

# IDENTIFICAREA ȘI DENSITATEA VASELOR LIMFATICE DIN PIELEA BOLNAVIILOR CU SCLERODERMIE SISTEMICĂ

## *Cutaneous lymphatic vessels in systemic sclerosis (scleroderma)*

Dr. Gabriela Ieremia, Prof. D. Raica

*Secția de Reumatologie, Spitalul Județean de Urgență „Dr. C. Oprea”, Baia-Mare și Catedra de Histologie, Universitatea de Medicină și Farmacie, Timișoara*

### REZUMAT

Datele existente asupra vaselor limfatice și limfangiogenezei în pielea bolnavilor cu sclerodermie sunt foarte limitate și nu au elucidat mecanismele și semnificația acestui fenomen.

**Material și metode:** Studiul a fost efectuat pe biopsii de piele sclerodermică de la 31 de pacienți cu leziuni cutanate de sclerodermie sistemică (SDS). În protocolul de lucru s-au inclus câte 3 cazuri control extern, alegând organe care conțin cu certitudine vase limfatice: timus normal și carcinom colorectal. Pentru evaluarea vaselor limfatice s-a ales ca marker podoplanina, după tehnica optimizată în Laboratorul de Imunohistochimie al Universității de Medicină și Farmacie din Timișoara și certificată de către Abcam.

**Rezultate:** La 65% dintre cazurile de SD s-a remarcat prezența a numeroase vase limfatice pozitive pentru podoplanină în aria cu colagenizare masivă, ocazional prezența de aglomerări de vase cu lumen redus sechestrare în dermul papilar. În dermul reticular, vasele au fost numeroase în aria unităților secretorii ale glandelor sudoripare. La 35% dintre cazuri s-au remarcat aspecte particulare, inclusiv fenomene de remodelare tardivă a vaselor limfatice dermice. Microdensitatea vaselor limfatice (LMVD), calculată după metoda Weidner, a arătat o inversiune a mediei aritmetice comparativ cu cazurile control și în raport cu vasele sanguine.

**Concluzii:** Studiul vaselor limfatice la pacienții cu SD relevă o densitate mai mare comparativ cu densitatea vaselor sanguine. Creșterea numerică este probabil tranzitorie și este o consecință a remodelării plexurilor limfatice dermice, consecutivă depleției de vase sanguine.

**Cuvinte cheie:** sclerodermie sistemică, vase limfatice, limfangiogenază, podoplanină

### SUMMARY

The existing data about the lymphatic vessels and lymphangiogenesis in the skin of patients with systemic sclerosis (SS) (scleroderma) are very limited and have not explained the mechanisms and the signification of this phenomenon.

**Material and methods:** The study was made on cutaneous biopsies taken from 31 patients with suggestive skin lesions for SS. In the working procedures one has included three cases of external control, choosing organs that have surely lymphatic vessels: normal thymus and colorectal carcinoma. For the evaluation of the lymphatic vessels one has chosen the podoplanin marker using the technique of the Laboratory of Immunohistochemistry of the University of Medicine and Pharmacy Timișoara and certified by Abcam.

**Results:** In 65% of the SS patients one has remarked the presence of many lymphatic vessels positive for podoplanin in the area with massive collagenisation. Occasionally the congestion of vessels with small lumen, kept in the papillary dermis has been observed. In the reticular dermis, the vessels were many in the area of secretor units of the sudoripareous glands. In 35% of the cases one could notice particular aspects, inclusive phenomena of late remodelling of the dermal lymphatic vessels. The micro-vascular density of the lymphatics (LMVD) was calculated after the Weidner method that has shown an inversion of the arithmetic average in comparison with the control cases and blood vessels.

**Conclusions:** The study of the lymphatic vessels at the patients with scleroderma shows a higher density in comparison to the density of blood vessels. The numeric growth is probably transitory and is a consequence of the demodulation of the dermal lymphatic plexus, consequently to the blood vessels depletion.

**Key words:** systemic sclerosis, scleroderma, lymphatic vessels, lymphangiogenesis, podoplanin

Address for correspondence:

Dr. Gabriela Ieremia, Spitalul Județean de Urgență „Dr. C. Oprea”, Str. George Coșbuc Nr. 31, Baia Mare

Studiul vaselor limfatice prin metodele de biologie moleculară a început tardiv în comparație cu cercetările asupra vaselor sanguine. Principalul motiv a fost reprezentat de absența unor markeri de mare specificitate ai endoteliului limfatic, primele încercări în acest sens, bazate pe ultrastructură și identificarea 5 nucleotidazei nefiind aplicabile de rutină. Abia după anul 1999, odată cu descoperirea primului marker specific pentru endoteliul limfatic (1), au fost publicate primele studii asupra limfangiogenezei, dar referirile s-au limitat la evaluarea vaselor limfatice din boala neoplazică. În ciuda eforturilor întreprinse până în prezent, originea celular-tisulară și dezvoltarea sistemului limfatic nu sunt cu certitudine cunoscute. În ceea ce privește originea, rămân cele două postulate formulate în urmă cu 100 de ani de Sabin și Huntington, dar fără dovezi certe ale existenței unui precursor denumit limfangioblast, sau asupra înmuguririi vaselor limfatice din venulele post-capilare (2). Așa cum era de așteptat, majoritatea cercetărilor au fost axate asupra limfangiogenezei din tumorile maligne, cele mai multe articole semnalând corelația dintre numărul de vase limfatice și riscul dezvoltării metastazelor (3, 4). Markerii endoteliului limfatic au suscitad numeroase controverse în ceea ce privește sensibilitatea și specificitatea. Cei mai bine caracterizați sunt Lyve-1, podoplanina, *VEGFR-3*, desmoplakina și Prox-1 (5). Datele referitoare la vascularizația limfatică în pielea pacienților cu sclerodermie, boală în care interesarea cutanată este primordială și domină de cele mai multe ori tabloul clinic, sunt sporadice și neconcludente, motiv pentru care am abordat acest aspect.

## MATERIAL ȘI METODE

Studiul a fost efectuat pe 31 de pacienți cu sclerodermie sistemică (SDS) leziuni macroscopice cutanate caracteristice de scleroză cutanată. Au fost incluși în studiu doar bolnavii care au acceptat efectuarea biopsiei cutanate.

Pentru evaluarea vaselor limfatice la pacienții cu SDS, pe lângă cazurile de investigat am inclus în protocolul de lucru câte 3 cazuri control extern, alegând organe care cu certitudine conțin vase limfatice: timus normal și carcinom colorectal. Alegerea markerului pentru studiul vaselor limfatice din sclerodermie implică o serie de dificultăți tehnice și de interpretare, aspecte confirmate deja

și de alți autori (6). Dificultățile tehnice constau în primul rând din standardizarea metodei, deoarece protocoalele de lucru variază foarte mult de la un laborator la altul. Având în vedere spectrul de sensibilitate și specificitate al acestor markeri, asociat patologiei investigate, am ales podoplanina pentru evaluarea vaselor limfatice dermice de la pacienții cu sclerodermie, după tehnica optimizată în Laboratorul de Imunohistochimie al Universității de Medicină și Farmacie din Timișoara și certificată de către Abcam (7).

Podoplanina este o proteină care reglează filtrarea glomerulară și a fost identificată inițial în podocite sub forma unei proteine de membrană. Ulterior s-a demonstrat specifică pentru endoteliul vaselor limfatice din numeroase organe normale, inclusiv pielea, rinichiul și plămânul. Expresia podoplaninei coexistă cu *VEGFR3*, cel mai puternic inductor al limfangiogenezei (8).

Secțiunile de la cazurile control au fost prelucrate în același timp și în aceeași manieră ca și biopsiile cutanate, utilizând protocolul optimizat în laborator.

Tehnica de lucru a constat din următorii timpi:

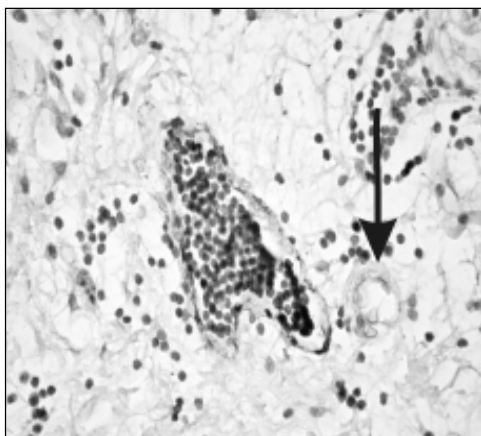
- deparafinarea și hidratarea standard a secțiunilor;
- demascarea antigenului la microunde timp de 10 minute în soluție tampon citrat pH6, urmată de răcire în baie de tampon 20 de minute;
- blocarea peroxidazei endogene cu hidrogen peroxid 3% 5 minute, spălate cu apă distilată și apoi cu tampon fosfat timp de 5 minute;
- incubarea cu anticorp primar anti-podoplanină în diluție de 1:500, timp de 60 de minute la temperatura camerei, spălare cu tampon;
- aplicarea sistemului *CSA (Catalyzed System Amplification)*;
- vizualizarea produsului final de reacție cu diaminobenzidină, colorare nucleară cu hematoxilină Lillie, deshidratare, clarefiere și montare cu balsam de Canada.

În interpretare au fost luate în considerație structurile cu lumen care au prezentat endoteliu colorat în brun, iar numărarea lor s-a efectuat după metoda Weidner. Rezultatele obținute la cazurile cu sclerodermie au fost comparate cu cele obținute pentru MVD pe secțiuni colorate cu anti-CD31.

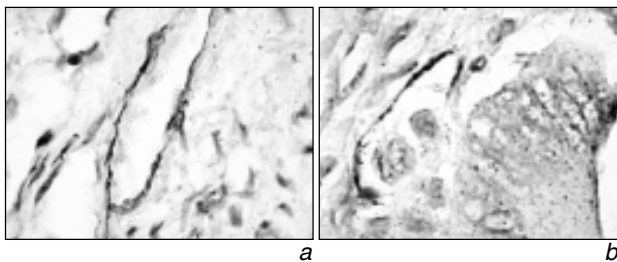
## REZULTATE

Am examinat în primul rând preparatele control extern, reprezentate de specimene de timus normal și de carcinom colorectal. Toate secțiunile de timus

normal au prezentat vase cu endoteliu pozitiv pentru podoplanină, care conțineau în lumen numeroase limfocite, reprezentând vasele limfatice eferente ale parenchimului (figura 1). Vasele sanguine din imediata vecinătate au fost negative, ceea ce semnaleză specificitatea markerului ales. La cazurile de timus nu s-a colorat nici un alt element celular din parenchim sau țesutul de susținere. La toate cazurile cu carcinom colorectal am observat prezența de vase pozitive la nivel endotelial pentru podoplanină. Acest aspect a fost evident în țesutul normal limitrof tumorii, unde vasele au avut structură normală, lumen larg și ușor neregulat (figura 2a), precum și în aria tumorală unde vasele podoplanin-pozitive au fost localizate în imediata vecinătate a celulelor neoplazice sau chiar prezente în lumenul vasului (figura 2b).



**Figura 1.** Timus normal, capsulă. Vas limfatic eferent cu endoteliu colorat cu podoplanină, prezentând în lumen numeroase limfocite negative. Vasul sanguin (săgeată) are endoteliu negativ. Imunoreacție pentru podoplanină, x400.

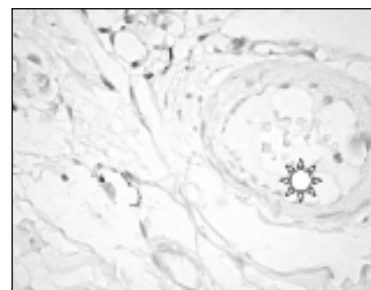


**Figura 2.** Control pozitiv extern, carcinom colorectal. Vas limfatic din submucoasa normală limitrofă tumorii (a). Vas limfatic la limita proliferării tumorale, cu lumen discontinuu și celule neoplazice izolate prezente în lumen (b). Imunoreacție pentru podoplanină, x400.

Pe secțiunile de piele provenite de la pacienții cu SDS, primele observații le-am efectuat asupra criteriilor de identificare a vaselor limfatice, asupra sensibilității și specificității anticorpului utilizat. Studiul vaselor limfatice de la cazurile control de biopsii cutanate a relevat prezența de vase de di-

mensiuni variabile, cu endoteliul colorat continuu sau discontinuu, care nu au prezentat elemente figurate în lumen; vasele sanguine din imediata lor vecinătate nu au avut endoteliu colorat (figura 3).

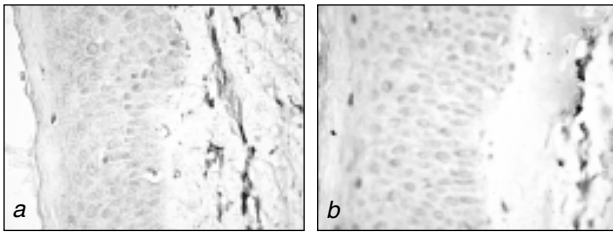
**Figura 3.** Vase limfatice podoplanin-pozitive și vas sanguin negativ (asterix). Imunoreacție pentru podoplanină, x400.



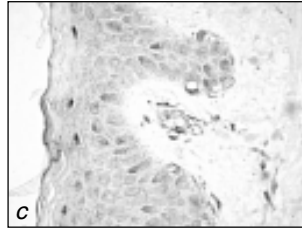
Criteriile morfologice luate în considerație pentru definirea și numărarea vaselor limfatice au fost: lumen relativ larg, ușor de identificat, contur neregulat, absența elementelor figurate din lumen, absența celulelor perivasculare și endoteliu pozitiv pentru podoplanină. Din cauza faptului că nu există în prezent publicații asupra distribuției vaselor limfatice la pacienții cu sclerodermie, am analizat expresia podoplaninei la cazurile control în termenii sensibilității și specificității. Vase podoplanin-pozitive au fost prezente la toate cazurile, dar morfologia și distribuția lor au fost variabile. Cele mai numeroase, dar cu lumen relativ îngust și aparent septat în secțiune longitudinală au fost observate în dermul papilar. Podoplanina nu are specificitate absolută pentru endoteliul limfatic, aspect semnalat și de alți autori. În piele colorează și o subpopulație de fibroblaste/-cite, care ar putea în unele cazuri îngreuna aprecierile numerice. Din acest motiv au fost luate în considerație doar vasele cu lumen în stabilirea densității microvasculare limfatice.

La 65% dintre cazurile cu sclerodermie am remarcat prezența a numeroase vase limfatice, pozitive pentru podoplanină în aria cu colagenizare masivă. Acest aspect a fost însă defalcat în cazuri care au prezentat vase limfatice în imediata vecinătate a epitelului de acoperire (figura 4a) și cazuri la care între epiderm și vasele limfatice s-a interpus o masă amorfă slab hematoxilinofilă, tipică pentru sclerodermie (figura 4b). Ocazional, la aceste cazuri am observat prezența unor aglomerări mici de vase cu lumen redus, sechestrare în dermul papilar (figura 4c).

Numai la periferia ariei caracterizată prin colagenizare masivă, demonstrată la reacția Masson și lipsită de fibre de reticulină, am remarcat prezența de vase limfatice cu structură și densitate aparent normală (figura 5a). În dermul reticular vasele limfatice au fost numeroase în special în



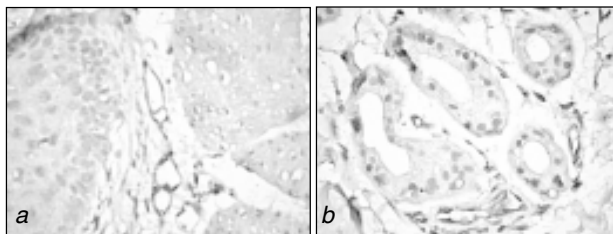
**Figura 4.** Sclerodermie. Vase limfatice localizate în imediata vecinătate a epidermului (a). Vase limfatice localizate la distanță de epiderm, între ele interpunându-se o masă amorfă hematoxilinofilă (b). Aglomerare de vase limfatice sechestrate în dermul papilar (c). Imunoreacție pentru podoplanină, x400.



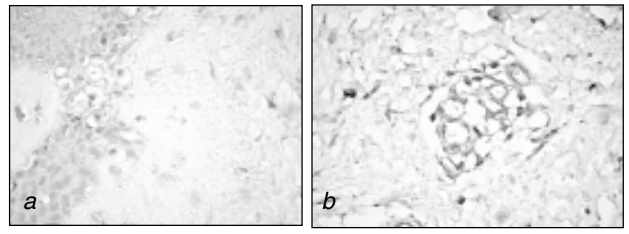
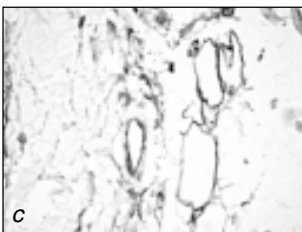
aria unităților secretorii ale glandelor sudoripare (figura 5b) și au fost numeroase, cu lumen larg și neregulat în țesutul celular subcutanat (figura 5c).

La 35% dintre cazurile cu SDS am remarcat existența a două aspecte particulare. Primul se referă la absența vaselor pozitive pentru podoplanină pe arii extinse, care se suprapun cu depozitele amorfe de proteine de tip collagen demonstrate histochimic (figura 6a). Cel de-al doilea constă din aglomerări de vase pozitive pentru podoplanină, care au fost observate la 8 cazuri atât în dermul papilar, cât și cel reticular, cu distribuție focală, alternând cu zone întinse de collagenizare (figura 6b și c). Aceste structuri sunt similare cu cele menționate la capitoul anterior, amintind corpii glomeruloizi aflați în fază tardivă de evoluție. Considerăm că acest aspect este secundar depleției de vase sanguine și că este un fenomen de remodelare tardivă a vaselor limfatice dermice.

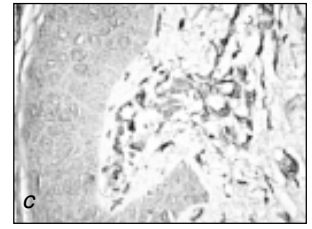
Microdensitatea vaselor limfatice (LMVD) a fost calculată după metoda Weidner și am constatat că la cazurile cu sclerodermie apare o inversiune a me-



**Figura 5.** Sclerodermie. Vase limfatice de la periferia plăcii sclerodermiforme (a). Numeroase vase limfatice printre unitățile secretorii ale glandelor sudoripare (b). Vase limfatice în țesutul celular subcutanat (c). Imunoreacție pentru podoplanină, x400.



**Figura 6.** Depleție de vase limfatice pe arie întinsă din dermul papilar și reticular (a). Structură glomeruloasă în dermul reticular (b). Structură glomeruloasă în dermul papilar (c). Imunoreacție pentru podoplanină, x400.



diei aritmetice în comparație cu cazurile control și în raport cu vasele sanguine. Rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 1. Din datele obținute se constată diferențe semnificative între valorile MVD și LMVD la cazurile control și la cele cu sclerodermie. Dacă la cazurile control raportul dintre vasele sanguine și cele limfatice a fost de 4,58, la cele cu sclerodermie acest raport a avut valoarea de 0,51, diferența având înalt grad de semnificație.

**Tabelul 1.** Densitatea microvaselor limfatice identificate cu podoplanină și a vaselor sanguine identificate cu CD31 (3 hot spot, x200)

Specimen	MVD-CD31	LMVD-podoplanină
Timus normal	–	4,2
Carcinom colorectal	–	23,75
Piele-control	38,22	8,33
Piele sclerodermie	7,36	14,34

## DISCUȚII

Observațiile pe preparatele colorate cu metodele convenționale și imunohistochemic cu markeri endoteliali au relevat prezența la cazurile cu sclerodermie a unor vase cu contur neregulat, lumen larg, fără elemente figurate și absența celulelor perivascularare. Aceste vase nu s-au colorat cu markerii specifici ai endoteliului, motiv pentru care am presupus că reprezintă vase limfatice.

Având în vedere spectrul de specificitate și sensibilitate a markerilor endoteliului limfatic (LYVE-1, podoplanina, VEGFR-3, desmoplakina, Prox-1), am ales podoplanina pentru evaluarea vaselor limfatice dermice la pacienții cu sclerodermie.

Podoplanina este o mucoproteină membranară de 43 kDa, descoperită pentru prima dată în podocitele renale, de unde și numele. Este exprimată preferențial în celulele endoteliale cu imunofenotip limfatic, inclusiv cele tumorale, unde este coexprimată cu CD31 și CD34, este asociată cu VEGFR-3, dar mai poate fi

exprimată și în podocite, osteoblaste, celule alveolare de tip I și celulele stratului bazal epidermal. Vasele limfatice mari, cu celule musculare în perete, au celule endoteliale negative la podoplanină. Are rol în limfangiogeneza embrionară, deficiența ei ducând la alterări ale limfangiogenezei, cu limfedem consecutiv. A fost utilizată într-o serie de studii ca marker de endoteliu limfatic în patologia tumorală, limfangiogeneza corneeană, culturi de celule endoteliale limfatice.

Criteriile morfologice luate în considerație pentru definirea și numărarea vaselor limfatice au fost: lumen relativ larg, ușor de identificat, contur neregulat, absența elementelor figurate din lumen, absența celulelor perivasculare și endoteliu pozitiv pentru podoplanină.

La 65% dintre cazurile cu SDS am remarcat prezența a numeroase vase limfatice, pozitive pentru podoplanină în aria cu colagenizare masivă. La 35% dintre cazurile cu sclerodermie am remarcat existența a două aspecte particulare. Primul se referă la absența vaselor pozitive pentru podoplanină pe arii extinse, care se suprapun cu depozitele amorfe de proteine de tip colagen demonstrate histochemic. Cel de-al doilea constă din aglomerări de vase pozitive pentru podoplanină, care au fost observate la 8 cazuri atât în dermul papilar, cât și cel reticular, cu distribuție focală, alternând cu zone întinse de colagenizare. Aceste structuri amintesc corpii glomeruloizi vasculari aflați în fază tardivă de evoluție. Considerăm că acest aspect este secundar depleției de vase sanguine și că este un fenomen de remodelare tardivă a vaselor limfatice dermice.

Microdensitatea vaselor limfatice (LMVD) a fost calculată după metoda Weidner și am constatat că la cazurile cu SDS apare o inversiune a mediei aritmetice în comparație cu cazurile control și în raport cu vasele sanguine.

Așa cum am mai menționat, nu există studii solide asupra limfangiogenezei în sclerodermie. Am găsit date succinte referitoare la aspectul lim-

faticelor în piele pe secțiuni histologice (9), la un caz de sclerodermie generalizată buloasă, o formă rară de boală, la care autorii au descris prezența ectaziilor limfatice, considerând fibroza dermală progresivă ca o cauză a dilatației vaselor limfatice. S-a sugerat implicarea dilatării limfaticelor în patogenia bolii. Autorii au făcut referire și la colagenul tip XVIII, situat normal în membranele bazale ale pielii și vaselor sanguine, pe care l-au găsit la nivele crescute la cazul descris. Endostatina, fragment C-terminal de colagen tip XVIII, ar putea juca un rol atât în angiogenază, cât și în limfangiogenază, similar cu VEGF-C și ar putea fi responsabilă pentru aspectele menționate mai sus.

Aspecte de limfangiectazie în sclerodermie, dar cu localizare intestinală, dobândită, au semnalat și cercetători olandezi încă din 1988 (10). Sistemul capilar limfatic a fost de asemenea investigat la pacienții cu sclerodermie, folosind metoda fluorescenței microlimfografice (11). Autorii au constatat că pielea afectată prezenta evidențe de microangiopatie limfatică, dar numai într-un număr redus de cazuri din cele 16 studiate.

## CONCLUZII

Studiul vaselor limfatice la pacienții cu SDS relevă câteva aspecte nesemnalate de literatura de specialitate. Podoplanina este un marker util, cu sensibilitate foarte mare și specificitate moderată pentru identificarea endoteliului limfatic. Densitatea microvaselor limfatice este mai mare la pacienții cu sclerodermie decât densitatea vaselor sanguine. Creșterea numerică este cu cea mai mare probabilitate tranzitorie și consecință a remodelării plexurilor limfatice dermice, consecutivă depleției de vase sanguine. Se descrie o formă particulară de organizare a vaselor podoplanin-pozitive, prezentă atât în dermul papilar, cât și reticular, asemănătoare structural corpiilor glomeruloizi.

## BIBLIOGRAFIE

1. Banerji S, Ni J, Wang SX et al – LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan, *J. Cell. Biol.* 1999, 144: 789-801
2. Mäkinen T, Norrmen C, Petrova TV – Molecular mechanisms of lymphatic vascular development, *Cell Mol Life Sci.* 2007, 52: 1-15
3. Liang P, Hong JW, Ubukata H et al – Increased density and diameter of lymphatic microvessels correlate with lymph node metastasis in early stage invasive colorectal carcinoma, *Virchows Arch* 2006, 448: 570-575
4. Rui-Cheng JI – Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: new insights into intratumoral and peritumoral lymphatics, *Cancer Metastasis Rev* 2006, 25: 677-694
5. Kato S, Shimoda H, Rui-Cheng JI, Miura M – Lymphangiogenesis and expression of specific molecules as lymphatic endothelial cell markers, *Anat Sci Intern* 2006, 81: 71-83
6. Ohno F, Nakanishi H, Atsushi A et al – Regional difference in intratumoral lymphangiogenesis of oral squamous cell carcinomas evaluated by immunohistochemistry using D2-40 and podoplanin antibody: an analysis in comparison with angiogenesis, *J Oral Pathol* 2007, 36: 281-289
7. Cimpean AM, Raica M, Izvernariu DA et al – Lymphatic vessels identified with podoplanin; comparison of immunostaining with three different detection systems, *Rom J Morphol Embryol* 2007, 48, 2: 139-143
8. Fenzl A, Schoppmann SR, Geleff S et al – Vascular endothelial growth factor-C expression and lymphangiogenesis in colorectal cancer, *Eur Surg.* 2006, 38:149-154;
9. dos Santos SN, de Oliveira GV, Tavares AL et al – Collagen XVIII and fibronectin involvement in bullous scleroderma-case reports, *Dermatology Online Journal* 2005, vol11, number 1;
10. van Tilburg AJ, van Blankenstein M, Verschoor L – Intestinal lymph-angiectasia in systemic sclerosis, *Am J Gastroenterol* 1998, 83: 1418-1419
11. Leu AJ, Gretener SB, Enderlin S et al – Lymphatic microangiopathy of the skin in systemic sclerosis, *Rheumatology* 1999, 38: 221-227