierea carcinomului scuamos cu celule fusiforme (carcinomul sarcomatoid) de tumorile de origine mezenchimală – leiomiom sarcom, fibrosarcom, melanom desmoplazic.

3. În ariile de invazie a tumorii celulele tumorale nu exprimă sau exprimă slab markerul AE1/AE3. În schimb, celulele tumorale din ariile vizate exprimă în majoritatea cazurilor (59,7%) vimentina.

Bibliografie

1. **Simionescu C. și al.** Patologia colului uterin. Craiova: Med. Univ., 2009, 430p.

2. **Smedts F. et al.** Keratinexpression in cervical cancer. In: Am J Pathol. 1992, vol. 141, nr. 2, p. 497-511.

3. **Branca M. et al.** HPV-Pathogen ISS Study Group. Down-regulation of E-cadherin is closely associated with progression of cervical intraepithelial neoplasia (CIN), but not with high-risk human papillomavirus (HPV) or disease outcome in cervical cancer. In: Eur J Gynaecol Oncol. 2006, vol. 27, nr. 3, p. 215-223.

4. **Moll R., Divo M., Langbein L.** The human keratins: biology and pathology. In: Histochem Cell Biol. 2008, vol. 129, nr. 6, p. 705-733.

5. **Șaptefrați L., Iakovleva I., Cernii A., Cernii T.** Particularitățile electronomicroscopice ale stromei conjunctive și ale joncțiunii epitelio-stromale în neoplaziile colului uterin. În: Actualități în diagnosticul și tratamentul contemporan al tumorilor organelor reproductive la femei. Simpozion național dedicat memoriei profesorului I. V. Bohman. Chișinău, 2008, p. 48-50.

6. **Șaptefrați L., Cernii A., Mazuru V.** Expresia actinei mușchiului neted alfa (A SMA) în neoplazia de col uterin. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe medicale. Chișinău, 2010, nr. 4 (27), p. 66-70.

7. **Lee M.Y. et al.** Epithelial-mesenchymal transition in cervical cancer: correlation with tumor progression, epidermal growth factor receptor over expression, and snail up-regulation. In: Clin Cancer Res. 2008, vol. 14, nr. 15, p. 4743-4750. (133)

8. **Cernii A., Iacovlev I., Bogdanscaia N., Cernii T. Doicov N., Chemencedji I., Caraman I., Șaptefrați L.** Tranziția epitelio-mezenchimală în carcinoame: date proprii și din literatură. În: Buletinul informațional al Societății Științifico-Practice a Oncologilor din Republica Moldova. Chișinău, 2011, vol.1 (1), p. 83-90.

Recepționat 10.10.2013