



MD 369 Y 2011.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **369** ⁽¹³⁾ **Y**

(51) Int. Cl.: *A61B 10/00* (2006.01)
G01N 1/30 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: s 2011 0007 (22) Data depozit: 2011.01.03	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2011.05.31, BOPI nr. 5/2011
(71) Solicitant: ȘAPTEFRAȚI Lilian, MD (72) Inventatori: ȘAPTEFRAȚI Lilian, MD; CERNÎI Anatol, MD; MAZURU Vitalie, MD; DAVID Valeriu, MD; GUȚU Lilian, MD; CARDANIUC Corina, MD; ANCUȚA Eugen, RO; ANCUȚA Codrina, RO (73) Titular: ȘAPTEFRAȚI Lilian, MD	

(54) Metodă de pronostic al riscului de recidivare sau malignizare a procesului precanceros al colului uterin

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la medicină, în special la morfopatologia oncologică și poate fi utilizată pentru pronosticul riscului de recidivare sau malignizare a procesului precanceros al colului uterin cu utilizarea imunocolorării duble cu anticorpii anti-CD105 și anti-Ki67.

Esența invenției constă în aceea că după conizarea procesului precanceros al colului uterin se pregătesc secțiuni histologice din biotpatate cu grosimea de 3 μm, se colorează cu hematoxilina-eozină, după care se efectuează reacțiile de imunocolorare cu anticorpii anti-

2

5 CD105, clona SN6h, cu colorarea în brun a endoteliului activat al vaselor, apoi cu anticorpii anti-Ki67, clona MIB1, cu colorarea în roșu a nucleelor celulelor endoteliale și dacă se determină 0...4 vase cu reacție pozitivă la ambii anticorpi, se pronosticează un risc minor de recidivare sau malignizare a procesului precanceros, iar dacă se determină mai mult de 4 vase, se pronosticează un risc sporit de recidivare sau malignizare a procesului precanceros.

15

Revendicări: 1

MD 369 Y 2011.05.31

(54) Method for predicting the risk of recurrence or malignization of precancerous process of the neck of uterus

(57) Abstract:

1 The invention relates to medicine, particularly to oncologic morphopathology and can be used for predicting the risk of recurrence or malignization of precancerous process of the neck of uterus using the immunologic double staining with antibodies anti-CD105 and anti-Ki67.

Summary of the invention consists in the fact that after ionization of precancerous process of the neck of uterus there are prepared histological sections from biopsies of a thickness of 3 μm , they are stained with hematoxylin-eosin, afterwards there are carried out the reactions of immune staining with the

2 antibody anti-CD105, clone SN6h, with staining in brown of the activated vascular endothelium, then with the antibody anti-Ki67, clone MIB1, with staining in red of the nuclei of endothelial cells and if it is determined 0...4 vessels with positive reaction to both antibodies, it is predicted a minimal risk of recurrence or malignization of precancerous process, and if it is determined more than 4 vessels, it is predicted an increased risk of recurrence or malignization of precancerous process.

Claims: 1

(54) Метод прогнозирования риска рецидива или малигнизации предракового процесса шейки матки

(57) Реферат:

1 Изобретение относится к медицине, в частности к онкологической морфопатологии и может быть использовано для прогнозирования риска рецидива или малигнизации предракового процесса шейки матки с использованием иммунологического двойного окрашивания с антителами анти-CD105 и анти-Ki67.

Сущность изобретения состоит в том, что после конизации предракового процесса шейки матки готовят гистологические срезы из биоптатов толщиной 3 $\mu\text{м}$, окрашивают гематоксилин-эозином, после чего выполняют реакции иммунного окра-

2 шивания с антителом анти-CD105, клон SN6h, с окрашиванием сосудистого активированного эндотелия в коричневый цвет, затем с антителом анти- Ki67, клон MIB1, с окрашиванием ядер эндотелиальных клеток в красный цвет и если определяют 0...4 сосуда с положительной реакцией к обоим антителам, то прогнозируют минимальный риск рецидива или малигнизации предракового процесса, а если определяют более 4 сосудов, прогнозируют повышенный риск рецидива или малигнизации предракового процесса.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la medicină, în special la morfopatologia oncologică și poate fi utilizată pentru pronosticul riscului de recidivare sau malignizare a procesului precanceros al colului uterin cu utilizarea imunocolorării duble cu anticorpii anti-CD105 și anti-Ki67.

5 Este cunoscută metoda de pronostic al recidivării sau malignizării leziunilor de col uterin, ce ține îndeosebi de angiogeneza leziunilor menționate prin utilizarea unui pan-marker pentru celulele endoteliale cum este CD31 [1].

Este cunoscută metoda de pronostic, care se referă la angiogeneza leziunilor menționate prin determinarea factorului von Willebrand pentru celulele endoteliale [2].

10 De asemenea, este cunoscută metoda de pronostic care se referă îndeosebi la angiogeneza leziunilor menționate prin utilizarea unui pan-marker pentru celulele endoteliale cum este CD34 [3].

Dezavantajele metodelor cunoscute din stadiul tehnicii, și anume ale markerilor selectivi pentru celulele endoteliale constau în aceea că nu sunt markeri caracteristici pentru vasele normale și cele tumorale, ceea ce nu permite de a diferenția celulele endoteliale activate, care au riscul de malignizare pentru a interveni cu scop profilactic, de celulele endoteliale deja malignizate, ceea ce nu oferă posibilitatea de a efectua un pronostic eficient.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în elaborarea unei metode eficiente de pronostic al recidivării sau malignizării proceselor precanceroase ale colului uterin după conizație. Prin utilizarea unor markeri de elecție pentru vasele sangvine, inclusiv cele implicate în angiogeneza, și anume prin dubla imunocolorare bazată pe un marker endotelial de mare specificitate CD105 și un marker de proliferare Ki67, pot fi depistate celulele endoteliale activate, care apar la o etapă precoce și predomină în leziunile cervicale intraepiteliale ale colului uterin, devenind posibilă intervenția chirurgicală sau terapeutică cu scop de profilaxie a malignizării proceselor precanceroase ale colului uterin.

25 Esența invenției constă în aceea că după conizarea procesului precanceros al colului uterin se pregătesc secțiuni histologice din biopate cu grosimea de 3 μm, se colorează cu hematoxilină-eozină, după care se efectuează reacțiile de imunocolorare cu anticorpii anti-CD105, clona SN6h, cu colorarea în brun a endoteliului activat al vaselor, apoi cu anticorpii anti-Ki67, clona MIB1, cu colorarea în roșu a nucleelor celulelor endoteliale și dacă se determină 0..4 vase cu reacție pozitivă la ambii anticorpi, se pronosticează un risc minor de recidivare sau malignizare a procesului precanceros, iar dacă se determină mai mult de 4 vase, se pronosticează un risc sporit de recidivare sau malignizare a procesului precanceros.

30 Rezultatul invenției constă în stabilirea unui pronostic al riscului recidivării sau malignizării proceselor precanceroase, cu indicarea precoce a unor cure de tratament specifice suplimentare pentru a preîntâmpina apariția proceselor canceromatoase.

Avantajele metodei revendicate constau în aceea că endoglină CD105 este exprimată predominant de celulele endoteliale activate, ceea ce indică faptul că este un marker specific, totodată s-a determinat și expresia divergentă a CD105 și Ki67 în celulele endoteliale, ceea ce denotă eficiența majoră a colorării duble pentru un pronostic eficient al recidivării și, îndeosebi, al malignizării proceselor precanceroase.

40 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 incluzionate în parafină.

45 Din fiecare bloc au fost efectuate secțiuni în serii cu grosimea de 3 μm. Secțiunile inițiale au fost colorate prin metoda hematoxilină-eozină pentru stabilirea diagnosticului.

Pe secțiuni adiționale a fost aplicată metoda de dublă imunocolorare, pentru identificarea CD105 și Ki67. Secțiunile deparafinate și rehidratate au fost supuse blocării peroxidazei endogene cu peroxid de hidrogen 3% timp de 5 min, urmată de pretratamentul cu proteinaza K pentru 15 min la temperatura camerei. Incubarea cu anticorpii primari anti-CD105, clona SN6h (DakoCytomation), timp de 1 oră, cu diluția de 1:10, a precedat prima aplicare a sistemului de lucru avidină-biotină LSAB+/HRP și vizualizarea s-a realizat cu 3,3'diaminmobenzidină. În acest mod, produsul final al imunoreacției pentru endoglină a fost colorat în brun. Ulterior s-a aplicat metoda automată de demascare a antigenului în tampon citrat la pH6 utilizând modulul PT Link (DakoCytomation), pentru 30 min, în vederea demascării epitopului Ki67. După 30 min de incubare cu anticorpii anti-Ki67 (clona MIB1, gata de utilizare), s-a aplicat sistemul de lucru LSAB+/HRP, urmat de vizualizarea cu aminoetil carbazol pentru 10 min. Produsul final al reacției pentru Ki67 a fost colorat în roșu. Colorarea nucleelor s-a realizat cu hematoxilina

Lillie modificată. Întreaga procedură imunohistochimică a fost realizată cu autostainerul DakoCytomation.

Interpretarea CD105 și Ki67. Am cuantificat structurile vasculare cu lumen, pozitive pentru CD105, colorate în culoarea brună la nivel citoplasmatic în celulele endoteliale. Densitatea microvasculară a fost stabilită aplicând metoda modificată după Weidner N. (Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. Breast Cancer Res Treat. 1995, 36(2), p.169-180). Semnalele pozitive pentru Ki67 au fost restricționate nuclear și au fost numărate atât în celulele endoteliale CD105 pozitive, cât și în celulele tumorale.

Endoglină CD105 este o glicoproteină transmembranară de 180 kDa, care este exprimată predominant de celulele endoteliale activate din vasele tumorale ale unei mari varietăți de leziuni maligne și leziuni inflamatorii. De asemenea, endoglină este slab exprimată de o varietate diferită de celule, așa cum sunt monocitele, macrofagi, fibroblaste, melanocitele și celulele musculare ale vaselor sangvine. CD105 este una dintre componentele complexului receptor al factorului de transformare a creșterii- β (TGF- β), o citokină pleiotropică implicată în proliferarea celulară, diferențiere și migrare.

Ki67 (clona MIB1) este un marker al proliferării celulare. Acest marker definește în manieră acceptabilă proliferarea celulară atât a celulelor tumorale, cât și endoteliale din vasele sangvine asociate tumorii. În timpul interfazei, Ki67 poate fi decelat exclusiv în nucleu, iar în timpul mitozei, cea mai mare parte a proteinei este realocată suprafeței cromozomilor. Proteina Ki67 este prezentă în toate fazele active ale ciclului celular G_1 , S, G_2 și în mitoză, dar este absentă în celulele aflate în fază de repaus Go. Ki67 este un excelent marker utilizat pentru determinarea fracției de creștere a unei anumite populații celulare. Numeroase date din literatură asociază expresia endoglinei în celulele endoteliale cu rata lor crescută de proliferare *in vitro* (Lebrin F., Goumans M.J., Jonker L., Carvalho R.L., Valdimarsdottir G., Thorikay M., Mummery C., Arthur H.M., Ten Dijke P. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. EMBO J., 2004, 23, p.4018-4028).

Leziunile maligne și benigne ale cervixului uterin sunt intens studiate în contextul transformării potențiale din leziuni cervicale intraepiteliale în tumori invazive. Multe date au fost publicate în ultimii ani referitor la epidemiologia și factorii cauzativi ai neoplaziei de col uterin. În pofida numeroaselor studii axate pe tumorile cervicale, evoluția și pronosticul acestora nu s-au ameliorat pe parcursul ultimilor ani. În vederea obținerii unui răspuns optimal în tratamentul neoplaziilor cervicale uterine este necesar de a studia în detalii profilul acestor leziuni, care ar include markerii moleculari ai proliferării celulare, interacțiunea cu angiogeneza, matricele extracelulare în invazie, apoptoza, etapele ciclului celular și mecanismele de reparare a ADN-ului.

Nici unul dintre cazurile de cervix uterin normal nu a evidențiat endoglină. Imunoreacția pozitivă pentru CD105 a fost restricționată la endoteliul activat din leziunile intraepiteliale, carcinom *in situ* și carcinom microinvaziv.

Activarea intensă a endoteliului vaselor sangvine a fost observată în neoplazia intraepitelială cervicală, cu densitatea microvasculară care a variat între 0 și 25 vase/400, cu o medie de 6,5 vase/400. Densitatea vaselor CD105 pozitive a fost mai mare în imediata vecinătate a neoplaziei intraepiteliale și a scăzut semnificativ la distanță de leziune. De asemenea, carcinomul *in situ* a prezentat vase pozitive pentru endoglină, dar fără marcaj pentru Ki67, care reflectă proliferarea.

Vasele endoglin-pozitive au fost grupate în apropierea leziunilor epiteliale și au avut o densitate mai mică la distanță, similar cu aspectele identificate în leziunile intraepiteliale. În carcinomul microinvaziv, vase sangvine cu celule endoteliale endoglin-pozitive au fost depistate într-un singur caz.

Dintre cele 49 cazuri de carcinom invaziv 41 au fost negative pentru endoglină și multe dintre ele (n=28) au prezentat celule tumorale cu index proliferativ mai mic sau egal cu 5%. Celulele endoteliale CD105 negative din carcinomul invaziv au prezentat rată de proliferare semnificativ mai mare decât vasele sangvine CD105 negative din colul uterin normal. A fost găsită o corelație semnificativă între absența expresiei endoglinei în celulele endoteliale proliferative și tipul invaziv al carcinomului cervical (p=0,004). De asemenea, indexul proliferativ redus în celulele tumorale s-a corelat cu absența expresiei CD105 din endoteliul vaselor din aria tumorală (p=0,003). Expresia divergentă a CD105 și Ki67 în celulele endoteliale a fost observată constant. În 3 cazuri de carcinom invaziv cu valori mari ale

microdensității vasculare (13...15 vase/câmp $\times 400$, CD105), au fost observate semnale pozitive pentru Ki67 în nucleii celulelor endoteliale CD105 pozitive. Aceste vase au fost localizate la frontul de proliferare tumorală, la interfața dintre celulele tumorale și stromă.

Au fost obținute cele mai înalte valori ale microdensității vasculare CD105 în leziunile displazice și în carcinomul *in situ*. Valoarea acestui indice se micșora pentru vasele tumorale ale carcinomului microinvasiv și invaziv. Din datele obținute reiese corelația clară dintre expresia divergentă a endoglinei și a markerului de proliferare Ki67. Inițial, s-a considerat că endoglina este exprimată exclusiv de către vasele sangvine din aria tumorală, aspect care s-a demonstrat ulterior ca inexact. Pe leziunile neoplazice ale colului uterin s-a observat prezența vaselor cu celule endoglin-pozitive și în precursorii carcinomului, astfel încât densitatea de vase calculată pe baza acestui parametru este mai mare în leziunile noninvazive. Această particularitate susține determinarea precoce a fenotipului angiogenic și atrage atenția asupra semnificației colorației pozitive pentru endoglină, care, în baza rezultatelor obținute, este exprimată de către celulele endoteliale activate, cu potențial proliferativ. Din acest motiv susținem că exprimarea endoglinei precede proliferarea endotelială, aspect susținut și de corelația găsită între prezența/numărul de vase pozitive pentru Ki67.

În aceste condiții, putem afirma că exprimarea secvențială a celor doi markeri în leziunile colului uterin se corelează cu angiogeneza activă. Lucrările referitoare la angiogeneza tumorală cu alte localizări au arătat că proliferarea endotelială este unul dintre cei mai fideli indicatori ai angiogenezei active. De asemenea, expresia endoglinei și a Ki67 poate fi considerată element predictiv pentru răspunsul la terapia adjuvantă clasică, care până în prezent nu este utilizat în practică. Se efectuează reacțiile de imunocolorare cu anticorpii anti-CD105, clona SN6h, cu colorarea în brun a endoteliului activat al vaselor, apoi cu anticorpii anti-Ki67, clona MIB1, cu colorarea în roșu a nucleilor celulelor endoteliale și dacă se determină 0...4 vase cu reacție pozitivă la ambii anticorpi, se pronosticează un risc minor de recidivare sau malignizare a procesului precanceros, iar dacă se determină mai mult de 4 vase, se pronosticează un risc sporit de recidivare sau malignizare a procesului precanceros.

Această metodă este de o acuratețe superioară în interpretarea statutului funcțional al vaselor sangvine. Pe baza rezultatelor obținute, s-a stabilit că în leziunile precursoriale și maligne ale colului uterin, activarea și proliferarea celulelor endoteliale sunt procese distincte. Activarea celulelor endoteliale este etapa precoce care predomină în leziunile cervicale intraepiteliale ale colului uterin, în timp ce proliferarea endotelială este observată la vasele din carcinoamele invazive. Acest aspect permite utilizarea metodei în vederea pronosticului agresivității și eventualelor recidive în leziunile preneoplazice de col uterin.

Exemplul 1

Pacienta S., a.n. 1953, a fost internată în I.M.S.P.I.O., oncoginecologie cu diagnosticul clinic de displazie severă de col uterin.

Pacienta a fost investigată clinic și paraclinic. Analiza generală a sângelui: hemoglobina 130 g/l, eritrocite $3,7 \times 10^{12}$, hematocritul 0,45, leucocite $7,2 \times 10^9$. Patologie concomitentă: Cardiopatie ischemică, pancreatită cronică, pielonefrită cronică. A fost efectuată procedura de conizație. Diagnosticul histologic: carcinom *in situ* de col uterin.

Rezultatul dublei imunocolorări cu anti-CD105 și anti-Ki67: s-au depistat 0 vase pozitive la ambii anticorpi. La examene repetate nu s-au constatat recidive a patologiei.

Exemplul 2

Pacienta A., a.n. 1957, a fost internată în I.M.S.P.I.O., oncoginecologie cu diagnosticul clinic de displazie severă de col uterin.

Pacienta a fost investigată clinic și paraclinic. Analiza generală a sângelui: hemoglobina 142 g/l, eritrocite $4,0 \times 10^{12}$, hematocritul 0,45, leucocite $5,8 \times 10^9$. Patologie concomitentă: colecistopancreatită cronică. A fost efectuată procedura de conizație. Diagnosticul histologic: displazie severă de col uterin.

Rezultatul dublei imunocolorări cu anti-CD105 și anti-Ki67: s-au depistat 8 vase pozitive la ambii anticorpi. Peste 14 luni, la un examen repetat, s-a constatat o recidivă a patologiei.

MD C2

6

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Graflund M., Sorbe B., Hussein A., Bryne M., Karlsson M. The prognostic value of histopathologic grading parameters and microvessel density in patients with early squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Int J. Gynecol. Cancer*, 2002, №12, p. 32-41
2. Davidson B., Goldberg I., Kopolovic J. Angiogenesis in uterine cervical intra-epithelial neoplasia and squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Int J. Gynecol. Pathol.*, 1997, № 16, p. 335-338
3. Vieira S.C., Silva B.B., Pinto G.A., Vassallo J., Moraes N.G., Santana J.O., Santos L.G., Carvasan G.A., Zeferino L.C. CD34 as a marker for evaluating angiogenesis in cervical cancer. *Pathol. Res. Pract.*, 2005, № 201, p. 34, 313-318

(57) Revendicări:

Metodă de pronostic al riscului de recidivare sau malignizare a procesului precanceros al colului uterin, care constă în aceea că după conizarea procesului precanceros al colului uterin se pregătesc secțiuni histologice din biotatate cu grosimea de 3 μm, se colorează cu hematoxină-eozină, după care se efectuează reacțiile de imunocolorare cu anticorpul anti-CD105, clona SN6h, cu colorarea în brun a endoteliului activat al vaselor, apoi cu anticorpul anti-Ki67, clona MIB1, cu colorarea în roșu a nucleelor celulelor endoteliale și dacă se determină 0...4 vase cu reacție pozitivă la ambii anticorpi, se pronostichează un risc minor de recidivare sau malignizare a procesului precanceros, iar dacă se determină mai mult de 4 vase, se pronostichează un risc sporit de recidivare sau malignizare a procesului precanceros.

Director Departament:

GUȘAN Ala

Examinator:

GROSU Petru

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii	
(21) Nr. depozit: s 2011 0007	(32) Data de prioritate recunoscută:
(22) Data depozit: 2011.01.03	Raport de documentare internațională: ☐ da
(54) Titlul: Metodă de pronostic al riscului de recidivare sau malignizare a procesului precanceros al colului uterin	
(71) Solicitant: ȘAPTEFRĂȚI Lilian, MD	
(51) (Int.Cl.): Int. Cl.: A61B 10/00 (2006.01) <i>G01N 1/30</i> (2006.01) <i>G01N 33/53</i> (2006.01) <i>G01N 33/574</i> (2006.01) <i>G01N 33/577</i> (2006.01)	
II. Condiții de unitate a invenției: ☒ satisface ☐ nu satisface Note:	
III.Revendicări: claritatea, susținerea de descriere Note: ☒ satisface ☐ nu satisface	
IV. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare)	
MD (Documentare Invenții (inclusiv cereri nepublicate)) - Int. Cl.: A61B 10/00 (2006.01) <i>G01N 1/30</i> (2006.01) <i>G01N 33/53</i> (2006.01) <i>G01N 33/574</i> (2006.01) <i>G01N 33/577</i> (2006.01) Cuvinte chee limba română: “proces precanceros al colului uterin”, „anticorp anti-CD105”, „anticorp anti-Ki67” EA, CIS (Eapatis) – Int. Cl.: A61B 10/00 (2006.01) <i>G01N 1/30</i> (2006.01) <i>G01N 33/53</i> (2006.01) <i>G01N 33/574</i> (2006.01) <i>G01N 33/577</i> (2006.01) Cuvinte chee limba rusă: “предраковый процесс шейки матки”, “антитело анти-CD105”, “антитело анти-Ki67”	
V. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate	
1. Graflund M., Sorbe B., Hussein A., Bryne M., Karlsson M. The prognostic value of histopathologic grading parameters and microvessel density in patients with early squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Int J. Gynecol. Cancer, 2002, №12, p. 32-41 2. Davidson B., Goldberg I., Kopolovic J. Angiogenesis in uterine cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. Int J. Gynecol. Pathol., 1997, № 16, p. 335-338 3. Vieira S.C., Silva B.B., Pinto G.A., Vassallo J., Moraes N.G., Santana J.O., Santos L.G.,	

Carvasan G.A., Zeferino L.C. CD34 as a marker for evaluating angiogenesis in cervical cancer. Pathol. Res. Pract., 2005, № 201, p. 34, 313-318

VI. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, D	1. Graflund M., Sorbe B., Hussein A., Bryne M., Karlsson M. The prognostic value of histopathologic grading parameters and microvessel density in patients with early squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Int J. Gynecol. Cancer, 2002, №12, p. 32-41	1
A,D	2. Davidson B., Goldberg I., Kopolovic J. Angiogenesis in uterine cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. Int J. Gynecol. Pathol., 1997, № 16, p. 335-338	1
A,D,C	3. Vieira S.C., Silva B.B., Pinto G.A., Vassallo J., Moraes N.G., Santana J.O., Santos L.G., Carvasan G.A., Zeferino L.C. CD34 as a marker for evaluating angiogenesis in cervical cancer. Pathol. Res. Pract., 2005, № 201, p. 34, 313-318	1

* categoriile speciale ale documentelor citate:

A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri

Data finalizării documentării 2011-03-06

Examinator GROSU Petru