

PODOPLANINA – FACTOR MOLECULAR DIAGNOSTIC ȘI PREDICTIV ÎN CARCINOAMELE MAMARE INVAZIVE ȘI ÎN ALTE NEOPLAZII UMANE SOLIDE

Lucian Rudico – asistent,
Veaceslav Fulga – conf. univ., dr. șt. med.,
Vitalie Mazuru – dr. șt. med., asistent,
Valeriu David – conf. univ., dr. șt. med.,
Oxana Mazuru – cercet. șt.,

Lilian Saptefrati – conf. univ., dr. hab. șt. med.,

Catedra de histologie, citologie și embriologie, IP USMF „Nicolae Testemițanu”

tel. 069304728, lucian.rudico@usmf.md

Rezumat

Podoplanina este o glicoproteină transmembranară tip-1 *sialomucin-like*. Deși este specifică endoteliului vascular limfatic (LV), expresia podoplaninei este determinată pe o gamă largă de celule normale și tumorale. Această expresie este indusă de gena Prox-1 și de un alt receptor endogen specific, identificat pe suprafața trombocitelor. Expresia podoplaninei este aplicată în diagnosticul morfologic, podoplanina rămânând a fi un marker a celulelor tumorale agresive cu potențial sporit de invazivitate și metastazare.

Cuvinte-cheie: podoplanină, carcinom mamar, marker, vas limfatic

Summary. Podoplanin – diagnostic and predictive molecular factor within the breast carcinomas and other human solid malignancies

Podoplanin is a transmembrane sialomucin-like glycoprotein of type 1. In spite of its specificity for lymphatic vascular endothelium, its expression is determined in a broad spectrum of normal and tumor-modified cells. This expression is induced by the gene Prox-1 and by another specific endogenous receptor, identified on the surface of the platelets. Podoplanin's expression is used in morphologic diagnosis, being a marker of aggressive tumor cells with a high potential of invasiveness and metastasizing.

Key words: podoplanin, breast cancer, molecular marker, lymphatic vessel

Резюме. Подопланин – молекулярный фактор диагностики и прогноза для рака молочной железы и других злокачественных опухолей

Подопланин это трансмембранный гликопротеин 1-го типа. Несмотря на то что он специфичен для эндотелия лимфатических сосудов, его можно обнаружить на поверхности многих видов нормальных, а также опухолевых клеток. Его экспрессия индуцирована геном Prox-1 и специфическим эндогенным рецептором поверхности тромбоцитов. Экспрессия данного маркера широко используется в морфологической диагностике. В то же самое время, он является маркером опухолевых клеток с высоким метастатическим потенциалом.

Ключевые слова: подопланин, рак молочной железы, маркер, лимфатический сосуд

Introducere. Cancerul mamar este a doua nozologie oncologică, ca și frecvență, ce poartă un potențial sporit de letalitate în populația umană. Necătând la toate eforturile în domeniul diagnosticului precoce și terapiei adjuvante, morbiditatea și mortalitatea specifică este într-o continuă ascensiune. Unul din cei mai importanți factori prognostici și deterrminanți în strategia terapeutică, este statutul nozilor limfatici regionali. Deși relevanța acestui factor este evidentă, mecanismele prin care celulele tumorale pătrund în vasele limfatice - emițătoare de metastaze limfonodale, nu sunt la moment inteligibile [1]. Timp de decenii, se considera că celulele metastatice invadeau în circuitul limfatic printr-un mecanism pasiv, care reiese din particularitățile structurale relativ simple ale peretelui capilarului limfatic. Odată cu descoperirea și aplica-

rea primilor trei markeri limfangiogenici, LYVE-1 [2], Prox 1 [3] și podoplanina [4], s-a demonstrat prezența vaselor limfatice în ariile peritumorale și cele tumorale, și corelarea numărului lor cu prognosticul în melanomul malign [5], carcinomul scuamocelular de cap și gât [6], carcinomul mamar [7] și adenocarcinomul gastric [8]. Astfel, a fost emisă ideea existenței unui proces activ și interdependent la limita dintre vasul limfatic și celulele tumorale, care în prezent poartă denumirea de *limfangiogeneză*.

Caracteristica moleculară a podoplaninei. Podoplanina a fost pentru prima dată descrisă în studiile dedicate particularităților agregării trombocitelor, când s-a demonstrat capacitatea acesteia de a induce agregarea plachetară fără implicarea factorilor plasmatici de coagulare [9].

Podoplanina este o sialoproteină situată la nivelul membranei celulare ce aparține familiei de glicoproteine transmembranare de tip 1 *sialomucin-like*. Acest lucru s-a determinat în urma aplicării anticorpului monoclonal 8F11, care s-a dovedit că posedă efect inhibitor asupra agregării trombocitelor fiind ligandul specific structurilor membranare sus-numite. Podoplanina conține 162 de aminoacizi, cu un domeniu extracelular bogat în serină și treonină, o porțiune transmembranară și domeniu citoplasmatic mic cu site-uri pentru protein kinaza C și AMPc [9].

Kato și coaut. [10] au demonstrat importanța segmentului EDxxVTPG al domeniului extracelular (domeniul stimulării agregării plachetare, DSAP) în activitatea podoplaninei și predilect implicarea domeniului extracelular, în procesul de agregare plachetară. Mutația rezidurilor de treonină în DSAP, abolește acest proces [10].

Markerii utilizați pentru identificarea podoplaninei. Expresia podoplaninei este demonstrată prin utilizarea pe larg a metodei imunohistochemice. Cei mai des folosiți anticorpi sunt anti-podoplanina și anti- D2-40. Dubla imunocolorare cu anticorpi anti-podoplanină sau anti- D2-40 și CD34 a demonstrat că produsul final al reacției imunohistochemice este restricționat la nivelul endoteliului limfatic atât în cazul țesutului normal, cât și în tumori [11]. Pe de altă parte, s-a demonstrat că CD34, marker al endoteliului vascular, este exprimat slab în vasele limfatice asociate tumorilor podoplanin pozitive, în mai mult de 60% din tumorile de sân, colon, plămân și de piele [12]. Vasele Podoplanin-pozitive pot fi scoase în evidență la dubla imunocolorare cu anticorpii anti- VEGFR-3 expresia regăsindu-se la nivelul endoteliului vasului [12].

Endoteliocitele limfatice pot fi definite ca celule podoplanin-pozitive care pot co-expresa receptorul CD34, intensitatea expresiei acestuia fiind una slabă [13]. Coexistența endoteliocitelor podoplanin-pozitive din capilarele limfatice și celor podoplanin-negative din cele sanguine, dau impresia formării unor insule de endoteliocite limfatice care sunt înconjurate de endoteliocite vasculare, demonstrând implicarea acestora în neformarea vaselor. Această constatare susține ipoteza că endoteliul limfatic și cel vascular constau din două linii celulare de proveniență diferită.

Statutul limfangiogenic al vaselor podoplanin-pozitive în carcinomul mamar și alte neoplazii. *Vasele limfatice normale.* Podoplanina este un marker specific endoteliului vascular limfatic ce nu se exprimă în endoteliul vaselor sanguine din glanda mamară. Ea este evidentă atât în endoteliocitele limfatice tinere, cât și în cele mature și pare a fi un marker mult mai specific pentru endoteliul limfatic,

în comparație cu LIVE-1, ce capătă expresie doar într-un subset de celule endoteliale podoplanin-pozitive [14]. Podoplanina poate fi detectată la nivelul vaselor limfatice mici VEGFR-3-pozitive și vaselor limfatice colectoare [4]. La microscopia electronică și imunoelectronică, s-a constatat că paternul membranelor de expresie al podoplaninei este evident pe suprafețele luminale ale endoteliocitelor limfatice și foarte rar pe suprafețele adluminale sau laterale [15]. Acest aspect al vaselor podoplanin-pozitive din glanda mamară, care poartă caracter interpretativ, și-a găsit utilizare în metodele de cuantificare a rezultatelor obținute la colorarea imunohistochemică.

Podoplanina nu este un marker exclusiv pentru endoteliul limfatic aparținând vaselor podoplanin-pozitive din stroma glandei mamare. În țesuturile sănatoase la om, podoplanina a fost demonstrată în podocite, osteoblaste, osteocite, keratinocitele bazale, epitelocitele plexului coroidal, epitelocitele de tip-1 din timus, celulele mioepiteliale, miofibroblastele prostatice, celulele dendritice foliculare și alveolocitele tip-1 [16].

Vasele limfatice peritumorale. Acestea sunt cu un lumen mai larg și un aspect mult mai neregulat, decât cele intratumorale [15]. Un număr mare de vase limfatice podoplanin-pozitive, au fost observate în parenchimul glandei mamare în imediata apropiere a ducturilor de secreție și vaselor sanguine. Se pare că vasele limfatice peritumorale au o importanță deosebită în răspândirea celulelor tumorale, prin intermediul sprouting-ului, sub influența hipertensiunii lichidului interstițial și a factorului de creștere vascular - C (VEGF-C) secretat de celulele tumorale. În ariile peritumorale au fost observate un număr mare de vase limfatice neo-formate începând cu stadiile precoce a tumorigenezei. Densitatea microvasculară limfatică în aceste arii au fost observate în majoritatea tumorilor de cervix uterin [17], cancer pulmonar și în diferite forme de carcinom mamar invaziv, unde densitatea microvasculară limfatică corela semnificativ cu invazia metastatică în ganglionii limfatici regionali.

Vasele limfatice intratumorale. Acestea au fost observate într-o gamă variată de tumori mamare și sunt de obicei mici, plate, neordonate și ocazional conțin emboli metastatici. Mai mulți autori confirmă prezența vaselor podoplanin-pozitive în stroma tumorilor maligne ovariene [18], de cervix uterin, pancreatice și mamare [7]. Activitatea proliferativă a celulelor endoteliale limfatice în stroma tumorală a fost demonstrată folosind anticorpi anti-podoplanină, anti- D2-40/Ki67 [19] în carcinomul scuamos de cap și gât, melanom, carcinomul colorectal [20] și carcinomul pulmonar, prin dubla imunomarcare cu markeri pentru podoplanină or D2-40/Ki67 [21]. În carci-

nomul mamar inflamator, a fost demonstrat că procesul de proliferare a celulelor endoteliale este prezent atât în plajele peritumorale, cât și în masivul tumoral, însă densitatea limfaticelor podoplanin/D2-40-pozitive este semnificativ mai mare peritumoral [22]. Semnificația clinică a prezenței vaselor limfatice intratumorale este la moment una controversată, majoritatea autorilor considerând că acestea au o importanță modestă în traficul celulelor tumorale, considerându-le ineficiente în procesul de metastazare la distanță [23]. În studiile experimentale recente au fost demonstrate că atât vasele limfatice peritumorale, cât și cele intratumorale (podoplanin-pozitive și LIVE-1-pozitive) din tumora mamară primară, sunt implicate în procesul de asigurare a adezivității și migrării celulelor tumorale [15].

Imunomarcajul cu marker pentru podoplanin/D2-40 este folosit nu numai pentru a evalua densitatea microvasculară în carcinoamele mamare, dar și pentru a demonstra invazia limfovaculară, care are o valoare pronostică importantă și denotă riscul sporit de metastazare limfo-nodală. A fost determinat că invazia limfatică este prezentă în 13,8-16% cazuri de carcinom mamar invaziv folosindu-se imunomarcarea cu anticorpi convenționali, pe când imunomarcarea cu anticorpi anti-podoplanina a crescut randamentul detectării acestora până la 28,5%. Cu toate acestea invazia limfovaculară identificată folosind anticorpusul D2-40 a corelat cu prezența metastazelor limfonodale și boala Paget [24].

Expresia podoplaninei în tumorile umane solide. Markerii specifici pentru endoteliocitele limfatice, VEGFR-3, LYVE-1, Prox1 și podoplanina, au oferit noi perspective în studierea tumorilor maligne. Coexpresia podoplaninei, VEGFR-3 și CD31, a fost observată în sarcoma Kaposi [25]. Podoplana este expresată în celulele tumorale din cadrul a numeroase neoplazii, cum ar fi carcinomul cu celule scuamoase mesoteliomul [26], tumori cu celule germinale (unele subtipuri de tumori vasculare).

Tumorile vasculare. Tumorile vasculare benigne (capilare, cavernoase și hemangiomul venos) nu expresează podoplanina, excepție făcând limfangiomi, tumoarea Dabska, și într-o măsură mai mică, hemangiomul limfatic mixt. Expresia marcată și uniformă a podoplaninei a fost remarcată în hemangio-endoteliomul epitelioid [27].

În angiosarcomă, prezența expresiei podoplaninei în celulele tumorale, aranjate în clustere, a prezentat predilect patern strict membranar. Observarea faptului că în stadiile incipiente podoplanina se expresează în toate celulele tumorale, a condus spre înaintarea ipotezei conform căreia celulele fusiforme din sarcomul Kaposi, provin din celulele endoteliale limfatice.

Această ipoteză este alimentată de datele obținute la analiza expresiei genelor din celulele tumorale [28] și infectarea diferențiată a celulelor endoteliale cu herpes virus 8 care determină diferențierea lor limfatică [29].

Tumorile ovariene. Rolul podoplaninei a fost stabilit în stadiile precoce de diferențiere în celulele din stratul granulos a foliculului ovarian, în cazul în care foliculii primari și secundari prezentau o expresie marcată a acesteia, concomitent, s-a constatat lipsa reacției în corpul galben și cel alb. În același studiu, expresia podoplaninei în celulele tumorale ovariene a fost constatată în 4 din 4 cazuri de disgerminom și în 1 din 3 cazuri de tumori cu celule granuloase, în timp ce celelalte tumori ovariene au fost podoplanin-negative.

Mastocitomu. În mastocitomu invaziv, podoplanina a fost detectată în celulele tumorale, în care anticorpusul a căpătat patern citoplasmatic, dar cel membranar era predilect observat la interfața dintre tumoare și stromă.

Rolul diagnostic al podoplaninei în tumorile maligne. Podoplanina pare a fi un marker util în diagnosticul tumorilor maligne. Ea poate fi folosită pentru a face diferența diagnostică dintre mezoteliom (celule tumorale podoplanin-pozitive) și adenocarcinomul pulmonar (cazuri podoplanin-pozitive puține) [30].

Podoplanina este expresată în 93% din cazurile de mezoteliom și posedă patern membranar continuu bine exprimat [31]. Reacția este puternică și difuză în majoritatea cazurilor, mai mult evidentă la nivelul membranei celulare din zona apicală în toate tumorile bine diferențiate și tumorale papilare, în timp ce reacția este discontinuă în tumorale solide și slab diferențiate. Doar 13% din carcinoamele seroase au exprimat podoplanina, expresia fiind restricționată la nivelul sectorului apical al membranei celulelor tumorale.

Podoplanina-potențială țintă a vaselor limfatice din carcinomul mamar. Țintirea vaselor limfatice și a factorilor de creștere limfangiogenici, reprezintă strategii atractive atât diagnostice, cât și terapeutice în lupta cu tumorile mamare și metastazele lor la distanță. În studiile preclinice, factorii moleculari care s-au dovedit a fi eficace în inhibarea limfangiogenezei tumorale și metastazării limfonodale, sunt proteinele de fuziune anti-VEGF-D și VEGFR-3-Ig [32].

Pe modele experimentale, ce reprezentau tumori VEGF-D-pozitive, administrarea anticorpusului monoclonal VEGF-D a redus semnificativ rata creșterii tumorii primare și dezvoltarea metastazelor limfonodale [33]. Rezultate similare au fost obținute cu anticorpusul anti-VEGFR-3, dar nu s-a obținut același efect

în cazul diseminării metastatice în cancerul pulmonar [32]. Endostatina inhibă limfangiogeneza tumorală prin mecanisme ce presupune diminuarea secreției VEGF-C [34]. Rapamicina, un inhibitor specific al limfangiogenezei, reduce metastazarea limfatică și nivelul VEGF-C, dar s-a constatat lipsa unui răspuns complet la tratament [35].

Aceste date prezintă oportunități terapeutice care ar putea fi utile, însă eficiența lor la moment, nu este destul de relevantă în cazul inhibiției complete a metastazării limfangiogenice. În studiile dedicate tumorilor de prostată, s-a stabilit că ablația a 92% din vasele limfatice intratumorale, nu a produs inhibarea procesului de metastazare, ceea ce înseamnă ca vasele limfatice preexistente în ariile peritumorale au fost suficiente pentru asigurarea diseminării metastatice [36].

Cel mai mare dezavantaj al medicației antilimfangiogenice țintite este faptul că nu există specificitate față de limfaticele tumorale, or podoplanina se exprimă deopotrivă și în țesuturile sănătoase, astfel se limitează dramatic posibilitățile unei eventuale terapii selective.

În concluzie, podoplanina este un marker sensibil al endoteliului limfatic și este util în evaluarea densității limfatice microvasculare în carcinoamele mamare și alte carcinoame umane solide. Detectia imunohistochimică a podoplaninei a devenit necesară și practic indispensabilă pentru diagnosticul molecular de carcinom mamar, în vederea stabilirii nivelului de invazie limfovaculară. Și nu în ultimul rând, expresia acesteia în celulele tumorale ale carcinomului mamar își capătă utilitate în stabilirea unui diagnostic diferențial, predicției progresiei tumorale și metastazării la distanță.

Bibliografie

1. Reis-Filho J.S. and Schmitt FC: Lymphangiogenesis: what do we know? *Microsc Res Tech* 60: 171-180, 2003.
2. Banerji S., Ni J., Wang S.X., Clasper S., Su J., Tammi R., Jones M. and Jackson D.G.: LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 144: 789-801, 1999.
3. Wigle J.T. and Oliver G.: Prox 1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 98: 769-778, a. 1999.
4. Breiteneder-Geleff S., Soleiman A., Kowalski H., Horvat R., Amann G., Kriehuber E., Diem K., Weninger W., Tschachler E., Alitalo K. and Kerjanschki D.: Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries. *Am J Pathol* 154: 385-394, 1999.
5. Straume O., Jackson D.G. and Akslen L.A.: Independent prognostic impact of lymphatic vessel density and presence of low-grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* 9: 250-256, 2003.
6. Beasley N.J., Prevo R., Banerji S., Leek D.R., Moore J., van Trappen Ph, Cox G., Harris A.L. and Jackson D.G.: Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res* 62: 1315-1320, 2002.
7. Schoppmann S.F., Birner P., Studer P. and Breiteneder-Geleff S.: Lymphatic microvessel density and lymphovascular invasion assessed by anti-podoplanin immunostaining in human breast cancer. *Anticancer Res* 21: 2351-2355, 2001.
8. Yonemura Y., Fushida S., Bando E., Kinoshita K., Miwa K., Endo Y., Sugiyama K., Partanen T., Yamamoto H. and Sasaki T.: Lymphangiogenesis and the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) -3 in gastric cancer. *Eur J Cancer* 37: 918-923, 2001.
9. Shayan R., Achen M.G. and Stacker S.A.: Lymphatic vessels in cancer metastasis: bridging the gap. *Carcinogenesis* 27: 1729-1738, 2006.
10. He Y., Rajantie I., Ilmonen M., Makinen T., Karkainen M.J., Haiko P., Salven P. and Alitalo K.: Preexisting lymphatic endothelium but not endothelial progenitor cells are essential for tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Res* 64: 3737-3740, 2004.
11. Wilting J., Tomarev S.I., Christ B. and Schweiger L.: Lymphangioblasts in embryonic lymphangiogenesis. *Lymphat Res Biol* 1: 33-40, 2003.
12. Jeltsch M., Tammela T., Alitalo K. and Wilting J.: Genesis and pathogenesis of lymphatic vessels. *Cell Tissue Res* 314: 69-84, 2003.
13. Kriehuber E., Breiteneder-Geleff S., Groeger M., Soleiman A., Schoppmann S.F., Stingl G., Kerjaschki D. and Maurer D.: Isolation and characterization of dermal lymphatic and blood endothelial cells reveal stable and functionally specialized cell lineages. *J Exp Med* 194: 797-808, 2001.
14. Makinen T., Jussila L., Veikkola T., Karpanen T., Kettunen M.I., Pulkkanen K.J., Kauppinen R., Jackson D.G., Kubo H., Nishikawa S., Yla-Herttuala S. and Alitalo K.: Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med* 7: 199-205, 2001.
15. Ji R.C., Eshita Y. and Kato S.: Investigation of intratumoural and peritumoral lymphatics expressed by podoplanin and LYVE-1 in the hybridoma-induced tumours. *Int J Exp Path* 88: 257-270, 2007.
16. Wetterwald A., Hofstetter W., Cecchini M.G., Lanske B., Wagner C., Fleisch H. and Atkinson M.: Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone* 18: 125-132, 1996.
17. Gombos Z., Xu X., Chu C.S., Zhang P.J. and Acs G.: Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res* 11: 8367-8371, 2005.
18. Birner P., Schindl M., Obermair A., Plank C., Breitenacker G., Kowalski H. and Oberhuber G.: Lymphatic microvessel density in epithelial ovarian cancer: its impact on prognosis. *Anticancer Res* 20: 2981-2985, 2000.
19. Van der Auwera I., Cao Y., Pepper M.S., Jackson

- D.G., Fox S.B., Harris A.L., Dirix L.Y. and Vermeulen P.B.: First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer* 95: 1611-1625, 2006.
20. Omachi T., Kawai Y., Mizuno R., Nomiya T., Miyagawa S., Ohhashi T. and Nakayama J.: Immunohistochemical demonstration of proliferating lymphatic vessels in colorectal carcinoma and its clinicopathological significance. *Cancer Lett* 246: 167-172, 2007.
21. Renyi-Vamos F., Tovari J., Fillinger J., Timar J., Paku S., Kenessey I., Ostoros G., Agocs L., Soltesz I. and Dome B.: Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11: 7344-7353, 2005.
22. Van der Auwera I., van der Eynden G.G., Colpaert C.G., van Laere S.J., van Dam P., Van Marck E.A., Dirix L.Y. and Vermeulen P.B.: Tumor lymphangiogenesis in inflammatory breast carcinoma: a histomorphometric study. *Clin Cancer Res* 11: 7637-7642, 2005.
23. Jain R.K. and Fenton B.T.: Intratumoral lymphatic vessels: a case of mistaken identity or malfunction? *J Natl Cancer Inst* 94: 417-421, 2002.
24. Yamada Y., Matsumoto T., Arakawa A., Ikeda S., Fujime M., Komuro Y. and Takeda S.: Evaluation using a combination of lymphatic invasion on D2-40 immunostain and depth of dermal invasion is a strong predictor for nodal metastasis in extramammary Paget's disease. *Pathol Intern* 58: 114-117, 2008.
25. Weninger W., Partanen T., Breitender-Gelleff S., Mayer C., Kowalski H., Mildner M., Pammer J., Stürzl M., Kerjanschki D., Alitalo K. and Tschachler E.: Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 and podoplanin suggests a lymphatic endothelial cell origin of Kaposi's sarcoma tumor cells. *Lab Invest* 78: 243-251, 1999.
26. Kimura N. and Kimura I.: Podoplanin as a marker for mesothelioma. *Pathol Int* 55: 83-86, 2005.
27. Naqvi J., Ordonez N.G., Luna M.A., Williams M.D., Weber R.S. and El-Naggar A.K.: Epithelioid hemangioendothelioma of the head and neck: role of podoplanin in the differential diagnosis.
28. Wang H.W., Trotter M.W., Lagos D., Bourboulia D., Henderson S., Makinen T., Elliman S., Flanagan A.M., Alitalo K. and Boshoff C.: Kaposi sarcoma herpesvirus-induced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma. *Nat Genet* 36: 687-693, 2004.
29. Hong Y.K., Foreman K., Shin J.W., Hirakawa S., Curry C.L., Sage D.R., Libermann T., Dezube B.J., Fingerhuth J.D. and Detmar M.: Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpes virus. *Nat Genet* 36: 683-685, 2004.
30. Kushitani K., Takeshima Y., Amatya V.J., Furonaka O., Sakatani A. and Inai K.: Immunohistochemical marker panels for distinguishing between epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma. *Pathol Intern* 57: 190-199, 2007.
31. Ordonez N.G.: The diagnostic utility of immunohistochemistry and electron microscopy in distinguishing between peritoneal mesotheliomas and serous carcinomas: a comparative study. *Mod Pathol* 19: 34-48, 2006.
32. He Y., Kokaki K., Karpanen T., Koshikawa K., Ila-Herttuala S., Takahashi T. and Alitalo K.: Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *JNCI* 94: 819-825, 2002.
33. Stacker S.A., Caesar C., Baldwin M.E., Thornton G.E., Williams R.A., Prevo R., Jackson D.G., Nishikawa S., Kubo H. and Achen M.G.: VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 7: 186-191, 2001.
34. Fukumoto S., Morifuji M., Katakura Y., Ohishi M. and Nakamura S.: Endostatin inhibits lymph node metastasis by a down-regulation of the vascular endothelial growth factor C expression in tumor cells. *Clin Exp Metastasis* 22: 31-38, 2005.
35. Kobayashi S., Kishimoto T., Kamata S., Otsuka M., Miyazaki M. and Ishikura H.: Rapamycin, a specific inhibitor of the mammalian target rapamycin, suppresses lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Cancer Sci* 98: 726-733, 2007.
36. Wong S.Y., Haack H., Crowley D., Barry M., Bronson R.T. and Hynes R.O.: Tumor-secreted vascular endothelial growth factor- C is necessary for prostate cancer lymphangiogenesis, but lymphangiogenesis is unnecessary for lymph node metastasis. *Cancer Res* 65: 9789-9798, 2005.