



Università degli Studi di Ferrara

**DOTTORATO DI RICERCA IN
FARMACOLOGIA E ONCOLOGIA MOLECOLARE**

COORDINATORE PROF. ANDREA BOREA

**LE CELLULE ENDOTELIALI CIRCOLANTI NELLE
NEOPLASI EMATOLOGICHE**

DOTTORANDO
DOTT. MAURO ENDRI

TUTORE
PROF. ANTONIO CUNEO

XXI° CICLO

ANNI 2006 - 2008

INDICE

<u>Abstract</u>	4
<u>Abstract (In English)</u>	6
<u>Parte compilativa</u>	
Introduzione	7
<u>1.1 La cellula staminale: definizione e caratteristiche</u>	7
<u>1.2 La nicchia emopoietica</u>	10
<u>1.3 Le cellule endoteliali: fisiologia</u>	13
<u>1.4 Cellule progenitrici endoteliali (EPC) e cellule progenitrici endoteliali circolanti (CEPC)</u>	14
<u>1.5 Vasculogenesi e angiogenesi: premesse</u>	15
<u>1.6 Tappe e regolazione del processo angiogenico</u>	17
<u>1.7 Ruolo delle cellule endoteliali in Oncologia e Ematologia</u>	20
<u>1.8 Densità dei microvasi e relazioni prognostiche in Oncoematologia</u>	21
<u>1.9 Tappe nello sviluppo angiogenetico tumorale</u>	22
<u>1.10 Angiogenesi nelle malattie ematologiche maligne</u>	24
<u>1.11 Terapia antiangiogenetica in oncoematologia</u>	29
 <u>Parte sperimentale</u>	
Introduzione	31
Materiali e metodi	
<u>2.1 La popolazione di pazienti presa in esame</u>	33
<u>2.2 Caratterizzazione immunofenotipica delle cellule endoteliali circolanti nel Mieloma Multiplo, nelle Leucemie Mieloidi Acute e nella Leucemia Linfatica Cronica</u>	34
<u>2.3 Analisi FISH delle cellule endoteliali circolanti nel Mieloma Multiplo, nelle Leucemie Mieloidi Acute e nella Leucemia Linfatica Cronica</u>	35
<u>2.4 Quantificazione delle cellule endoteliali circolanti mediante analisi citofluorimetrica</u>	36
<u>2.5 Validazione con tecnica citofluorimetrica dei risultati degli studi di espressione genica</u>	37

Risultati	38
<u>3.1 CEC isolamento e caratterizzazione</u>	38
<u>3.2 Analisi FISH sulle CEC</u>	39
<u>3.3 Analisi citofluorimetrica</u>	40
Discussione	43
Pubblicazioni	51
Tabelle	73
Figure	77
Bibliografia	86

ABSTRACT

Alcuni studi hanno, mostrato che cellule endoteliali derivanti dal midollo osseo e contribuiscono al fenomeno angiogenetico tumorale e che pazienti in fase di progressione tumorale hanno livelli di queste cellule nel sangue più elevati rispetto a pazienti in cui la patologia è in fase di remissione o a volontari sani, dimostrando che un aumento dei valori di cellule endoteliali circolanti è indice di progressione tumorale. Tra le cellule endoteliali circolanti alcune mostrano le caratteristiche tipiche di cellule mature/differenziate, mentre altre esprimono antigeni tipici di cellule staminali/progenitrici, indicando che queste cellule endoteliali progenitrici circolanti (EPC) potrebbero risiedere nei siti in cui avviene l'angiogenesi e partecipare alla formazione di nuovi vasi sanguigni nell'adulto, in particolare a livello della massa neoplastica. E' stato inoltre dimostrato che le cellule endoteliali circolanti (CEC) hanno una limitata capacità proliferativa, mentre le EPC, derivando probabilmente dal midollo osseo, hanno un elevato potenziale di proliferazione. Le cellule endoteliali di origine midollare possono pertanto contribuire all'angiogenesi neoplastica. Evidenze crescenti suggeriscono che l'angiogenesi sia coinvolta nella patogenesi delle malattie ematologiche maligne inclusi il Mieloma Multiplo (MM), le Leucemie Acute Mieloidi (LAM), la Leucemia Linfatica Cronica (LLC). Presi tutti assieme questi dati suggeriscono che in ambito sia oncologico sia ematologico nella progressione neoplastica gioca un certo ruolo la gemmazione di nuovi vasi da capillari esistenti attraverso la secrezione di fattori angiogenetici e che in alcuni casi, le cellule neoplastiche possono anche mimare le attività delle cellule endoteliali partecipando nella formazione di nuovi net-work simil vascolari anche attraverso un loop autocrino che promuove il processo leucemogeno nella LAM. Per chiarire se le CEC nel MM, nelle LAM e nelle LLC sono di derivazione neoplastica abbiamo valutato 5 pazienti con MM e 3 con MGUS con del 13q-, 7 pazienti con LAM con differenti aberrazioni citogenetiche, 74 pazienti affetti dal LLC-B e cercato di caratterizzare le CEC isolandole dal sangue periferico con metodica immunomagnetica (le cellule venivano marcate con anticorpi IgG, a loro volta coniugati con biglie magnetiche che permettevano l'estrazione delle cellule endoteliali tramite magnete) e caratterizzandole con analisi immunofenotipiche (valutando quali antigeni endoteliali venivano espressi sulla superficie cellulare e la percentuale di cellule che coesprimeva tali antigeni), FISH (Fluorescence In Situ Hybridization che permette di individuare tramite sonde fluorescenti traslocazioni genetiche, trisomie, delezioni etc.), associando nel caso della LLC una valutazione del profilo di espressione genica di 12 campioni di cellule endoteliali circolanti attraverso l'utilizzo di microarrays

contenenti circa 33.000 geni e successivamente comparato con il profilo di espressione genica di 2 volontari sani. I risultati di tali studi hanno posto in evidenza che sia nel MM, nella LAM, e nella LLC esistono in circolo le cellule endoteliali CEC, in quantità superiore rispetto ai controlli sani o a casi clinici con la stessa malattia ematologica ma in fase di remissione post trattamento specifico, di cui una quota viene identificata come cellule endoteliali progenitrici (EPC) grazie all'espressione del CD133+ un marcatore endoteliale precoce perduto durante le successive fasi maturative della cellula endoteliale. L'analisi FISH ha evidenziato che le aberrazioni citogenetiche specifiche presenti nelle cellule del MM, della LAM e della LLC erano presenti anche nelle cellule a fenotipo endoteliale isolate mediante metodica immunomagnetica. Lo studio di espressione genica ha evidenziato come all'interno delle CEC dei pazienti con LLC vi sia un ben definito pattern di espressione di numerosi geni coinvolti nei processi di progressione tumorale e di neovascolarizzazione definendo una popolazione di cellule endoteliali co-esprimenti sia geni tipici della cellula linfatica patologica che della cellula endoteliale (CD19, fattore di von Willebrand, VEGFR2, etc.). In conclusione, le nostre scoperte suggeriscono che in pazienti con MM, LAM e LLC-B, le CEC sono aumentate, sono in parte tumore correlate e presentano caratteristiche delle EPC ed un pattern di espressione genica a "cavallo" tra le cellule che costituiscono la malattia ematologica e le cellule endoteliali, con particolare aumento dell'espressione dei geni coinvolti nella proliferazione, nella migrazione e nell'angiogenesi. Queste CECs possono contribuire alla neovasculogenesi tumorale e possibilmente alla progressione della malattia. E' possibile speculare che le CECs neoplastiche potrebbero agire come una sorta di testa di ponte sulle quali molte più numerose e più specializzate e funzionalmente attive cellule EPCs derivate dal midollo di tipo non clonali potrebbero attivamente differenziarsi in vasi maturi e contribuire alla neovascolarizzazione e allo sviluppo del tumore. La presenza nelle cellule endoteliali della medesima aberrazione genetica specifica presente nelle cellule del MM, della LAM e della LLC ci ha permesso di formulare alcune ipotesi sull'origine di tali cellule: in particolare l'esistenza di un precursore comune sia alle CEC che alle cellule di MM, LAM, LLC detto emangioblasto, oppure il fenomeno della dedifferenziazione e delle transdifferenziazione cellulare, o ancora l'ipotesi della fusione di due cellule con scambio di materiale genetico. Lo studio delle CECs può avere importanti implicazioni non solo nella comprensione degli aspetti biologici specifici delle emopatie maligne, ma anche per la traslazione di nuove terapie anti-angiogenetiche alla clinica corrente.

ABSTRACT (In English)

Accumulating evidences showed that bone marrow endothelial cells play a key role in neoplastic angiogenesis. In neoplastic progression they are more circulating endothelial cells than in remission or in health volunteers. Some circulating endothelial cells are characterized by a mature well differentiated phenotype while other endothelial cell show antigens of progenitor cells indicating that these circulating endothelial progenitor cells (EPC) might be inside in angiogenic tissues and take active part in angiogenesis of new vessels, in particular in neoplasia. It is demonstrated that circulating endothelial cells (CEC) are characterized by a limited proliferating capacity, while EPC, coming from bone marrow, have got a elevated proliferating capacity. Bone marrow endothelial cells can contribute to neoplastic angiogenesis. Increasing evidences suggest that angiogenesis is involved in pathology of hematological malignant diseases included Multiple Myeloma (MM), Acute Myeloid Leukemia (AML), Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). Taken together these findings suggest that angiogenesis plays a role in progression of onco-hematological disease by synthesis of pro angiogenetic factors and neoplastic cells, mimicking a endothelial activity, taking part in synthesis of new vascular net-works by a autocrine loop, promoting leukemic progression. To clarify whether CEC in MM, in AML and in CLL originate from cancer, we evaluated 8 patients with deletion of 13q (5 with MM and 3 with Monoclonal Uncertain Gammopathy), 7 patients with AML and 74 patients with CLL with known cytogenetic abnormalities; we extracted CEC by immunomagnetic sorting from circulating cells and we characterized CEC by immunophenotype analysis and by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). In CLL we performed also a gene expression profile of 12 samples of CEC from patients with CLL using microarrays of 33.000 genes and comparing the results with gene expression profile of 2 health volunteers. The findings of these studies have shown that CEC levels both in MM and in AML and in CLL are increased compared to CEC levels in health volunteers or to CEC levels of patients in remission. Endothelial cell are in part endothelial progenitor cell (EPC) characterized by CD133 surface expression, a early endothelial marker lost during maturation of endothelial cell. FISH analysis highlighted that endothelial cells are positive for know cytogenetic abnormalities of MM, AML and CLL. Gene expression profiling in CEC of CLL has showed a well defined genetic pattern whose genes are involved in neoplastic progression and in neo-vasulogenesis identifying a cellular population co-expressing endothelial and lymphatic genes (CD19, von Willebrand Factor,

VEGFR2). In conclusion our findings suggest that in MM, AML and in CLL, CEC are increased, are tumor related, show a EPC immuno phenotype and have a gene expression profile not only of endothelial cells but also of hematological malignance; in particular we find a increased expression of genes involved in proliferation, progression and angiogenesis. CEC can contribute to neoplastic angiogenesis and to progression acting as a sort bridgehead on which more numerous and possibly more specialized and functional active non clonal bone marrow derived EPCs could actively differentiate in mature vessels and contribute to tumor neovascularization and spreading. The results presented in this study, by showing a subset of CEC harbors cytogenetic abnormalities, suggest several theories. First, ECs and hematologic malignancies may derive from the same multipotent hemangioblast precursor cell; alternatively we may advocate theory about de-differentiation, trans differentiation or theory of cellular fusion even if the last seems unlikely. Findings about CEC might play a key role non only in understanding of hematological malignancies biological specific features of but also in translation of new anti-angiogenic therapies to the clinic.

PARTE COMPILATIVA

Introduzione

1.1 La cellula staminale: definizione e caratteristiche

Vi è una netta distinzione nella definizione di cellula staminale e di progenitore così come di cellula CD34+. La cellula staminale viene, infatti, identificata grazie a tre requisiti fondamentali ossia la capacità di auto perpetuarsi, di differenziarsi in cellule con caratteristiche e funzioni diverse e di ricostituire in vivo un certo tessuto. Le cellule staminali isolate dagli organi dell'uomo adulto sono definite cellule staminali multipotenti perché rivestono le caratteristiche di auto perpetuazione e capacità differenziativa organo specifica. Negli ultimi anni, diversi studi hanno dimostrato che le cellule staminali dell'adulto, sotto alcuni tipi di condizioni micro ambientali, sono in grado svolgere uno switch che le porta a differenziarsi in un tipo cellulare totalmente differente da quello del tessuto di origine. Le cellule staminali meglio studiate sono indubbiamente quelle emopoietiche (HSC) (Herzog EL, et al. 2003), che nell'adulto sono caratterizzate dalla positività per l'antigene CD34. La loro caratterizzazione rimane tuttavia difficile: sono oggi rintracciabili almeno due subset di cellule staminali con immunofenotipo tra loro differente ossia CD34/CDw90 e CD34/CD38-. La percentuale di cellule CD34+ nel

sangue periferico in condizioni di equilibrio (steady state) è circa lo 0.06% e circa l'1,1% nel midollo osseo (Fruehauf et al. 1995, Koerbling et al. 2001). È stato ipotizzato che l'antigene di superficie CD34 possa rappresentare una molecola di adesione, basato sull'omologia molecolare con la selectina e che l'antigene CD90 possa essere coinvolto nella cascata della trasduzione del segnale (Ziegler, et al. 1999). L'espressione del MDR1 (ossia gp 170, fenotipo di farmaco resistenza) è stata utilizzata per meglio definire le cellule CD34+ e spesso tale nuovo antigene di superficie predice l'esistenza di un ulteriore subset di cellule staminali CD34- che rappresenterebbero i precursori delle CD34+ e che sono caratterizzati da un miglior attecchimento a lungo termine nel trapianto di cellule staminali (Goodel MA et al 1997). Si può pertanto affermare che le cellule CD34+ rappresentano un pool di cellule ematopoietiche che include una certa percentuale di cellule emopoietiche staminali.

Degno di nota è che le cellule CD34+ dal midollo osseo e dal sangue periferico esprimono pattern genetici diversi: mentre le cellule CD34+ midollari sono in rapida attività replicativa, quelle circolanti presentano spesso un profilo in fase G0 del ciclo cellulare. A tal proposito, Steidl e collaboratori dimostrarono che ben nove geni coinvolti nel ciclo cellulare (come CDC25A, B-MYB, PLK, CDC20, UBCH10) e undici geni che svolgono un ruolo nella sintesi del DNA (come il gene della ligasi 1), erano marcatamente più espressi nelle cellule CD34+ del midollo osseo rispetto alle CD34+ circolanti, il che deponesse per una più elevata attività replicativa. Di converso il livello di espressione di geni pro-apoptotici, inclusi i geni delle caspasi 3, 4 e 8, era più elevato nelle cellule CD34+ circolanti e diminuita era invece l'espressione delle anti proteasi 2 citoplasmatiche (Staidl, et al. 2002); il diverso pattern di espressione genica potrebbe giocare un ruolo nel logico meccanismo di prevenzione di un'incontrollata espansione clonale .

La capacità di differenziarsi in cellule con caratteristiche e funzioni diverse, definita con il termine di "plasticità", è fonte anche oggi di dibattito nella comunità scientifica poiché contraddicono il dogma secondo il quale la differenziazione e il "commitment" della cellula staminale dell'adulto sono ristretti al tessuto di appartenenza. Per spiegare il fenomeno della plasticità si è supposta l'esistenza, a livello midollare, di una cellula pluripotente che sia in grado di dedifferenziarsi, redifferenziarsi o di transdifferenziarsi. In tali processi i nuclei sarebbero sottoposti a una serie di riprogrammazione genica e quindi un diverso profilo di espressione proteica. A tal proposito è stata formulata l'ipotesi che le cellule staminali embrionali localizzate nel midollo e nel sangue periferico o entrambe possano dar vita a diverse linee di cellule staminali a loro volta linee ristrette. A supporto

di questa teoria, Brockes già nel 1997, dimostrò che negli anfibi dopo asportazione dell'arto, le cellule del blastema erano sottoposte a una de-differenziazione e quindi a nuova differenziazione di cellule volte alla totale rigenerazione dell'arto amputato (Brockes, 1997). In seguito molti studi hanno rilevato che la somministrazione di cellule staminali emopoietiche poteva migliorare patologie anche non strettamente ematologiche come l'osteogenesi imperfetta (Horwitz, et al. 2001) o la presenza di un chimerismo per il cromosoma Y a livello delle cellule epatiche e addirittura cerebrali dopo trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche tra donatore e ricevente di sesso diverso (Theise ND et al. 2000, Mezey et al. 2003). Una seconda teoria ipotizza che vi possano essere multipli distinti tipi di cellule staminali circolanti le quali hanno una ristretta capacità differenziandosi solo in una linea tessuto specifica. Tale modello deterministico è supportato dal fatto che vari progenitori cellulari circolano nel sangue periferico, comprese le cellule emopoietiche, ma anche progenitori del muscolo liscio o del mesenchima. È pertanto ragionevole pensare che cellule staminali non emopoietiche si mobilitino nel sangue periferico tra il loro tessuto d'origine (Saiura et al. 2001, Simper et al. 2002). Tutte queste ipotesi sono riassunte nella figura 1. Accanto alle cellule staminali, nel midollo osseo, risiedono anche le cellule staminali mesenchimali (MSC) (Conget et al. 1999) identificabili attraverso l'espressione di superficie del CD105, SH3, Stro-1, le quali presentano capacità in vitro di differenziarsi in osteoblasti, adipociti, condroblasti, cellule del muscolo liscio, e striato. La spiegazione più ovvia per confutare l'ipotesi della plasticità è che le cellule staminali infuse nei trapianti in realtà siano costituite da una popolazione di cellule non purificate e che abbiano già avuto il loro commitment; ad esempio l'infusione di cellule muscolari non purificate possono ripopolare il midollo emopoietico almeno in parte a causa della presenza di cellule staminali emopoietiche nell'inoculum (Jakson et al. 1999). Sono state tuttavia create altre ipotesi per spiegare il fenomeno della plasticità: in particolare è stato chiamato in campo il concetto della fusione cellulare. In vivo in due studi è stato osservato il fenomeno della fusione cellulare; Wang e Vassilopoulos hanno dimostrato che in topi affetti da un'epatopatia fatale e sottoposti a trapianto di cellule staminali emopoietiche da donatore sano, si generavano degli epatociti caratterizzati dal patrimonio genetico sia del donatore che del ricevente mentre l'analisi citogenetica mostrava un cariotipo diploide normale (Wang et al. 2003, Vassilopoulos et al. 2003). In conclusione siamo solo agli inizi della comprensione delle potenzialità delle cellule staminali dell'adulto delle loro notevoli capacità non solo nell'ambito della riparazione tessutale ma anche come vedremo di seguito, nella fisiopatologia di alcune

malattie emopoietiche maligne, attraverso complessi meccanismi biologici che rimangono a oggi ancora per la maggior parte, oscuri.

1.2 La nicchia emopoietica

Lo sviluppo della cavità midollare è un processo coordinato in cui le HSC colonizzano gli spazi ricavati dal tessuto osseo e dalla cartilagine. Pertanto già durante la vita fetale è stabilita un'intima relazione tra le cellule ematiche e stromali. L'emopoiesi avviene in un determinato ambiente il quale presuppone l'esistenza di determinate condizioni che permettano la maturazione e il mantenimento delle cellule staminali emopoietiche. Tali condizioni sono costituite da aspetti microambientali e dalla sintesi di diverse citochine. La componente stromale e mesenchimale svolge un ruolo fondamentale nella sintesi di tali fattori di crescita. Tuttavia, molto probabilmente, per una crescita "fisiologica" del pattern emopoietico occorre anche un determinato assetto architettonico del midollo. Infatti alcuni studiosi riportano (Lord et al. 1972, Lord et al. 1975, Lord et al. 1990) la presenza di un gradiente di cellule staminali emopoietiche che decresce verso la cavità midollare centrale nel midollo osseo nel topo, mentre la densità di granulociti maturanti aumenta man mano che ci si allontana dalla superficie ossea. Alle cellule stromali appartengono diversi tipi cellulari come i fibroblasti, macrofagi, cellule endoteliali, osteoblasti, osteoclasti, adipociti e tutti partecipano alla maturazione e al mantenimento delle cellule staminali emopoietiche. In particolare molti studi hanno suggerito che gli osteoclasti potessero regolare l'emopoiesi perché indotti nella loro maturazione ed espansione dagli osteoblasti e da precursori emopoietici (Rodan et al. 1981, Roodman et al. 2004). Gli osteoclasti derivano da cellule CD34+ emopoietiche e sono i principali responsabili del riassorbimento osseo; la loro attività è regolata da diverse citochine a funzione locale e sistemica come il paratormone (PTH), la vitamina D3, MCSF, RANKL e l'osteoprotegerina, inoltre gli osteoblasti sono coinvolti nell'attivazione degli osteoclasti. L'espressione recettoriale di superficie per il PTH è molto intensa sugli osteoblasti i quali a loro volta avviano uno o più segnali a cascata per il riassorbimento osseo secondario all'attivazione osteoclastica. Gli osteoblasti potrebbero esprimere dei segnali chemiotattici sotto forma di chemochine e molecole di adesione che permettano agli osteoclasti di giungere in una determinata zona mineralizzata dell'osso. Da quanto esposto è chiaro che i precursori emopoietici e gli osteoblasti stabiliscono delle interazioni per la produzione di osteoclasti e l'attivazione del rimaneggiamento osseo.

A conferma delle strette correlazioni che intercorrono tra cellula staminale e cellule mesenchimali del microambiente midollare, è stato rilevato che gli osteoblasti producono una serie di citochine stimolanti le staminali come il GCSF, MCSF, GMCSF, IL1, IL6, l'osteoprotegerina e il RANK (recettore attivatore la cascata molecolare del fattore trascrizionale NFK-B) (Taichman et al. 1998, Greenfield et al. 1996, Ponomaryov et al. 2000, Hofbauer et al. 2000).

Tuttavia nessuna di queste citochine da sola o in combinazione sembra essere determinante per garantire la sopravvivenza delle staminali emopoietiche in vitro. Tale aspetto ha indotto a studiare il comportamento di alcune linee cellulari stromali in vitro a contatto con le cellule staminali emopoietiche. In vivo circa il 50% delle cellule di origine stromale forma tessuto osseo se trapiantate, richiamando dal circolo progenitori emopoietici dell'ospite per ristabilire una completa funzionalità midollare (Kuznetsov et al. 1997). Gli osteoblasti primari in vitro hanno anche dimostrato la capacità di sintetizzare GCSF (Taichman et al. 1994), interagendo con le cellule staminali emopoietiche mantenendole tuttavia sempre in uno stato di precursore immaturo. La maturazione completa verso un fenotipo granulocitario avveniva solo dopo aggiunta al terreno di G-MCSF o IL3. Di converso coltivando le HSC su strati di osteoblasti si assiste a una modulazione della secrezione di IL6, MIP1 α e di altri fattori prodotti dagli osteoblasti (Taichman et al. 1997), probabilmente per creare un ambiente favorevole all'attecchimento. Infine gli osteoblasti esprimono anche fattori solubili che non sono rilevabili in assenza di cellule staminali emopoietiche. Queste osservazioni sperimentali suggeriscono una stretta relazione tra gli osteoblasti e le HSC, benché la dimensione del fenomeno debba essere ancora definito completamente (Figura 2).

Lo sviluppo della cavità midollare è un processo coordinato in cui i precursori emopoietici colonizzano gli spazi ricavati nell'osso embrionario e nella cartilagine stabilendo così già nella vita fetale un'intima relazione tra le cellule ematiche e tessuto osseo. Tale relazione è stata dimostrata nei topi Knoch out per il gene Runx 2 il quale promuove la maturazione osteoblastica; questi animali morivano subito dopo la nascita per la totale incapacità delle HSC di penetrare nel midollo osseo generando focolai ematopoietici extramidollari nella milza, fegato e peritoneo (Lee et al. 1997, Ducy et al. 1997, Deguchi et al. 1999). Tuttavia la presenza della formazione delle cavità midollari è un fattore necessario ma non sufficiente a stabilire l'emopoiesi; vi è una serie di geni che regolano anche l'attecchimento e la stabilità della nicchia emopoietica endostale. In particolare è stato osservato che l'assenza di espressione del fattore di derivazione stromale (SDF1) o del suo

recettore (CXCR4) gioca un ruolo fondamentale nel determinare la stabilità delle nicchie, risultando in una normale emopoiesi extramidollare nell'embrione senza però un attecchimento midollare. Inoltre l'iperespressione del gene per CXCR4 umano nei topi permette una normale emopoiesi ossea. (Aiuti et al 1999, Nagasawa et al. 1996, Peled et al. 1999). Un ulteriore rafforzamento di tale ipotesi proviene dallo studio di pazienti cosiddetti "poor mobilizer". Esiste infatti, un quota di pazienti sottoposti a mobilizzazione delle cellule staminali che non riescono a raggiungere un target sufficiente di cellule per l'autotrapianto; tali pazienti presentano una espressione genica di SDF1 e CXCR4 significativamente più elevata rispetto ai cosiddetti "good mobilizer" (Gazitt et al 2001). La molecola SDF1 è espressa sulla superficie cellulare degli osteoblasti e delle cellule endoteliali (Peled et al 1999, Hamada et al. 1998, Wang JF et al. 1998) e potrebbe costituire pertanto un meccanismo di attrazione selettiva nel midollo degli osteoclasti e delle HSC circolanti verso l'osso, promuovendo la loro migrazione e stabilizzazione nel midollo attraverso appropriati passaggi perivascolari. Da quanto esposto finora si desumono le complesse interazioni che avvengono tra i diversi tipi cellulari che costituiscono la componente ossea e midollare nonché gli articolati processi di interazione recettoriale e di sintesi di una moltitudine di citochine. Come prima accennato, le HSC se coltivate in vitro con gli osteoblasti, determinano con questi ultimi dei legami di adesione e la sopravvivenza delle HSC deriva proprio da questo intimo contatto (Crean et al. 2004). Tra le molecole meglio caratterizzate in questo complesso processo, troviamo le molecole di adesione stromale VLA espresse dalle cellule CD34+, mentre le cellule stromali esprimono le molecole di adesione V-CAM. Molto probabilmente i fattori prodotti dagli osteoblasti supportano l'attività delle HSC, sono sintetizzati in piccole quantità e hanno un rapido turnover, possono essere ancorati alla membrana cellulare e richiedere la presenza di molecole di adesione che devono ancora essere determinate. In conclusione vi sono sostanziali ragioni per sospettare che le molecole di adesione degli osteoblasti giochino un ruolo centrale nello sviluppo emopoietico in vivo con fattori cellulari associati e solubili. Gli osteoblasti si trovano pertanto in un sito biologicamente rilevante per trasmettere informazioni promuovendo lo sviluppo delle linee emopoietiche e la loro attività aiuta a definire e regolare la nicchia emopoietica delle HSC.

1.3 Le cellule endoteliali: fisiologia

Le cellule progenitrici endoteliali (EPC) hanno la capacità di circolare, proliferare e partecipare allo sviluppo di nuovi pattern vascolari differenziandosi in cellule endoteliali mature (Rafii S. 2000) e per questo richiamare le caratteristiche dell'angioblasto embrionario, svolgendo quindi un ruolo nell'angiogenesi dell'adulto sia fisiologica e patologica. Per definizione, le EPC presentano alcune caratteristiche particolari: sono cellule circolanti di derivazione midollare, funzionalmente e fenotipicamente distinte dalle cellule endoteliali ma che in vitro possono differenziarsi in esse e in vivo possono contribuire alla neovascolarizzazione o all'omeostasi vascolare. Le EPC provenienti dal midollo osseo, giocano un ruolo nella vasculogenesi post natale in particolare con funzione riparativa dopo insulto ischemico. Il dogma secondo il quale la differenziazione delle cellule mesodermiche in angioblasti e la loro evoluzione in cellule endoteliali è appannaggio esclusivo della vita embrionale, è stata smentita da Asahara e collaboratori i quali rilevarono che anche le cellule progenitrici ematopoietiche CD34+ (marcatore classico di cellule staminali e progenitori midollari) isolate da adulti possono differenziarsi in vivo assumendo un fenotipo endoteliale (Asahara T et al. 1997). È stato dimostrato nel midollo osseo di topo, l'esistenza di un precursore delle EPC, nominato emangioblasto, ossia una cellula che può dare origine sia a HSC, EPC e cellule del muscolo liscio (Pelosi E, et al. Blood 2002, Bailey AS, et al. Blood 2004). Le strette correlazioni spaziali e temporali nello sviluppo di queste linee cellulari forniscono le basi per ipotizzare che esse derivino da questo stesso progenitore comune. A supporto di un'origine cellulare comune delle HSC e delle EPC è la scoperta che un gran numero di geni è espresso sia dalla linea ematopoietica sia dalla linea endoteliale e che alcuni di questi geni sono addirittura essenziali per lo sviluppo delle cellule ematiche e vascolari.

È tuttavia noto che le cellule endoteliali costituiscono una popolazione eterogenea di cellule spesso di origine e di caratteristiche immunofenotipiche diverse. In particolare, le cellule multipotenti progenitrici adulte (MAPC), una popolazione di cellule progenitrici midollari isolate assieme alle cellule staminali di derivazione mesenchimale nell'adulto ma distinte dalle cellule staminali ematopoietiche, hanno la capacità di differenziarsi in molti tipi cellulari e potrebbero rappresentare un'unica sottopopolazione di EPC (Reyes et al. 2002). La superficie delle MAPC possiede il fenotipo CD34-/CD133+/Flk1+ (VEGFR2) ed è negativa per la caderina vasculo-endoteliale (queste caderine mediano le interazioni omofile calcio-dipendenti tra le

cellule endoteliali). Cellule della linea monocitaria, che, in quanto tali, esprimono l'antigene di superficie CD14, rappresentano un'ulteriore popolazione che può comportarsi da EPC. E' stato dimostrato infatti che cellule purificate CD14+ messe in coltura in un mezzo per la crescita endoteliale, danno origine a cellule aderenti con caratteristiche di tipo endoteliale, come l'espressione di vWF e VEGFR2 (Urbich C, et al. 2003). Queste cellule, che esprimono anche il CD45 (antigene comune leucocitario), favoriscono la neovascolarizzazione e partecipano direttamente alla vasculogenesi in vivo, ma soltanto se sono prima espansive in coltura.

E' di fatto difficile stabilire quali siano le "vere" cellule progenitrici endoteliali, poiché non è escluso che, oltre a quelle menzionate, anche altre popolazioni cellulari possano, differenziandosi, comportarsi da cellule endoteliali. Occorre inoltre considerare i problemi che le colture presentano, dato che le condizioni di crescita (citochine, fattori di crescita e supplementi al terreno) possono rapidamente determinare un viraggio nel fenotipo cellulare.

1.4 Cellule progenitrici endoteliali (EPC) e cellule progenitrici endoteliali circolanti (CEPC)

Accanto alle EPC è stata inoltre dimostrata l'esistenza di cellule progenitrici endoteliali circolanti (CEPC), sempre di origine midollare, durante l'età adulta (Shi Q. et al. 1998). Sia le EPC sia le CEPC possiedono marcatori condivisi con la linea ematopoietica ed endoteliale, come appunto il CD34 e VEGFR2 (recettore per il fattore di crescita vasculo-endoteliale).

Poiché il CD34 è espresso anche da cellule endoteliali mature, è stato utilizzato un marcatore più precoce per le cellule di derivazione midollare, che non fosse espresso dalle cellule endoteliali, come il CD133 o prominina (Peichev M. et al. 2000), ottenendo gli stessi risultati. Quindi le cellule CD133+ VEGFR2+ identificano in maniera più precisa una popolazione di cellule progenitrici immature rispetto a quelle CD34+VEGFR2+ che possono rappresentare invece anche cellule circolanti provenienti dalla parete dei vasi (cellule endoteliali circolanti o CEC). Nonostante ciò, alcune di queste cellule con fenotipo "più maturo" potrebbero derivare anch'esse da EPC con precedente fenotipo CD133+/CD34+/VEGFR2+, anche se il loro potenziale di neovascolarizzazione post-natale risulta notevolmente inferiore.

In una valutazione per verificare la diversa origine delle EPC e delle CEC è stato studiato il sangue periferico di pazienti che avevano ricevuto un trapianto di midollo

osseo (Lin Y et al. 2000). Una serie di esperimenti in vitro dimostrò che le colonie di cellule endoteliali sviluppatesi nell'arco di nove giorni possedevano prevalentemente il fenotipo del ricevente, suggerendo che si trattasse di CEC rilasciate dalle pareti vascolari del ricevente stesso. Le colonie di cellule endoteliali che invece apparivano più tardi possedevano il fenotipo del donatore, provando che si trattava di EPC di derivazione midollare. Queste cellule a crescita più tardiva dimostrarono di avere un'incredibile capacità proliferativa, a differenza delle colonie sviluppatesi più precocemente. Un ruolo importante rivestono le strette interazioni che si presentano tra le cellule delle filiere emopoietiche e le EPC. La differenziazione linea specifica delle cellule staminali ematopoietiche dipende in prima battuta dalla presenza di alcune citochine come il fattore di crescita granulocitario o granulomonocitario (G-CSF o GM-CSF) che supportano una selettiva differenziazione di queste cellule in mieloidi, megacariociti e cellule linfoidi. Questi tipi di cellule commissionate delle varie filiere emopoietiche, rappresentano gli elementi produttori di fattori di crescita tra cui il VEGF (fattore di crescita vasculo-endoteliale), FGF (fattore di crescita dei fibroblasti) e l'angiopoietina, i quali a loro volta promuovono la differenziazione delle cellule endoteliali progenitrici in endotelio. Quando le EPC sono dunque esposte a fattori di crescita come VEGF, FGF2 queste si differenziano in un fenotipo più maturo perdendo l'espressione del marcatore CD133 di superficie e differenziandosi in una cellula endoteliale matura, aderente, la quale esprime marcatori specifici di linea (fattore di von Willebrand e VE caderina). Le EPC pertanto sembrano richiamare l'emangioblasto embrionale il quale è mobile, può proliferare e differenziarsi in cellule endoteliali mature.

1.5 Vasculogenesi e angiogenesi: premesse

Grazie all'identificazione delle cellule progenitrici endoteliali circolanti (EPC) (Asahara et al 1997) la genesi di nuovi vasi è ora ritenuta avvenire attraverso due possibili meccanismi ossia la vasculogenesi, che avviene durante lo sviluppo embrionale ed è caratterizzata dalla formazione di una rete vascolare primitiva, per opera di precursori delle cellule endoteliali chiamati angioblasti, e l'angiogenesi dove la crescita di nuovi vasi avviene grazie alla gemmazione di gettoni vascolari provenienti da vasi preesistenti.

Normalmente la proliferazione delle cellule endoteliali vascolari è trascurabile (<0,01% delle cellule endoteliali sono in ciclo). Il processo angiogenetico avviene quando le cellule endoteliali riemergono dal loro stato quiescente e proliferano rapidamente.

Fisiologicamente, il processo gioca un ruolo fondamentale nell'organogenesi embrionale mentre nella vita postnatale è strettamente controllato e volto alla riparazione delle ferite e alla ricostituzione endometriale nel periodo post mestruale del ciclo femminile. L'angiogenesi fisiologica è caratterizzata dalla capacità di auto limitarsi a differenza di quella patologica, tipica dei tumori che in genere sfugge alle complesse interazioni e modulazioni mediate da citochine e da varie espressioni geniche, sfociando in un'incontrollata proliferazione che favorisce l'invasione neoplastica e la formazione di metastasi a distanza. Da un punto di vista anatomico i vasi sanguigni di medio e grosso calibro presentano a livello dell'intima un endotelio circondato a sua volta da uno strato di periciti subendoteliali considerati essere loro stessi precursori endoteliali commissionati, cellule muscolari lisce, fibroblasti e da una membrana basale. Nel caso dei capillari, ossia di vasi con diametro compreso tra 8 e 20 μm , le cellule endoteliali con la membrana basale, costituiscono da sole la struttura vascolare.

Nello sviluppo embrionale le cellule endoteliali possono avere una differenziazione in senso sia arterioso sia venoso, lo stesso avviene nella retina neonatale e nel cuore dell'adulto, testimoniando l'estrema plasticità di queste cellule e prefigurandone le potenzialità terapeutiche (Stalmans, I. et al. 2002; Visconti, R.P. et al. 2002). Vasi arteriosi e venosi differiscono non solo per i diversi regimi pressori cui fisiologicamente sono sottoposti, e che si traducono in un differente spessore della tonaca muscolare, ma anche per la diversa origine ed identità delle loro cellule endoteliali e muscolari lisce. Infatti le cellule muscolari lisce che circondano i vasi del torace, derivano dalle cellule della cresta neurale mentre le cellule muscolari lisce delle coronarie derivano dall'epicardio ed altre provengono dal mesenchima (Carmeliet P et al. 2001). Non sono ancora conosciuti tutti i meccanismi che indirizzano le cellule alla differenziazione in senso arterioso o venoso, ma recenti studi di genetica hanno suggerito alcune vie. È stato mostrato come il sistema Notch con i suoi ligandi e recettori giochi un ruolo determinante nella differenziazione arteriosa sopprimendo quella venosa (Lawson, N. D. et al. 2001; Zhong, T.P. et al. 2001): mutazioni specifiche del recettore per Notch3 specifico delle cellule muscolari lisce, inducono l'instabilità di ancoraggio della cellula muscolare alla membrana basale e ne diminuisce

la sopravvivenza inducendo una degenerazione delle arterie cerebrali. Anche la neuropilina 1 (recettore specifico del VEGF-164) favorisce il destino arterioso delle cellule endoteliali. Inoltre i nervi periferici producendo VEGF forniscono un substrato molecolare per l'arteriogenesi.

I vasi sanguigni assumono, in tessuti diversi, funzioni specializzate e quindi anche le cellule endoteliali ivi residenti assumono specifiche proprietà.

A determinare l'organo-specificità dell'angiogenesi e la rispettiva eterogeneità delle cellule endoteliali, contribuiscono innanzi tutto l'attività e l'espressione dei fattori di crescita come VEGF e Ang-1 (angiopoietina 1) che sortiscono effetti diversi in tessuti differenti. Inoltre esistono fattori organo-specifici che guidano e regolano l'angiogenesi e che si mostrano promettenti per lo sviluppo di terapie volte alla rivascolarizzazione e riparazione dei tessuti. Tuttavia occorre anche un'organizzazione spaziale affinché la crescita angiogenetica sia funzionalmente valida demarcando i confini arteriosi e venosi e stabilendo quindi la polarità del vaso.

Il sistema dell'Efrina è coinvolto nell'organizzazione di tale polarità. L'EfrinaB2 è presente solo a livello delle cellule endoteliali e muscolari lisce che costituiranno la struttura arteriosa, mentre l'EfrinaB4, un recettore dell'EfrinaB2, è presente solo nelle vene. La loro interazione gioca un ruolo fondamentale nello stabilire l'identità arteriosa o venosa e partecipa alla formazione di anastomosi arteriose e venose arrestando la migrazione delle cellule endoteliali all'interfaccia arteriosa – venosa (Gerety S.S. et al 1999).

1.6 Tappe e regolazione del processo angiogenico

Lo stimolo cardine per l'espansione del letto vascolare è l'ipossia. Durante la vita embrionale, le cellule sono ossigenate dalla semplice diffusione del gas ma quando il tessuto neoformato inizia a crescere, l'insufficiente ossigenazione per semplice diffusione induce la sintesi di fattori (fattori indotti dall'ipossia HIF) (Pugh, C.W. et al. 2003) che promuovono l'up-regulation di molti geni coinvolti nell'angiogenesi, tra i quali spicca l'induzione del VEGF, e la mobilitazione di elementi cellulari circolanti che permettono lo sviluppo di vasi accessori. Le molecole che inducono l'espressione di tale fattore di crescita sono molteplici, come TGF- α , TGF- β (fattore di crescita trasformante), EGF (fattore di crescita epidermico), ma anche mediatori della risposta infiammatoria (IL e PGE2), IGF-1 (insulin-like growth factor 1), l'attivazione di protein-Kinasi C e A, e proteine regolatrici del ciclo cellulare (p53 e il soppressore del

gene di Von-Hippel-Lindau) (tabella 1). Il VEGF ha un ruolo essenziale nella regolazione dell'angiogenesi fisiologica e patologica. Ne esistono diverse isoforme, costituite rispettivamente da 206, 189, 165 e 121 amminoacidi. La specie molecolare predominante è VEGF-165. Tale fattore di crescita presenta i suoi recettori non solo sulle cellule endoteliali ma anche sui monociti e nelle cellule staminali emopoietiche dimostrando l'ampiezza del suo spettro di azione. In particolare vi sono due classi di recettori della famiglia delle tirosin-Kinasi: Flt-1 (espresso su cellule endoteliali vascolari, ad alta affinità) e Flk-1 (espresso su cellule endoteliali, tumorali e monociti, a bassa affinità). L'interazione con Flk-1 è seguita da proliferazione delle cellule endoteliali, mentre il legame con Flt-1 non è seguito da alcun effetto fitogeno, ma potrebbe attivare la migrazione monocitaria. E' stato riscontrato un aumento dei livelli di mRNA per VEGF anche in condizioni di deficit di glucosio, suggerendo che gli stimoli stressanti possano essere induttori del gene per VEGF. Un altro fattore, il PlGF (placental growth factor) omologo del VEGF, è considerato essere un potente attivatore diretto del segnale mediato dal VEGFR1 e dal VEGFR2. Oltre che amplificare gli effetti di VEGF, aumenta l'angiogenesi, ma contemporaneamente promuove una risposta proinfiammatoria portando a un'accelerazione della formazione di lesioni aterosclerotiche, probabilmente attivando i monociti VEGFR1 positivi. I membri della famiglia FGF (approssimativamente 23) sono delle proteine multifunzionali che si legano a diversi isoforme recettoriali la cui attivazione a livello delle cellule endoteliali, delle cellule muscolari lisce e dei mioblasti, stimola la proliferazione dei rispettivi tipi cellulari. In particolare FGF-2 è una molecola che si accumula nell'ECM (matrice extracellulare). Mostra in vivo attività angiogenica e induce la proliferazione cellulare. In vitro modula l'espressione delle integrine, VEGF, Flk-1. Interviene sia nell'angiogenesi fisiologica sia patologica. Vi sono infine anche altri fattori la cui funzione sembra essere per lo più il mantenimento del vaso neo formato. Infatti, il PDGF (platelet-derived growth factor), ha un ruolo essenziale nella stabilizzazione dei nuovi vasi, reclutando progenitori mesenchimali che esprimono il suo recettore e la cui assenza o scarsità determinerebbe anomala fragilità, permeabilità e conformazione dei neovasi. Le angiopoietine (Ang-1 e Ang-2 e recettori specifici Tie-1 e Tie-2) sono coinvolte nel mantenimento, crescita e stabilizzazione dei nuovi vasi, ma il loro ruolo è pleiotropico. Ang-1 promuove l'angiogenesi nella cute, nell'ischemia dell'anca, nell'ulcera gastrica e in alcuni tumori, ma la sopprime in altri tumori e nel cuore. Analogamente Ang-2 stimola la proliferazione di nuovi vasi nel cuore soltanto in

presenza di stimoli angiogenici sufficienti, trasformandosi alternativamente in fattore antiangiogenico. Infine il TGF β contribuisce alla maturazione dei neovasi a basse dosi, mentre ad alte dosi inibisce la crescita delle cellule endoteliali e promuove la riformazione della membrana basale e il reclutamento di cellule muscolari lisce.

Nel processo angiogenico si possono individuare alcune tappe essenziali:

1. Degradazione proteolitica della membrana basale del vaso originario, per consentire la formazione della gemmazione capillare e la successiva migrazione cellulare.
2. Migrazione delle cellule endoteliali verso lo stimolo angiogenico
3. Proliferazione delle cellule endoteliali dietro al fronte delle cellule migranti
4. Maturazione delle cellule endoteliali con inibizione della loro crescita e loro rimodellamento in tubi capillari.
5. Reclutamento delle cellule periendotheliali (periciti e cellule muscolari lisce).

Per iniziare la formazione dei nuovi capillari, le cellule endoteliali dei vasi sanguigni esistenti devono degradare la membrana basale e invadere lo stroma del tessuto adiacente.

Il rimodellamento della ECM richiede l'intervento di proteinasi, tra cui gli attivatori del plasminogeno e i loro inibitori, metalloproteinasi della matrice (MMP), inibitori tissutali delle metalloproteinasi (TIMPs), eparinasi, chimasi, triptasi e catepsine (Pepper, M.S. 2001, Jackson C. 2002, Luttun, A, et al 2000). In questo processo la matrice extracellulare (ECM) non viene soltanto degradata proteoliticamente per consentire il passaggio delle cellule endoteliali, essa subisce infatti anche variazioni nella sua composizione: alcune proteinasi espongono nuovi epitopi criptici delle componenti proteiche come il collagene IV o ne modificano la struttura (ad esempio da fibrillare a monomeric), inducendo in questo modo la migrazione delle cellule endoteliali e muscolari lisce.

L'intervento delle proteasi si traduce anche in un'ulteriore liberazione di fattori di crescita per le cellule endoteliali. Le modificazioni dell'ECM rappresentano una tappa necessaria alla formazione dei nuovi vasi, ma affinché siano efficaci devono mantenersi ben bilanciate con l'intrinseco ruolo della matrice stessa nel mediare i contatti tra le cellule endoteliali e i tessuti circostanti, impedendo il collasso dei vasi e fornendo un supporto-guida alla loro progressione. Le proteinasi hanno un importante ruolo anche nell'arrestare l'angiogenesi, liberando inibitori legati alla matrice che favoriscono un'autoregolazione del processo angiogenico. La successiva migrazione di un fronte

di cellule endoteliali che invade la matrice apre la strada ad un numero sempre maggiore di cellule endoteliali richiamate dalle sostanze e dalle citochine sopra citate. La maturazione e il rimodellamento di queste cellule è un requisito indispensabile per un'angiogenesi efficace, in quanto un insufficiente reclutamento delle cellule murali di sostegno è associato con proliferazione delle cellule endoteliali senza maturazione, permeabilità e fragilità vasale, sanguinamento, perfusione non bilanciata fino all'ipossia dei tessuti stessi. L'angiogenesi fisiologica è strettamente regolata ed ha una durata limitata. L'angiogenesi patologica al contrario, generalmente sfugge alle complesse interazioni che ne regolano la crescita sfociando in un anormale sviluppo angiogenico e caratterizza molte patologie di natura flogistica o neoplastica. Questa forma anomala di neovascolarizzazione è riscontrabile in vari ambiti in particolare cancro, e ultimamente anche le patologie ematologiche maligne.

1.7 Ruolo delle cellule endoteliali in Oncologia e Ematologia

Gli stessi meccanismi fisiologici per l'adattamento e la specializzazione delle funzioni della neovascolarizzazione sono alla base anche dei processi di anomala proliferazione vascolare nei tumori e nelle altre patologie in cui un'angiogenesi sregolata diventa parte integrante della patogenesi. Una serie sempre crescente di evidenze sperimentali ha messo in luce la presenza di una neo vascolarizzazione neoplastica con cellule endoteliali di origine midollare (Asahara T. et al 1999). L'area perineoplastica è teatro di una complessa interazione di carattere infiammatorio tra le cellule del tumore e i monociti e i granulociti dell'ospite.

I macrofagi inducono la proliferazione endoteliale e sono spesso ritrovati a stretto contatto con le pareti dei neo vasi, regolando di fatto l'angiogenesi attraverso la sintesi di TNF alfa o di trombospondina, e di VEGF; non solo, ma sono anche in grado di produrre fattori stabilizzanti il vaso come il PDGF ed il Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (Donovan M J et al 2000). Le metalloproteinasi come l'MMP9 sintetizzate dai neutrofili richiamati in loco svolgono un ruolo importante nel rimodellamento del vaso stesso e quindi nel processo angiogenetico. Queste sostanze, prodotte anche in varia misura dalle cellule neoplastiche stesse, avendo potere chemotattico, inducono, una mobilitazione delle cellule staminali emopoietiche dal midollo, precursori monocitoidi differenziati e le cellule endoteliali progenitrici le quali esprimono il recettore specifico VEGFR 2. A loro volta anche le cellule endoteliali liberano delle citochine come GCSF o GMCSF che promuovono il nuovo reclutamento

di cellule mieloidi, generandosi un circolo vizioso, che induce un aumento finale delle cellule endoteliali disponibili alla maturazione e alla formazione di neovasi che permettono l'espansione del letto vascolare neoplastico (figura 3).

Vi sono anche altre sostanze coinvolte in tale processo come il FGF considerato una delle più potenti molecole angiogenetiche in vivo che sembra essere liberato dalla ECM per mezzo di eparinasi e proteinasi prodotte in seno ai tumori, benché molte neoplasie possiedano la capacità di attivare e reclutare macrofagi attivandoli a secernere FGF. Il FGF rilasciato dai tumori, esercita un reclutamento selettivo sulle cellule vascolari, sebbene molti tipi di cellule siano fisiologicamente adatte per rispondere alla sua stimolazione. Ciò avviene probabilmente per l'attività inibitoria su queste ultime esercitata da altre molecole presenti nel tumore. Il FGF interferisce inoltre con l'adesione dei leucociti all'endotelio, producendo così una forma di tolleranza immunologica locale. Una volta formatosi il neovascolo, il suo rimodellamento avviene grazie alle angiopoietine: una famiglia di proteine ivi coinvolte con diverse funzioni.

L'angiopoietina-1 induce il reclutamento di periciti da parte delle cellule endoteliali e l'incorporazione nella parete dei vasi di cellule muscolari lisce. I vasi formati in questo modo nel tumore sono analoghi ai vasi che si formano per la riparazione di una ferita. L'angiopoietina-2 agisce invece respingendo il reclutamento dei periciti e delle cellule muscolari lisce. Essa viene prodotta dall'endotelio vascolare all'interno del tumore, ma non è chiaro come le cellule tumorali possano mediare questo processo. Sembra tuttavia che l'angiogenesi nei tumori possa essere più sensibile a certi inibitori, rispetto all'angiogenesi associata ai processi di riparazione delle ferite.

1.8 Densità dei microvasi e relazioni prognostiche in Oncoematologia

La densità dei microvasi è un fattore prognostico indipendente in diversi tipi di tumore maligno (tumori cerebrali, melanoma cutaneo, tumore della mammella).

L'informazione prognostica relativa al ruolo dell'angiogenesi in una determinata neoplasia viene acquisita su una microsezione istologica, esaminando l'area con la densità maggiore di microvasi ("punto caldo"). Queste aree potrebbero contenere il maggior numero di cellule tumorali in grado di indurre la neovascolarizzazione, che hanno la maggior possibilità di dare origine a metastasi angiogenetiche.

La densità dei microvasi è determinata principalmente dalla distanza intercapillare, ossia dallo spessore del manicotto di cellule tumorali che circondano un microvaso.

Nonostante il valore prognostico, la rilevazione della densità dei microvasi non è purtroppo un valido predittore del successo di un'eventuale terapia antiangiogenetica.

1.9 Tappe nello sviluppo angiogenetico tumorale

La maggior parte dei tumori umani è priva di attività angiogenica al momento dell'insorgenza, tuttavia questa fase, definita avascolare, esiste solo per un breve periodo di tempo. I carcinomi in situ avascolarizzati possono stimolare il proprio fabbisogno sanguigno stimolando la neovascolarizzazione nel letto vascolare adiacente (questo rappresenta il processo più comune nei tumori umani), subito dopo la neformazione acquisisce un fenotipo angiogenico.

L'acquisizione del fenotipo angiogenetico si manifesta clinicamente con l'aumento della massa tumorale a una dimensione rilevabile, con sanguinamento locale e con la comparsa di metastasi che avvengono sia per via ematogena (Zustovich et al. 2008) che per via linfatica.

Questa vascolarizzazione mostra due effetti contrapposti: da una parte la struttura della parete vasale può essere vista come ostacolo alla circolazione trans vascolare delle sostanze nutritive (ma anche di eventuali farmaci chemioterapici), dall'altra la presenza dei vasi permette un accesso alla neoplasia che quindi è favorita nella crescita e nello sviluppo di metastasi. I precursori cellulari endoteliali che si trovano in circolo e che provengono dal midollo osseo, possono venire incorporati in un gruppo di cellule in attiva angiogenesi (centro angiogenico). I tumori possono indurre la sovraespressione di un fattore angiogenetico (es. VEGF) da parte dei fibroblasti e macrofagi dell'ospite presenti all'interno del tumore stesso e i vasi sanguigni preesistenti possono essere cooptati dalle cellule tumorali. A livello molecolare questa svolta angiogenetica avviene con uno sbilanciamento nella produzione da parte delle cellule tumorali di molecole che regolano positivamente o negativamente l'angiogenesi.

La capacità angiogenetica può ulteriormente essere modificata da condizioni ambientali quali l'ipossia, da inibitori endogeni dell'angiogenesi e dalla predisposizione genetica dell'ospite. Anche alcuni inibitori endogeni dell'angiogenesi giocano un ruolo nell'acquisizione del fenotipo angiogenetico. La Trombospondina-1 è inversamente proporzionale alla capacità di una linea cellulare di dare origine a un tumore e a formare vasi in vivo. Inoltre la perdita di produzione di questa molecola permette a cellule non tumorigene di diventarlo. La trombospondina-1 è regolata dalla p53 normale. La perdita di funzione della p53 nelle cellule tumorali determina un drastico

decremento del livello di questo inibitore dell'angiogenesi. L'angiostatina, l'endostatina e l'antitrombina III antiangiogenetica inibitrice della produzione di vasi possono essere sintetizzati da alcuni tumori. La resezione di certi tumori (per es. Ca della mammella, Ca del colon e sarcomi dell'osso) può essere seguita da un rapido sviluppo di metastasi a distanza. Le metastasi di un tumore primitivo possono essere soppresse da un altro tipo di tumore (il tumore della mammella può inibire metastasi di un melanoma). La rimozione chirurgica di un tumore primitivo aumenta la rapidità di crescita di eventuali foci residui di malattia. Una volta osservato che una neoplasia produce sia regolatori positivi sia negativi dell'angiogenesi, diviene chiaro che un tumore primitivo, mentre stimola l'angiogenesi nel proprio compartimento vascolare, potrebbe inibire l'angiogenesi nel compartimento vascolare delle metastasi a distanza. Tuttavia per questo meccanismo sono necessarie almeno due condizioni: 1) il tumore primitivo necessiterebbe della produzione di un promotore angiogenetico in eccesso rispetto ad un inibitore, nel proprio letto vascolare; 2) l'inibitore putativo dovrebbe avere, in circolo, un'emivita maggiore del promotore angiogenetico. Ricerche compiute negli ultimi dieci anni hanno identificato l'angiostatina, l'endostatina e l'antitrombina antiangiogenetica come regolatori negativi dell'angiogenesi. Tutte e tre queste proteine inibiscono specificamente la proliferazione delle cellule endoteliali e non di altre cellule, non hanno alcun effetto diretto sulle cellule tumorali. Dopo che il tumore primitivo acquisisce proprietà neoangiogenetiche, il numero di cellule tumorali che passa in circolo aumenta proporzionalmente all'aumento della neovascolarizzazione. Le metastasi che sopravvivono a distanza devono a loro volta acquisire capacità angiogenetiche. Le metastasi non dotate di questa capacità rimangono infatti latenti e di grandezza microscopica (<0,2 mm) per un tempo indefinito. La neoangiogenesi è dunque necessaria sia nella diffusione sia per l'attecchimento e la crescita delle metastasi.

Le cinque forme di presentazione clinica delle metastasi, apparentemente non in relazione tra loro, potrebbero trovare una spiegazione unificante alla luce dei principi che regolano l'angiogenesi:

1. I pazienti nei quali compaiono le metastasi, talvolta in maniera esplosiva, dopo pochi mesi dalla rimozione chirurgica del tumore primitivo, potrebbero aver perso un inibitore circolante dell'angiogenesi prodotto dal tumore primitivo stesso.
2. Metastasi la cui crescita non viene soppressa dal tumore primitivo possono essere già presenti al momento della diagnosi.

3. Il modello “sconosciuto” o “occulto” descrive un tipo di metastasi che si presenta in assenza del tumore primitivo o prima che esso sia rilevato. Non è comunque ancora chiaro se le metastasi possano produrre un inibitore circolante dell’angiogenesi.
4. Se le metastasi non compaiono anche dopo anni dalla resezione chirurgica del tumore primitivo, il paziente potrebbe avere delle metastasi microscopiche o latenti, che non sono angiogenetiche. Quelle che dopo tempo virano verso un fenotipo angiogenetico possono crescere fino a diventare clinicamente rilevabili.
5. Dopo la rimozione chirurgica di alcuni tumori, le metastasi possono qualche volta regredire parzialmente o completamente. Una spiegazione è che le metastasi possano dipendere dall’elevata produzione, da parte del tumore primitivo, di uno stimolatore circolante dell’angiogenesi.

1.10 Angiogenesi nelle malattie ematologiche maligne

L’induzione dell’angiogenesi e la conseguente progressione della malattia sono il frutto di un delicato equilibrio tra elementi attivatori e inibitori dell’angiogenesi nel microambiente midollare. L’endostatina presenta un’attività anti-angiogenetica, bloccando l’attivazione delle proteine chinasi stimulate dai mitogeni nelle cellule endoteliali ed inibendo la proliferazione endoteliale. Lo sbilanciamento tra la produzione di fattori anti-angiogenetici e pro-angiogenetici coinvolge direttamente il processo angiogenetico e l’evoluzione della neoplasia. Abbiamo precedentemente accennato che tra gli attivatori più importanti vi sono il VEGF, il PDGF, l’FGF e il G-CSF. Gli inibitori del VEGF e della sua via di segnale mostrano uno spiccato effetto antitumorale in modelli sperimentali in presenza di altri attivatori dell’angiogenesi (Talks et al 2000, Shweiki et al 1992, Kim KJ et al, 1993). La sintesi di VEGF e di altri fattori angiogenetici come anche il FGF è stata dimostrata nelle cellule leucemiche, nel Linfoma non Hodgkin e nelle cellule del Mieloma (Chen H et al 2000, Aguayo et al 1999, Bellamy et al. 1999, Dankbar et al. 2000, Foss et al. 1997.). Le leucemie originano dalle cellule staminali emopoietiche bloccate nella loro maturazione in differenti stadi ed è stato assunto ormai che le forme più aggressive sono caratterizzate da alterazioni che coinvolgono le cellule a stadi più immaturi mentre le forme più indolenti coinvolgono elementi più terminali.

Nelle Leucemie Acute Mieloidi (LAM) l’angiogenesi ha dimostrato giocare un ruolo nella patogenesi della malattia. Recentemente Kuzu e collaboratori (Kuzu et al. 2004)

hanno dimostrato che la densità dei microvasi nelle biopsie ossee era maggiore rispetto ai controlli sani e ai pazienti trattati con chemioterapia.

Inoltre la presenza di elevata densità di microvasi costituiva un fattore prognostico addizionale negativo. L'espressione dei recettori per il VEGF è stato trovato anche nelle leucemie acute mieloidi (Aguayo et al 1999) dimostrando la diretta attività di questo peptide sulle cellule blastiche.

Altri studi hanno poi messo in evidenza come elevati livelli di VEGF si possano riscontrare nei pazienti affetti di LAM e come questo abbia un risvolto prognostico. Infatti, i blasti mieloidi sono in grado di produrre sia il VEGF sia il relativo recettore risultando in un meccanismo autocrino per la crescita e la propagazione tumorale (Zhang H et al. 2004). Inoltre il VEGF di origine leucemica è anche in grado di generare delle interazioni con le cellule stromali e di stimolare la produzione di fattori di crescita dalle cellule endoteliali umane le quali di converso promuovono la crescita dei blasti alimentando ancor di più il loop (figura 4).

Queste osservazioni inducono a ipotizzare un ruolo importante dei fattori anti-angiogenetici nel futuro del trattamento farmacologico specifico per le LAM. Come nel caso del Mieloma Multiplo anche nelle LAM sono stati misurati i livelli serici di VEGF e del proprio recettore e sono risultati significativamente più elevati che nei controlli sani ed era un fattore prognostico indipendente. Infine l'angiopoietina e il suo naturale antagonista (l'angiopoietina 2) sono noti giocare un ruolo determinante nell'angiogenesi normale e patologica. L'espressione di angiopoietina 2 è stata trovata essere più elevata nei pazienti affetti da LAM rispetto al gruppo di controllo sano ponendo in evidenza come l'espressione di angiopoietina 2 poteva essere anch'essa un fattore prognostico indipendente. Degno di nota infine è il fatto che elevati livelli di angiopoietina 2 nel midollo osseo indicano una prognosi favorevole nelle LAM trattate con polichemioterapia benché i meccanismi non siano ancora ben compresi (Schliemann et al. 2006, Loges et al. 2005).

Un aumentato livello di angiogenesi è stato documentato attraverso diversi esperimenti sia nel midollo sia nei linfonodi della Leucemia Linfatica Cronica (LLC). L'aumento della densità dei vasi sanguigni all'interno del midollo osseo di pazienti con LLC (Kini et al. 2000) ha suggerito che il processo angiogenetico possa giocare un ruolo anche nella leucemia linfatica cronica. I linfociti leucemici secernono spontaneamente una varietà di fattori pro e anti-angiogenetici tra cui il fattore di crescita endoteliale vascolare VEGF, il fattore di crescita dei fibroblasti (bFGF), il fattore di crescita trasformante α (TGF α 1) e

l'endostatina (Molica S. 2000). Benché il ruolo dell'angiogenesi nella fisiologia di questa malattia sia ancora oggi da chiarire, dati sperimentali suggeriscono che vi sono alcuni fattori angiogenetici che giocano un ruolo fondamentale nella progressione. Le cellule maligne della LLC producono il VEGF e loro stesse possiedono i recettori per VEGF (Bailey et al. 2004). Tale aspetto permette di avanzare l'ipotesi che anche per la LLC vi sia un meccanismo paracrino ed autocrino che possa contribuire almeno in parte alla progressione della malattia (Till KJ et al. 2005). Un elegante studio di Lee e collaboratori ha posto in evidenza il ruolo cruciale di VEGF nella LLC; egli somministrò VEGF esogeno alle cellule leucemiche le quali si dimostrarono più resistenti sia all'apoptosi naturale sia alla necrosi indotta da clorambucile (Lee et al. 2004). Una spiegazione dell'attività antiapoptotica è stata data da Farahani, Till e collaboratori i quali hanno dimostrato come il VEGF autocrino abbia un effetto attraverso il legame con il CD40, e come sia anche coinvolto nella motilità delle cellule leucemiche attraverso l'endotelio (Farahani et al. 2005). Di converso, l'inibizione della sintesi di VEGF inibiva sia la migrazione sia l'effetto antiapoptotico. Il VEGF interagisce con tre diversi recettori tirosin-chinasici: VEGFR-1 o Flt-1 (fms-like tyrosine kinase), VEGFR-2 o Flk-1/KDR (kinase-insert-domain-containing-receptor) e VEGFR-3 o Flt-4 (fms-like tyrosine kinase). Tutti questi recettori hanno un'elevata affinità per VEGF e ricoprono un ruolo importante nella formazione de novo di vasi sanguigni e nello sviluppo delle cellule emopoietiche. I recettori solubili VEGFR-1 e VEGFR-2 sono entrambi misurabili nel siero di pazienti di LLC. La concentrazione del VEGFR-2, ma non di VEGFR-1, è significativamente maggiore nei pazienti con stadi avanzati di malattia (Rai III e IV) rispetto ai casi con Rai 0, I o II. Per quanto concerne il VEGF, sono stati osservati livelli più alti nei pazienti di LLC rispetto ad un gruppo di volontari sani. Inoltre, tra i casi di LLC, i valori di questa citochina sono risultati significativamente più elevati negli stadi più avanzati di malattia (Gora-Tybor et al. 2003). Questi risultati suggeriscono che il pathway controllato da VEGF/VEGFR-2, ma non da VEGFR-1, potrebbe essere essenziale nello sviluppo della malattia, soprattutto negli stadi più avanzati. Aguayo et al. hanno, però, mostrato che livelli intracellulari aumentati di VEGF correlano con un decorso meno aggressivo della LLC (Aguayo et al. 2000). Tuttavia, la concentrazione sierica di VEGF dipende da varie fonti cellulari perché la citochina è prodotta da macrofagi, fibroblasti e cellule endoteliali nei tessuti sani, ma anche dalle cellule B di LLC. Il bFGF presenta attività mitogena sulle cellule endoteliali in maniera paracrina ed in maniera autocrina sulle cellule leucemiche, inibendo i meccanismi pro-apoptotici e quindi aumentando la loro sopravvivenza. Per

questi motivi il bFGF potrebbe rivestire un ruolo importante nella fase di progressione della LLC, quando il tempo di raddoppiamento dei linfociti è breve e si ha espansione dei tessuti linfoidei e neovascolarizzazione. Infatti nei pazienti affetti da LLC in progressione, i livelli di bFGF erano significativamente elevati e che il valore è nettamente superiore nei pazienti classificati in stadi Rai avanzati e nei pazienti in fase di progressione di malattia (Gora-Tybor et al 2003). Per di più i livelli sierici di CD138 erano aumentati negli stadi precoci della malattia e potevano avere un valore prognostico positivo. Sono state osservate concentrazioni significativamente più alte di TGF β 1 nel siero di pazienti non trattati rispetto ad un gruppo di volontari sani. E' stata evidenziata, inoltre, una stretta correlazione tra livelli di TGF β 1 e stato di progressione della malattia. Al contrario, i livelli di questa citochina sono più bassi nei pazienti in stadi più avanzati di LLC. Questo dato non è inaspettato perché il TGF β 1 non è solo una molecola con attività pro-angiogenetica, ma anche un inibitore autocrino della proliferazione dei linfociti. In conclusione, i livelli di TGF β 1 sono più bassi nei pazienti di LLC in stadi avanzati mentre il valore di bFGF è significativamente più elevato nello stesso gruppo di pazienti. Lo sbilanciamento tra queste citochine potrebbe influenzare notevolmente l'angiogenesi ed il decorso clinico del paziente.

A livello microscopico è stata osservata nel Mieloma Multiplo una certa aumentata densità di vasi nel midollo in comparazione con i controlli sani (Vacca et al. 1994) e come tale densità potesse essere considerata un marcatore prognostico avverso della malattia (Munshi et al. 1998, Munshi et al. 2001), risultando di fatto correlabile ad un aumentato coinvolgimento osseo in senso osteolitico. Da questi primi studi è dunque risaltato il possibile nesso tra un'aumentata angiogenesi e un maggiore potenziale distruttivo del Mieloma.

Come prima accennato, gli osteoclasti svolgono un ruolo importante nella formazione della nicchia midollare attraverso meccanismi paracrinici e d'interazione con le cellule staminali emopoietiche producendo anche fattori pro angiogenesi in particolare proprio nel Mieloma Multiplo. In questa emopatia i livelli midollari di peptidi angiogenetici sono significativamente più elevati rispetto al sangue circolante ed entrambe i compartimenti presentano quantità elevate rispetto al sangue e midollo di volontari sani. Il VEGF prodotto in vitro dalle cellule del Mieloma possono stimolare a loro volta le cellule stromali a produrre IL 6 la quale agisce a sua volta proprio sulle cellule del Mieloma con un meccanismo paracrinico di attivazione e generando il cosiddetto loop. A contribuire a questo meccanismo sono anche le cellule endoteliali stesse che producono IL 6, GCSF e

IL 7 contribuendo al loop. In anni recenti sono stati trovati anche molti fattori antiangiogenetici come l'interferone alfa o gamma ma anche alcuni peptidi che contribuiscono al clivaggio proteolitico delle proteine della membrana basale dei capillari (angostatina, endotastina etc.) (Talk et al. 2000, Dameron et al. 1994, Zhang et al. 2000). Nel Linfoma non Hodgkin, un' aumentata densità vascolare è strettamente correlata con le varianti più maligne (Foss et al., Vacca et al. 1999). Questa osservazione era supportata dalla presenza di elevati livelli plasmatici di VEGF e di bFGF nei pazienti affetti da linfoma all'esordio e come potevano rappresentare un fattore prognostico indipendente; inoltre l'aumento simultaneo sia di VEGF che di bFGF nel sangue periferico caratterizza un subset di pazienti con una sopravvivenza ancora più corta.

Una certa vascolarizzazione è stata trovata anche nel linfoma di Hodgkin caratterizzato da un'elevata densità microvascolare. Presi tutti assieme questi dati sul linfoma dimostrato come la linfoangiogenesi è particolarmente sviluppata nelle linfopatie maligne e che potrebbe essere indotta sia dalla produzione di VEGF da parte delle cellule del linfoma stesso.

Oltre a tali fattori antiangiogenetici anche i recettori solubili stessi per il VEGF possono avere attività antiangiogenetica poiché, legandosi al loro substrato, ed essendo solubili, impediscono il legame con recettori simili presenti sulla superficie cellulare che attiverebbero la cascata biochimica pro-angiogenetica.

In oncologia ma ancor più in ematologia, sono state identificate delle alterazioni cromosomiche (del 13 q-, 17 p-, traslocazioni, etc) che costituiscono un importante fattore prognostico predittivo della patologia di base. La delezione 17p-, ritrovata nelle leucemie, nelle mielodisplasie e nei linfomi, il cui significato si esplica nella non espressione della proteina pro apoptotica p53, induce uno spegnimento della sintesi di un importante fattore antiangiogenetico, la trombospondina, (Yu et al 2002). In particolare la delezione 13 q- nel Mieloma Multiplo che correla con una cattiva prognosi è stato dimostrato essere associato con un'alta densità di microvasi se comparati con casi di Mieloma senza la delezione in oggetto. (Schreiber et al. 2000).

La matrice extracellulare e gli enzimi coinvolti nel rimodellamento giocano un ruolo importante nel regolare il comportamento cellulare durante il processo angiogenetico. Infatti in molte neoplasie si assiste alla sintesi di pro-MMP soprattutto nelle Leucemie Acute Linfoblastiche, Mieloidi, linfoma non Hogkin e Mieloma Multiplo (Stetler-Stevenson et al. 1997, Barille et al. 1999, Kuittinen et al. 2001).

1.11 Terapia antiangiogenetica in oncoematologia

L'emergenza della farmaco resistenza nelle cellule tumorali è uno dei maggiori problemi che accompagnano quasi tutte le chemioterapie. La causa principale di questo meccanismo di aumentata sopravvivenza delle cellule neoplastiche è costituita dalla loro intrinseca instabilità genetica, da cui dipende conseguentemente l'alta frequenza di mutazioni all'interno della neoplasia.

Le cellule endoteliali vascolari non possiedono questa instabilità ed hanno pertanto una bassa frequenza di mutazioni che potrebbe portarle da un fenotipo suscettibile ad uno resistente alla chemioterapia convenzionale. E' possibile dunque che anche le cellule dei vasi tumorali mantengano nel tempo la sensibilità alla terapia antiangiogenetica.

Inoltre l'attività antitumorale di alcuni farmaci chemioterapici citotossici può dipendere proprio in parte dalla loro capacità di inibire la proliferazione delle cellule endoteliali. Le cellule endoteliali dei vasi tumorali risultano esposti ai farmaci antitumorali prima delle cellule tumorali vere e proprie. Tuttavia queste stesse cellule endoteliali hanno anche la capacità di riprendere a proliferare più rapidamente delle cellule tumorali, tornando a supportare la massa neoplastica prima che siano trascorse le convenzionali due o tre settimane di sospensione della terapia, attuate per consentire la ripresa midollo osseo. La recidiva del tumore rende quindi necessari nuovi cicli di chemioterapia, con il rischio di selezionare così cloni cellulari tumorali (non endoteliali) resistenti.

Questo meccanismo pone in rilievo l'importanza della scelta di un adeguato schema di somministrazione della terapia. Se questo schema viene modificato in maniera da esercitare la massima pressione citotossica sulle cellule endoteliali vascolari anche tumori di grosse dimensioni possono essere eradicati in maniera permanente.

La nuova logica prevede dunque la somministrazione di farmaci convenzionali con il nuovo scopo di sopprimere l'angiogenesi tumorale, tenendo presente che le proprietà antiangiogenetiche di questi farmaci si manifestano soltanto se essi vengono somministrati frequentemente e quindi con dosaggi inferiori.

Ogni tumore è costituito da almeno due bersagli cellulari distinti suscettibili di terapia: il compartimento delle cellule endoteliali e il compartimento delle cellule tumorali. La terapia complessiva della neoplasia potrebbe essere più efficace se ciascuna di queste due popolazioni cellulari venisse trattata con farmaci distinti e con bersagli selezionati, avvalendosi del vantaggio della stabilità genetica delle cellule endoteliali, garanzia di una buona suscettibilità cellulare anche dopo lunghi periodi di somministrazione del farmaco.

I farmaci di sintesi che possono essere coinvolti nel trattamento antiangiogenetico comprendono fattori che interferiscono con la cascata angiogenetica in particolare inibendo la via del segnale del VEGF o le interazioni della matrice extracellulare; vi sono infine anche sostanze come l'IL12 il cui meccanismo antiangiogenetico è ancora oscuro (tabella 2, figura 5). In molti studi è stato dimostrato come questi farmaci possano avere un effetto additivo se associati alla chemioterapia convenzionale. Tuttavia anche nel caso di queste terapie innovative è stato osservato un certo grado di resistenza indotta o acquisita soprattutto per over espressione dei fattori angiogenetici (con effetto antagonista nel caso dell'apoptosi visto che il VEGF presenta proprio attività antiangiogenetica) o anche per la eterogeneità del meccanismo angiogenetico nei differenti organi o nei differenti stadi tumorali. L'utilizzo dell'INF nelle patologie ematologiche ha giocato un ruolo significativo nel trattamento standard di alcune emopatie come la Leucemia Mieloide Cronica, il Linfoma ed il Mieloma Multiplo. Gli interferoni hanno mostrato una certa attività anti angiogenetica sia in vivo che in vitro (Puduvalli et al. 2000, Heyns et al. 1985, Singh et al. 1995). Più recentemente è stato dimostrato l'effetto antiangiogenico della talidomide nel Mieloma aumentando l'efficacia sia della chemioterapia convenzionale sia del trattamento steroideo. La talidomide è risultata anche efficace nelle Leucemie Acute Mieloidi (Stein et al. 2002).

Nel campo dei tumori solidi si è assistito in questi ultimi anni a un vertiginoso sviluppo della terapia antiangiogenetica. Studi clinici con inibitori della via VEGF sembrano essere promettenti nelle patologie ematologiche maligne con espressione del VEGF.

In particolare sono state sintetizzate e messe già in commercio molecole inibitrici di alcune chinasi coinvolte nella proliferazione del tumore e nell'angiogenesi neoplastica (Sorafenib e Sunitib) inclusi proprio il recettore per il VEGF, (lui stesso una chinasi) ed il PDGF-R che hanno già mostrato la loro efficacia nel tumore del rene a cellule chiare e si sta anche per valutare il loro sinergismo con la chemioterapia convenzionale in campo ematologico. In conclusione vi è ormai evidenza che l'angiogenesi nelle malattie ematologiche non è un mero epifenomeno ma anche una parte critica nello sviluppo della malattia. L'angiogenesi ha valore prognostico e si è dimostrata un possibile target della terapia specifica generando un argomento "caldo" della moderna ricerca farmaceutica come anche semplificato in figura 6 dove si evidenziano i numerosi farmaci rivolti verso differenti fasi della trasduzione del segnale del VEGF, nelle complesse interazioni molecolari che coinvolgono l'angiogenesi neoplastica .

PARTE SPERIMENTALE

Introduzione

Nel 1973, Hladovec e Rossman hanno rilevato cellule con caratteristiche endoteliali circolanti nel sangue (Ingram D.A. et al. 2005) e durante l'ultima decade è stato evidenziato che il numero delle CEC risulta aumentato in alcuni tipi di neoplasie (Mancuso P. et al. 2001) ed in diverse condizioni patologiche infiammatorie, infettive, ischemiche o autoimmunitarie. Alcuni studi hanno, infatti, mostrato che cellule endoteliali derivanti dal midollo osseo contribuiscono al fenomeno angiogenetico tumorale (Mancuso P et al. 2001) e che pazienti in fase di progressione tumorale hanno livelli di CEC nel sangue più elevati rispetto a pazienti in cui la patologia è in fase di remissione o a volontari sani (Beerepoot LV et al. 2004), dimostrando che un aumento dei valori di cellule endoteliali circolanti è indice di progressione tumorale. Inoltre è stata notata una significativa relazione tra livelli plasmatici di VEGF e numero di CEC, suggerendo che le cellule endoteliali circolanti possano essere utilizzate come marcatori del processo angiogenetico (Mancuso P, et al. 2003). Tra le cellule endoteliali circolanti alcune mostrano le caratteristiche tipiche di cellule mature/differenziate, mentre altre esprimono antigeni tipici di cellule staminali/progenitrici, indicando che la vasculogenesi (la generazione di vasi de novo guidata da una cellula progenitrice) non è limitata solamente al periodo dello sviluppo embrionale e che queste cellule endoteliali progenitrici circolanti (EPC) potrebbero risiedere nei siti in cui avviene l'angiogenesi e partecipare alla formazione di nuovi vasi sanguigni nell'adulto, in particolare a livello della massa neoplastica. E' stato inoltre dimostrato che le CEC derivano dalle pareti dei vasi sanguigni ed hanno una limitata capacità proliferativa, mentre le EPC, derivando probabilmente dal midollo osseo, hanno un elevato potenziale di proliferazione (Lin Y et al. 2000).

Le cellule endoteliali di origine midollare possono pertanto contribuire all'angiogenesi neoplastica (Lyden D. et al. 2001, Hilbe W et al. 2004, Peters BA et al. 2005), come anche suggerito dal fatto che nel sangue periferico dei pazienti affetti da tumore vi è una quantità crescente di cellule endoteliali circolanti (CEC) (Mancuso P. et al. 2001). Evidenze crescenti suggeriscono che l'angiogenesi sia coinvolta nella patogenesi delle malattie ematologiche maligne inclusi il Mieloma Multiplo (MM), le Leucemie Acute Mieloidi (LAM), le sindromi mielodisplastiche (MDS), la Leucemia Linfatica Cronica (LLC) (Go RS et al. Ann Hematol 2008). Dati recenti hanno anche mostrato che le cellule EC microvascolari nei linfomi sono in parte tumore correlate, riflettendo un nuovo aspetto dell'angiogenesi tumorale (Streubel B. et al. 2004). Presi tutti assieme questi dati

suggeriscono che le neoplasie possono permettere la gemmazione di nuovi vasi da capillari esistenti attraverso la secrezione di fattori angiogenetici (Carmeliet P et al. 2000) e che in alcuni casi, le cellule neoplastiche possono anche mimare le attività delle EC partecipando nella formazione di nuovi net-work simil vascolari (Streubel B. et al. 2004, Hendrix MJ et al. 2003).

Nel mieloma multiplo (MM), la proliferazione e la sopravvivenza delle plasmacellule è regolata dal microambiente midollare, in particolare dai fattori citochinici midollari e la neoangiogenesi è ritenuta avere un ruolo chiave nella patogenesi e nella progressione della malattia (Hideshima T et al. 2004).

In pazienti con Mieloma Multiplo, i livelli di CEC sono più elevati che nei controlli e correlano positivamente con i livelli serici della componente monoclonale e della beta2microglobulina rappresentando un marcatore vascolare che riflette la massa tumorale e la prognosi (Zhang H et al. 2005). Nelle Leucemie Acute Mieloidi (LAM) e nelle Sindromi Mielodiploplastiche (MDS) è stata mostrata un'avascularità e la presenza di fattori angiogenetici a livelli elevati in moltissimi pazienti (Aguayo A et al. 2000, Hussong et al. 2000), mentre i fattori angiogenetici derivati dalle cellule blastiche come il VEGF sono fattori indipendenti dell'esito e della progressione della malattia (Aguayo A et al. 1999). E' stato anche dimostrato che le cellule blastiche leucemiche non solo producono fattori angiogenetici ma anche esprimono selettivamente i loro rispettivi recettori generando un loop autocrino che promuove il processo leucemogeno (Fiedler W. et al. 1997). Alcuni studi hanno suggerito che le cellule endoteliali derivate dal midollo osseo (EPC) possono contribuire alla progressione dell'angiogenesi del tumore (Lyden D. et al. 2001, Hilbe W et al. 2004, Peters BA et al. 2005), e che nel sangue periferico dei pazienti affetti da neoplasia vi è un'aumentata concentrazione delle cellule endoteliali circolanti (CEC) (Mancuso P. et al. 2001) che possono partecipare alla formazione di nuovi vasi (Beerepoot LV et al. 2004). Nel modello animale di leucemia è stata anche dimostrata sia una via autocrina (EC indipendente) che una via paracrina (EC dipendente); il sistema VEGF e il suo recettore (VEGF/VEGFR) contribuiscono al processo leucemogeno suggerendo che entrambe i loops angiogenetici devono essere bloccati per raggiungere risultati terapeutici a lungo termine (Dias S et al. 2000). L'angiogenesi è stata rilevata anche nella Leucemia Linfatica Cronica B (LLC B), supportata dalla presenza di aspetti di neovascolarizzazione nel midollo osseo e nei linfonodi (Kimi AR et al. 2000). Anche in questo caso una via autocrina del segnale è stata suggerita coinvolgendo sempre il sistema VEGF/VEGFR2.

Presi tutti assieme questi dati suggeriscono che le cellule tumorali possono permettere la formazione di nuovi vasi da capillari esistenti non solo attraverso la secrezione di fattori angiogenetici (Carmeliet P. 2000) ma anche in alcuni casi mimando le attività delle EC e partecipando alla formazione di networks simil vascolari (Hendrix MJ et al. 2003).

Per chiarire se le CEC nel MM, nelle LAM sono di derivazione neoplastica abbiamo valutato 5 pazienti con MM e 3 con gammopatia monoclonale di inecerto significato (MGUS) con del 13q-, 7 pazienti con LAM con differenti aberrazioni citogenetiche, e cercato di caratterizzare le CEC isolandole dal sangue periferico con metodica immunomagnetica e caratterizzandole con analisi immunofenotipiche, FISH e studi di genetica molecolare (studio limitato ai casi di MM e MGUS). In corso di completamento è infine uno studio più ampio eseguito su 74 pazienti affetti dal Leucemia Linfatica Cronica di tipo B (LLC B) volto alla caratterizzazione clinica e biologica delle CEC nella LLC di tipo B mediante le stesse metodiche sopradescritte associate alla valutazione del profilo di espressione genica di 12 campioni di cellule endoteliali circolanti ottenuti da tali pazienti attraverso l'utilizzo di microarrays contenenti circa 33.000 geni e successivamente comparato con il profilo di espressione genica di 2 volontari sani.

MATERIALI E METODI

2.1 La popolazione di pazienti presa in esame

- Studio sul Mieloma Multiplo: sono stati studiati 5 casi con Mieloma Multiplo che presentavano la delezione del cromosoma 13q14 associando 3 casi di MGUS anch'essi recanti la suddetta lesione cromosomica; come controllo sono stati utilizzati altri 5 casi di MM senza la delezione 13q14 (le caratteristiche cliniche e di laboratorio sono riassunte nella tabella n. 3).
- Nello studio sulle Leucemie Acute Mieloidi sono stati valutati 7 pazienti con aberrazioni cromosomiche note utilizzate come marcatore e come controllo sono stati utilizzati altri sette volontari sani (le caratteristiche cliniche e di laboratorio sono riassunte in tabella n.4).
- Nello studio sulle Leucemie Linfatiche Croniche sono stati reclutati 74 pazienti con aberrazioni cromosomiche note utilizzate come marcatore e 10 campioni ematici provenienti da altrettanti volontari sani (le caratteristiche cliniche sono riassunte in tabella 5).

2.2 Caratterizzazione immunofenotipica delle cellule endoteliali circolanti nel Mieloma Multiplo, nelle Leucemie Mieloidi Acute e nella Leucemia Linfatica Cronica.

Le CEC erano isolate, come precedentemente descritto (Bardin N et al. 1996). In breve 20 ml di sangue periferico era stato prelevato al momento dell'arruolamento e le CEC erano isolate con metodica immunomagnetica per mezzo di biglie magnetiche IgG pan mouse (Dynal A.S. Oslo, Norvegia) attraverso 2 passaggi. Per eliminare le cellule emopoietiche che erano CD45+ e per isolare le CEC CD45-, è stata eseguito inizialmente una selezione negativa con biglie magnetiche previa incubazione con anticorpo anti CD45 (clone 2D1: Becton Dickinson, Milano Italia). Le cellule CD45- erano quindi sottoposte a una selezione positiva con biglie magnetiche previa incubazione con anticopro anti CD146 (Clone P1H12; Becton Dickinson, Milano Italia. Il CD146 (anche noto come MCAM, MUC18, S-endo-1 e Mel-CAM 9) è un antigene espresso nelle cellule endoteliali, in modo eccezionale nella cellule stromali, nelle cellule della muscolatura liscia, nelle cellule follicolari dendritiche ed in alcune linee tumorali (Bardin N et al. 1996). La sua assenza nelle cellule emopoietiche lo rende pertanto utile per suddividere il tessuto endoteliale da quello ematologico stretto (Bardin N et al 1996). Per una migliore caratterizzazione delle cellule isolate con metodica immunomagnetica le cellule erano poi marcate con la lectine Ulex Europeus 1 (UEA-1: Dako, Milano Italia), seguito dalla coniugazione con immunoglobuline di maiale anti- coniglio a sua volta coniugato con il fluorocromo verde FITC (Dako), sono stati inoltre valutati i seguenti marcatori tra loro associati: anticorpo anti coniglio anti VEGFR2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA), seguita dalla marcatura con immunoglobuline di maiale anti- coniglio a sua volta coniugato con il fluorocromo verde FITC (Dako) in combinazione con anticorpo murino anti uomo per il fattore di Von Willebrand (vWF) (Dakop) seguito da immunoglobuline di coniglio anti topo coniugato con fluorocromo TRITC (Dako); anticorpo anti CD144 di coniglio (anche detto VE caderina; Serotec, Oxford, Regno Unito) in combinazione con Ac anti vWF a loro volta marcati con anticorpi anti topo di coniglio coniugati con TRITC; anticorpo anti uomo di topo per il vWF marcato con immunoglobuline di coniglio anti topo marcate con fluorocromo FITC (Dako) in combinazione con anticorpi anti CD138 (clone BB4; Beckman Coulter, Milano, Italia) coniugato con phitoeritrina (PE rosso); anticorpo anti vWF di topo anti uomo coniugato con anticorpo anti topo di coniglio coniugato con FITC in associazione a anticorpo anti CD38 di topo coniugato con PE (clone HB7; Becton Dickinson); infine anticorpo anti CD45 di topo (clone 2D1) coniugato con FITC (verde) in

associazione con anticorpo anti CD 14 coniugato con PE (rosso) (clone MoP9; becton Dickinson). La valutazione dell'immunofenotipo è stata eseguita utilizzando un microscopio a fluorescenza con appropriato hardware e software (Cytovision System, Applied Imaging; Nikon Firenze Italia).

2.3 Analisi FISH delle cellule endoteliali circolanti nel Mieloma Multiplo, nelle Leucemie Mieloidi Acute e nella Leucemia Linfatica Cronica.

L'ibridazione in situ a fluorescenza (FISH, Fluorescence In Situ Hybridization) è stata utilizzata per identificare le anomalie citogenetiche presenti nelle cellule endoteliali circolanti precedentemente separate con l'ausilio delle biglie immunomagnetiche. Tali anomalie hanno pertanto permesso l'identificazione delle cellule endoteliali che esprimevano anche la stessa lesione citogenetica della patologia ematologica di base. Sono stati utilizzati i vetrini preparati in precedenza, contenenti quindi cellule in interfase, e sonde fluorescenti adatte all'analisi delle anomalie più frequenti riscontrate.

Per i casi di Mieloma Multiplo e di MGUS sono state utilizzate le seguenti sonde: 13q- (Vysis® LSI® D13S25 (13q14.3) SpectrumOrange™ Probe, Abbott Laboratories, Illinois, USA), 10 (CEP 10 Spectrum green alfa satellite 10p11.1-q11.1, Vysis Downers Grove Illinois USA). Per i casi di Leucemia Acuta Mieloide sono state utilizzate le seguenti sonde: + 8 (direct red chromosome 8 alfa satellite probe D8z1; Q-BIO Gene, Cambridge, UK), + 11 (CEP 11 Spectrum Orange satellite DNA probe kit D11Z1, Vysis Downers Grove Illinois USA), t(15;17) (LSI PML/RARA dual color translocation probe, Vysis® LSI®, Abbott Laboratories Illinois, USA), t(9;22) (LSI BCR/ABL dual color translocation probe, Vysis® LSI®, Abbott Laboratories Illinois, USA), 7- (CEP 7 Spectrum orange Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit, Abbott Laboratories, Illinois, USA). Per i casi di Leucemia Linfatica Cronica sono state utilizzate le seguenti sonde: +12 (CEP 12 SpectrumOrange Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit, Abbott Laboratories, Illinois, USA), 11q- (Vysis® LSI® ATM (11q22.3) SpectrumOrange™ Probe, Abbott Laboratories, Illinois, USA), 6q- (Vysis® LSI® MYB (6q23) SpectrumAqua™ Probe, Abbott Laboratories, Illinois, USA), 13q- (Vysis® LSI® D13S25 (13q14.3) SpectrumOrange™ Probe, Abbott Laboratories, Illinois, USA), 17p (Vysis® LSI® p53 (17p13.1) SpectrumOrange™ Probe, Abbott Laboratories, Illinois, USA), 14q32 (Vysis® LSI® IGH/MALT1 t(14;18) (q32;q21) Dual Color, Dual Fusion Translocation Probe, Abbott Laboratories, Illinois, USA).

2.4 Quantificazione delle cellule endoteliali circolanti mediante analisi citofluorimetrica

Lo studio eseguito sui casi di LAM, oltre alla ricerca delle cellule endoteliali circolanti e alla loro caratterizzazione immunofenotipica e genetica ha anche cercato di misurare le quantità di cellule progenitrici endoteliali (EPC) sulla totalità delle cellule circolanti endoteliali (CEC), correlando la loro quantità con la risposta o meno al trattamento specifico. L'espressione del CD133 sulla superficie delle cellule gioca un ruolo fondamentale nell'identificazione di una quota progenitrice nell'insieme delle CEC, definite appunto cellule progenitrici endoteliali (EPC). La conta delle EPC e delle CEC era stata allestita su sangue periferico con quadruplici marcatura con anticorpi anti CD31 coniugato con fluorocromo FITC verde (clone WM59; Becton Dickinson), anticorpo anti CD34 coniugato con fluorocromo PerCP viola (clone 8G12; Becton Dickinson), anticorpo anti CD45 coniugato con fluorocromo APC magenta (clone 2D1; Becton Dickinson), anticorpo anti CD133 coniugato con fluorocromo PE rosso (clone AC 133; Mylteni Biotec, Bergish Gladbach Germany), anticorpo anti CD146 coniugato con fluorocromo PE rosso (clone PIH12; Becton Dickinson), anticorpo anti VEGFR2 di coniglio (Santa Cruz, Biotechnology ; Santa Cruz, CA, USA) seguito da coniugazione con anticorpo di maiale anti immunoglobulina di coniglio (DAKO, Milano, Italia) come reagente secondario. Le cellule progenitrici endoteliali (EPC) erano definite come esprimenti contemporanea fluorescenza per il CD34, VEGFR2 e CD133 mentre erano negative per il CD45; di converso le cellule circolanti endoteliali (CEC) erano definite se presentavano fluorescenza per il CD 31 e CD146 e CD34 mentre erano CD45 negative. L'acquisizione è stata effettuata con il citofluorimetro a flusso FACSCalibur (Becton Dickinson) e con l'ausilio del software CELLQUEST (Becton Dickinson) a 4 colori con gate combinati. Basandosi sull'espressione del CD133, antigene gradualmente perduto durante la differenziazione e la maturazione della cellula endoteliale, è stato calcolato un EPC ratio, definito come il rapporto percentuale di CEC CD133 positive/percentuale di CEC CD133 negative. La percentuale di cellule positive era calcolata sottraendo il valore di appropriati isotipi di controllo. La percentuale specifica delle cellule positive era poi convertita in numero assoluto di cellule CD133+/uL utilizzando la seguente formula: percentuale di cellule positive CD133 x conta assoluta di globuli bianchi/100.

Analogo procedimento citofluorimetrico è stato seguito per i casi di LLC dove le cellule endoteliali circolanti sono state definite dall'espressione o meno dei seguenti marcatori : CD45- (marcatore delle cellule emopoietiche), CD34+ (marcatore delle cellule staminali),

VEGFR-2/KDR/Flk-1+ (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2), CD133+ (marcatore delle cellule endoteliali immature, che viene perso durante la differenziazione).

2.5 Validazione con tecnica citofluorimetrica dei risultati degli studi di espressione genica

Nei casi di LLC è stato anche eseguito lo studio di espressione genica effettuato presso il Centro Oncologico Modenese (Modena) comparando i profili d'espressione delle cellule endoteliali circolanti (CEC-LLC) dei pazienti affetti da LLC con quelli dei linfociti B degli stessi pazienti e tra le CEC-LLC e le CEC di volontari sani. L'analisi ha evidenziato differenze di espressione in numerosi geni. Poiché a livelli di mRNA differenti tra le varie popolazioni cellulari potrebbero non corrispondere diverse quantità di proteina effettivamente espressa, i risultati ottenuti sono stati confermati mediante la tecnica citofluorimetrica.

E' stata validata la differente espressione dei geni codificanti per l'antigene CD61, del quale è stata trovata una diversa espressione nelle CEC dei pazienti affetti da LLC nei confronti dei linfociti B degli stessi pazienti, e per il VEGFR-1/FLT-1, che è risultato differentemente espresso nelle CEC-LLC rispetto alle CEC dei volontari sani.

La differenza di espressione di queste due proteine nelle varie popolazioni cellulari è stata evidenziata attraverso una tecnica citofluorimetrica a quattro colori. Per verificare l'espressione dell'antigene CD61 sono state effettuate due marcature quadruplici sul sangue periferico dei pazienti affetti dal LLC, al fine di distinguere la differente espressione tra linfociti B e cellule endoteliali circolanti. Sempre marcature quadruplici sono state effettuate sul sangue periferico dei pazienti affetti da LLC e su quello derivante dai volontari sani, affinché potesse essere dimostrata la diversa espressione del VEGFR-1/FLT-1 nelle cellule endoteliali circolanti di LLC e di persone sane. I linfociti B di LLC sono stati definiti come: CD5+ (marcatore tipico dei linfociti B di LLC), CD19+ (marcatore dei linfociti B), CD45+ (marcatore delle cellule emopoietiche). Le cellule endoteliali circolanti sono state identificate come: CD146+ (marcatore delle cellule endoteliali), CD34+ (marcatore delle cellule staminali), CD45- (marcatore delle cellule emopoietiche). E' stato utilizzato il citofluorimetro a flusso FACSCalibur (Becton Dickinson) con l'ausilio del software CELLQUEST (Becton Dickinson). La differente espressione dell'antigene CD61 e del VEGFR-1/FLT-1 nelle varie popolazioni cellulari considerate ha come conseguenza una differente intensità di fluorescenza rilevata dal citofluorimetro, dovuta al diverso numero di molecole anticorpali legate alle proteine

stesse. Dovendo, quindi, confrontare l'intensità di fluorescenza data da diverse popolazioni cellulari (CEC e linfociti B) e derivanti da campioni differenti (pazienti di LLC e volontari sani) occorre costruire una retta di calibrazione in modo da normalizzare i dati raccolti. La calibrazione è stata eseguita utilizzando il kit FluoroSpheres (cod. K 0110) della ditta DakoCytomation, Germania. Il kit fornisce Blank Beads e Calibration Beads di 3,2 µm. Inizialmente vengono analizzate le Blank Beads per stabilire le impostazioni ottimali dello strumento ed in un secondo momento sono analizzate le Calibration Beads. I dati vengono, poi, utilizzati per la costruzione della curva di calibrazione, dove l'intensità media di fluorescenza (MFI) è posta in grafico contro il valore di molecole di fluorocromo equivalente (MEF), ossia la quantità di fluorocromo per sfera. Le Calibration Beads sono una miscela di 5 popolazioni di sfere con diversa intensità di fluorescenza e una popolazione di sfere non fluorescenti. Grazie ai valori assegnati alle molecole di fluorocromo equivalente (MEF) per le popolazioni di sfere fluorescenti, l'uso di FluoroSpheres rende possibile la trasformazione di unità arbitrarie di intensità media di fluorescenza (MFI) in unità assolute per la sicurezza della qualità e per la normalizzazione dei dati. I valori di MEF sono forniti dalla ditta DakoCytomation, mentre i valori di MFI, l'intensità di fluorescenza media, sono ricavate dall'acquisizione delle Calibration Beads. La retta di taratura ha come equazione $\log(\text{MEF}) = a \times \text{MFI} + b$, dove a è la pendenza e b l'intercetta dell'asse y . Attraverso questa retta sono normalizzati in MEF i valori di MFI dati dagli anticorpi fluorescenti contro le proteine in esame, rendendo così possibile il confronto tra dati raccolti in condizioni sperimentali diverse.

RISULTATI

3.1 CEC isolamento e caratterizzazione

Nei pazienti affetti da MM con del 13q-, in tutti gli esperimenti più del 95% delle cellule isolate con metodica immunomagnetica erano di origine endoteliale come mostrato dall'analisi immunofenotipica (figura 7 e tabella 6). La percentuale media di CD45, dopo separazione immunomagnetica era di 0,39% (range da 0% a 1%), il CD14 era espresso nello 0,1 % di tutte le cellule isolate CEC con metodica immunomagnetica (range da 0% a 0,5%). La grande maggioranza delle CEC solate coesprimeva di VEGFR2 e il vWF (figure 7A-7B) valore medio 98% range da 96% a 100%), ma anche il CD144 e il vWF (valore medio 98.25% con range di 95.5%-100%) (fig 7D-7C). la marcature per UEA 1 lectina era positiva nel 97.1% dei casi di tutte le CEC (96.2%-98.5%). Poche CEC isolate con metodica immunomagnetica coesprimevano il vWF e gli antigeni tipici delle

plasmacellule CD38 valore medio pari a 0,17% (con range da 0% a 0,5%, figure 7E-7F) e CD138 (valore medio 0,25% range tra 0% -0,5% figure 7G-7H).

Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti anche nello studio delle LAM (figura 8 e tabella 7 vedi sotto). La percentuale media di CD45+ dopo selezione immunomagnetica era dello 0,3% (range da 0 a 0,5%). Il CD14 era espresso nello 0,2% di tutte le cellule CEC isolate (range tra 0 e 0,5%, tabella 7). La grande maggioranza delle CEC isolate coesprimeva il VEGFR2 ed il fattore di von Willebrand (valore medio 98,9% con range dal 98,5% al 100%, figura 8A e 8B), e il CD144 ed il von Willbrand (media 99% con range 98%-100% figura 8C e 8D). La marcatura per la lectina UEA-1 era presente nel 97,7% dei casi (range 97%-98,5%). Una porzione molto ristretta delle CEC isolate co-esprimevano il von Willebrand e gli antigeni associati alle cellule blastiche delle LAM CD13 (valore medio 0,2% con range tra 0 e 0,5%) (figure 8E e 8F) e il CD33 (valore medio tra 0,17% con range 0-0,5% figure 8G e 8H).

Analoghi risultati sono stati ottenuti anche nello studio con LLC dove le CEC isolate con metodica immunomagnetica presentavano la coespressione per VEGFR2 e vWF, vWF e CD 144 mentre non esprimevano il CD5, CD14, CD19 e CD45 (figura 9).

3.2 Analisi FISH sulle CEC

L'analisi Fish ha mostrato che nei pazienti con MM una significativa proporzione di CEC era derivata dal MM poiché presentava la delezione 13q- osservata nelle plasmacellule. La frazione di CEC che mostravano la delezione del 13q- era circa del 18% (range 11%-32%; 200 cellule osservate in ogni caso) mentre in 5 pazienti con MM senza la delezione 13 q- la percentuale di CEC con la 13 q- era del 2,6% (range 2%-3,5%; p=0,008 per la comparazione con le CEC in pazienti con la delezione 13 q- , è stato eseguito il test di Mann Whitney U; 200 cellule osservate in ogni caso). In 3 casi di MGUS con le 13 q- , il numero di CEC con la delezione 13 q- era in media di 3,7% (range da 3% al 4,1% con p=0,036). Nessuna differenza statistica era stata osservata tra i pazienti con MM senza la delezione 13q- e i pazienti con MGUS riguardo la percentuale di CEC con delezione del 13 q-. nel MM i pazienti con la delezione 13 q-, comparata con i pazienti con MGUS, la maggioranza delle CEC presentava delle caratteristiche di progenitori endoteliali (EPCs), poiché essi esprimevano il CD133, un marcatore che gradualmente viene perso nella differenziazione in EC e assente nelle EC mature (86,2%CD133+ di CEC in pazienti con MM con 13 q- vs. 10,7% di CD133+ di CEC nei pazienti con MGUS; p=0,025, eseguito test di Mann Whitney U vedi tabella 1). Soprattutto il 97,7% delle CEC del MM con

delezione 13q- era positivo per il CD133 (figura 10). Nei pazienti affetti da LAM una significativa proporzione di CEC era derivata dal tumore poiché presentava la stessa lesione citogenetica osservata nelle cellule blastiche. La frazione delle CEC mostrante l'aberrazione citogenetica era dello 42.1% (range dal 20 al 78%, erano osservate 200 cellule in ogni caso; tabella 8). La maggioranza delle CEC presentava caratteristiche di EPC poiché esse esprimevano il CD133, un marcatore gradualmente perso durante la differenziazione delle cellule endoteliali e assente nelle forme mature (CECs CD133+ : valore medio 74.4% range 69-82% tabella 3). Il 98,5% delle CEC leucemiche con aberrazione citogenetica erano CD133+ (figura 11 e tabella 8). Quattro pazienti (2 in CR e 2 in NR) sono stati analizzati dopo il trattamento di induzione. Nei due pazienti in CR (numero 1 e 2) non era stata osservata nessuna CEC clonale dopo induzione mentre nei 2 pazienti con malattia resistente (numero 3 e 4) una proporzione significativa di CEC clonali era ancora presente (45% e 28% rispettivamente).

Analogamente anche nei casi di LLC, le CEC_s evidenziano le stesse lesioni citogenetiche osservate nei cloni neoplastici. La frazione di cellule endoteliali circolanti che mostrano aberrazioni citogenetiche è il 40,7%, con un range che varia tra il 20 ed il 78% a seconda del paziente in esame, di cui sono state analizzate 200 cellule (Tabella 9).

3.3 Analisi citofluorimetrica

L'analisi citofluorimetrica nei casi di LAM, era allestita alla diagnosi e dopo il trattamento di induzione. Alla diagnosi, la quantità di CEC valutate nel sangue periferico mediante metodica citofluorimetrica mostrava livelli significativamente elevati rispetto ai livelli di CEC presenti nel sangue periferico del gruppo di controllo ($p=0.0006$, valore medio delle CEC nei malati pari a 10,7 CEC/ul valore medio nel gruppo controllo 3,1 CEC/ul vedi figura 11). Il EPC ratio era significativamente aumentato nelle LAM se comparato al gruppo di controllo ($p=0.00006$ valore medio nei malati pari a 1.9 valore medio nel gruppo controllo pari a 0,5 figura 11). Dopo il trattamento d'induzione, i pazienti che ricevevano una remissione completa (RC) mostravano una significativa riduzione dei livelli delle CEC e dell' EPC ratio comparato con livelli trovati alla diagnosi (valore mediano della CEC pari a 11,6 vs. 2,7/ul $p=0.027$, valore mediano dell'EPC ratio 2.2 vs. 0,7 $p=0.029$) mentre nessuna differenza era stata osservata nei non responding alla terapia (valor mediano di CEC 7.7/ul vs. 8.6/ul, $p=n.s.$, valore mediano della EPC ratio 1,8 vs. 2.1 $p n.s.$ figura 12). La valutazione citofluorimetrica è stata eseguita anche nel caso della LLC ottenendo risultati simili. Infatti, la quantificazione citofluorimetrica delle EPC ha

mostrato valori significativamente ($p=0,037$) più elevati per i pazienti affetti da LLC (valore medio $25,06 \pm 2,811$ EPC/ μ l) rispetto a quelli rilevati nel sangue periferico dei controlli sani (valore medio $2,820 \pm 0,2820$ EPC/ μ l) successivamente è stato correlato il valore di EPC/ μ l con le caratteristiche cliniche dei pazienti di LLC presi in esame. Per quanto riguarda la stadiazione clinica, sono stati analizzati 54 pazienti con stadio di malattia 0-II e 20 con stadio III-IV. Si è visto che il numero di progenitori endoteliali circolanti è nettamente ($p=0,012$) inferiore nei pazienti caratterizzati da stadi clinici con livelli di rischio bassi o intermedi (stadio 0-II) (valore medio $19,26 \pm 2,594$ EPCS/ μ l), mentre pazienti con stadi di malattia ad alto rischio (stadi III-IV) hanno un numero di EPC nel sangue periferico più elevato (valore medio $40,71 \pm 11,93$ EPC/ μ l).

Il numero di progenitori endoteliali circolanti è risultato significativamente ($p=0,005$) aumentato nei 15 pazienti analizzati caratterizzati da una mancata risposta al trattamento anti-neoplastico (NR/SD) (valore medio $41,78 \pm 13,10$ EPC/ μ l), mentre è stato evidenziato un valore di EPC/ μ l più basso per i 35 pazienti arruolati che hanno raggiunto totalmente o parzialmente una fase di remissione della malattia (CR/PR) (valore medio $13,99 \pm 2,811$ EPC/ μ l) (Figura 13).

Per quanto riguarda, invece, l'espressione dei marcatori CD38 e ZAP-70 non sono state evidenziate correlazioni significative tra la positività per queste proteine e il numero di progenitori endoteliali circolanti nel sangue periferico dei pazienti affetti da LLC.

Nell'ultimo studio che abbiamo eseguito riguardo le CEC nella LLC abbiamo valutato il livello di espressione genica di alcuni geni attraverso la valutazione dell'RNA microarrays. L'intero profilo di espressione genica di 12 campioni di cellule endoteliali circolanti ottenuti da pazienti affetti da LLC (CECS-LLC) è stato determinato, al Centro Oncologico Modenese (Modena), attraverso l'utilizzo di microarrays contenenti circa 33.000 geni e successivamente comparato con il profilo di espressione genica di 2 campioni di cellule endoteliali circolanti (CEC) derivanti da volontari sani (Figura 13).

Tale metodica ha permesso di identificare tre tipi di cellule principali: uno di cellule endoteliali circolanti presenti anche nei controlli sani e con ben definito pattern di espressione, uno di cellule CD14+ e uno di cellule CD19+ nella LLC tra le quali a loro volta si sono potute individuare le cellule endoteliali CEC esprimenti il CD19. Tuttavia le CEC CD19+ sono ben inquadrabili in un pattern definito di espressione genica che risulta omogeneo e profondamente distinto da quello delle cellule endoteliali circolanti dei volontari sani. Le CEC della LLC CD19+ hanno presentato un profilo di espressione genica simile a quello delle cellule endoteliali di origine esprimendo i geni per CD133,

VEGFR2, CD146, VEGFR3 e il fattore di von Willebrand; tuttavia se si compara l'espressione genica delle CEC della LLC con le cellule endoteliali dei pazienti sani si può notare un profilo nettamente diverso. Geni up-regolati sono stati il VEGFB, FLT1, dei ligandi della proteina Wnt rispetto ai controlli sani, anomalie nei geni coinvolti nel rimodellamento della cromatina mentre si è assistito a una down regulation dei seguenti geni: ANGPT1(inibitore dell'angiogenesi), dei recettori tirosinchinasici FGFR4, EPHRB1, EPHRA4, EPHRB2 e delle proteine di traduzione del segnale controllato dalla proteina Notch. In conclusione, le CEC di pazienti affetti da LLC presentano un aumentata espressione di geni coinvolti nella proliferazione, nella sopravvivenza, nella diminuzione dell'adesione cellulare e nell'incremento delle funzioni proangiogenetiche.

Se si comparava il profilo di espressione genica delle CEC della LLC con i linfociti B della patologia ematologica si poteva notare un pattern di espressione simile ma diverso per la presenza di 1029 geni differentemente espressi nelle due popolazioni cellulari. In particolare tra questi 1029 geni sono stati identificati 183 geni up-regolati e 846 geni down regolati nelle cellule CD19+ rispetto alle CEC della LLC. In particolare nelle cellule leucemiche CD19+ si sono rilevati iperespressi geni coinvolti nel ciclo cellulare come le cicline G1, G2, ed altri fattori trascrizionali come CREB1, MLLT10 mentre le CEC della LLC mostravano un aumentata espressione del fattore di von Willebrand, EPAS1, CEBPA, NFE2, HOXB7 e EVX1. Tuttavia a una down o up regulation dell'espressione di specifici RNA può non corrispondere una effettiva up o down regulation dell'espressione della proteina prodotta. Tra i geni up regolati nella forma di CEC della LLC sono stati anche rilevati il CD61 (una integrina) e VEGFR1/FLT1 rispetto alla stesse cellule della LLC CD19+. Per valutare l'intensità della loro espressione è stata pertanto eseguita analisi citofluorimetrica. A tal fine sul sangue periferico dei pazienti affetti da LLC e su quello dei volontari sani sono state effettuate marcature quadruplici per identificare le cellule endoteliali circolanti ed i linfociti B CD19+. La successiva acquisizione al citofluorimetro è stata effettuata con un sistema a gate combinato, tuttavia poiché i campioni provenivano da popolazioni e campioni diversi e per poter valutare l'intensità di espressione delle proteine CD61 ed FLT1 è stato necessario costruire una retta di calibrazione per normalizzare i dati raccolti utilizzando il kit FluoroSpheres della ditta DakoCytomation, rendendo così possibile il confronto tra dati raccolti in condizioni sperimentali diverse. Questa elaborazione dei dati è stata eseguita sia per l'antigene CD61 sia per FLT-1 ambedue con un' iperespressione genica all'analisi con microarray. Anche nel caso dello studio citofluorimetrico volto alla quantificazione della proteina espressa nella cellula è

stato rilevato un valore medio di MEF dell'antigene CD61 all'interno delle cellule endoteliali circolanti di 14.139,9 (range 4.987,0-35.713,4) mentre nei linfociti leucemici solamente di 5.920 (range 2.330,1-27.494,2) ($p < 0,001$) e di 8941,9 (range 5.240,0-12.040,3) per le CEC di LLC e di 5387,8 (range 5.029,0-5.746,6) per le CEC dei controlli sani ($p = 0,01$) nel caso del costrutto di FLT-1.

DISCUSSIONE

È ormai dimostrato come l'angiogenesi giochi un ruolo fondamentale nella progressione neoplastica e come questa sia particolarmente vivace nel momento in cui la massa tumorale abbia raggiunto un punto critico che richieda la costruzione di neovasi per permettere l'ossigenazione e il nutrimento delle cellule maligne: si parla di Switch angiogenetico della neoplasia. Tale processo angiogenetico è regolato da complessi meccanismi biologici e dalla secrezione di numerose sostanze ad attività proangiogenetica come il bFGF, il VEGF, il TGF beta 1, che permettono la proliferazione delle cellule endoteliali, epiteliali e fibroblastiche. Recentemente lo stesso processo angiogenetico è stato rilevato non solo nelle neoplasie solide ma anche nelle patologie ematologiche come nel caso del Mieloma, il Linfoma, la Leucemia Mieloide Acuta, la Leucemia Linfatica Cronica e le Mielodisplasie. L'angiogenesi nelle malattie neoplastiche è stata quasi da subito considerata un importante target per la terapia; in particolare esistono diversi farmaci che possono agire su uno o più steps del processo. Uno dei parametri in grado di riflettere in modo accurato gli effetti dell'angiogenesi sono proprio le cellule endoteliali circolanti (CEC). Esse sono coinvolte nella formazione di nuovi vasi sanguigni partendo da vasi già presenti (angiogenesi). Le CEC sono state riscontrate aumentate in molte situazioni patologiche come l'infarto del miocardio soprattutto dopo somministrazione di fattore di crescita granulocitario (Valgimigli M. et al. 2005), nello scompenso cardiaco (Valgimigli M. et al. 2004), nel trapianto di rene, nei tumori ma anche dopo somministrazione di fattore di crescita granulocitario per la mobilizzazione delle cellule staminali per trapianto autologo in pazienti affetti da linfoma o mieloma in remissione completa (Mauro E. et al. 2007). Di converso le CEC diminuiscono nel caso di remissione di malattia neoplastica o dopo mastectomia (Ingram DA et al 2005). Sulla loro origine vi sono due ipotesi: la prima afferma che la presenza di una massa neoplastica critica induce la secrezione di alcuni fattori citochinici che permettono la mobilizzazione delle cellule staminali endoteliali (progenitrici EPC) dal midollo, la seconda pone l'attenzione sul fatto

che tali cellule possono essere mobilizzate dalla parete dei vasi danneggiati costituendo di fatto nuovi vasi in cui vi sia una componente endoteliale e una neoplastica (l'ipotesi dei vasi sanguigni a mosaico di Chang e collaboratori; Chang YS et al. 2000). Tra le cellule endoteliali siamo in grado oggi di discernere due gradi sottopopolazioni: le cosiddette EPC (endothelial Progenitor Cells) che sono caratterizzate dalla presenza di un antigene di superficie CD133+ che viene gradualmente perduto durante la maturazione endoteliale e che sono di origine midollare; accanto a queste vi sono cellule endoteliali circolanti (CEC) CD133- ossia forme più mature la cui origine è dalla parete dei vasi e hanno una limitata capacità proliferativa rispetto alle EPC (Mancuso P et al. 2003). Le suddette ipotesi sono state recentemente confermate in un articolo in cui è stato evidenziato che progenitori di origine endoteliale e cellule staminali emopoietiche mobilizzate da segnali indotti dalla neoplasia o da un'ischemia contribuiscono alla "vasculogenesi" (Carmeliet P et al 2001, Rafii S. et al. 2002). Di converso vi sono tuttavia degli studi che mettono in dubbio il reale contributo dei progenitori endoteliali nella formazione di nuovi vasi nel microambiente tumorale (108 s). In conclusione il ruolo delle cellule endoteliali e il loro reale coinvolgimento dell'angiogenesi neoplastica resta ancora oggetto di discussione.

È stato dimostrato che in pazienti con MM, le cellule endoteliali (EC) differiscono marcatamente dalle EPC di origine cordonale, la loro controparte quiescente, con riguardo alla secrezione di fattori di crescita, proprietà di sviluppo, profilo genetico e caratteristiche strutturali (Vacca et al. 2003). Recenti scoperte hanno anche mostrato che nei pazienti con MM, il livello di CECs, che comprendono le EC e le EPC, erano più elevati che nei controlli, e correlavano positivamente con la componente monoclonale e la beta 2 microglobulina, rappresentando pertanto un marcatore vascolare che riflette la massa tumorale e la prognosi (Zhang H et al. 2005).

Inoltre, era stata documentata una correlazione tra i livelli di CEC/EPC e la risposta al trattamento con Talidomide (Zhang et al. 2005), suggerendo un meccanismo anti angiogenetico della talidomide. Il presente studio (Rigolin GM et al. 2006) è la prima dimostrazione che, nei pazienti con MM con la delezione 13q-, una significativa proporzione di CECs era di origine neoplastica, poiché portando la stessa alterazione cromosomica delle plasmacellule neoplastiche, presentava lo stesso riarrangiamento genico delle immunoglobuline delle cellule mielomatose. Inoltre abbiamo dimostrato che la maggiore parte delle CEC presentava delle caratteristiche riconducibili a quelle delle EPC come la loro espressione per il CD133. Al contrario, nei pazienti con MGUS e delezione del 13q- le CEC erano citogeneticamente normali e avevano un immunofenotipo

maturato. Dato il numero esiguo di CEC presenti nel sangue periferico (Beerepoot LV et al. 2004, Woywodt A et al. 2004) nel tentativo di evitare una contaminazione di cellule non endoteliali abbiamo utilizzato una metodica di separazione immunomagnetica attraverso gli anticorpi anti CD45 e anti CD146 per isolare le CEC. Utilizzando la separazione immunomagnetica in combinazione con il CD45, inizialmente abbiamo eliminato tutte le cellule emopoietiche, che sono CD45+, senza incidere sulla componente endoteliale, la quale è caratteristicamente CD45. Abbiamo quindi eseguito un secondo step di separazione immunomagnetica attraverso il CD146, un antigene espresso esclusivamente sulle EC. La sua assenza nelle cellule emopoietiche rende tale antigene utile a discriminare in modo specifico le cellule endoteliali da quelle emopoietiche (Bardin N et al. 1996). A conferma del commitment endoteliale di queste cellule separate, noi abbiamo allestito un fenotipo addizionale con anticorpi che identificassero gli antigeni endoteliali e delle plasmacellule. Le CEC esprimevano la lectina UEA1, il vWF, il CD144 e il VEGFR2. Al contrario il CD138 e il CD38, due antigeni associati alle plasmacellule, non erano espressi sulle CEC isolate. In conclusione, i dati immunofenotipici depongono per un'identità endoteliale di queste cellule. Meccanismi differenti possono essere proposti per una spiegazione (Fidel IJ et al. 2004). Primo, le EC e le plasmacellule del MM possono derivare dal medesimo precursore multipotente detto emangioblasto, come suggerito dall'emergente evidenza di studi in pazienti con leucemia mieloide cronica (Gunsilius E et al. 2000) e dall'osservazione che molte CEC nel MM esprimono caratteristiche immunofenotipiche di EPC. In accordo a questa ipotesi, nei pazienti con MM, i fattori angiogenetici secreti nel microambiente midollare potrebbero attivamente reclutare i precursori cellulari emangioblasto ed indurli a differenziarsi in plasmacellule da EPCs, mostrando lo stesso riarrangiamento genico delle immunoglobuline. Tali EPC potrebbero entrare nel circolo ematico e contribuire alla neovascologenesi e alla disseminazione del tumore. In alternativa, le EC che portano la lesione genetica tipica delle plasmacellule del MM possono avere origine, sotto l'influenza di fattori angiogenetici del microambiente midollare, attraverso un processo di dedifferenziazione di una cellula già commissionata verso la linea linfoide in una cellula dalle caratteristiche EPC, seguita da una redifferenziazione in una EC differenziata (Korbling M et al. 2003). Plasmacellule possono pertanto mimare CEC funzionali e contribuire alla neovascologenesi tumorale (Rafii S et al. 2002). Tuttavia per esteso, è stato dimostrato che il VEGFR2 è il solo marcatore comune delle CEC e delle plasmacellule e che le plasmacellule del MM sono negative per l'mRNA e i livelli delle proteine per molti marcatori delle cellule endoteliali

incluso il fattore VIII, la VE caderina e UEA 1 lectina (Vacca et al. 2003). La fusione cellulare, nel nostro studio, sembra improbabile poiché la fusione delle plasmacellule MM e delle EC dovrebbero risultare in un cariotipo tetraploide e, nei nostri pazienti con MM, tutte le CEC contenevano un normale corredo diploide del cromosoma (Zhang H et al. 2005). Sembra anche improbabile che, come osservato nei tumori solidi, le nostre scoperte possano riflettere un'instabilità genetica delle cellule endoteliali tumorali, poiché il risultato della FISH non era consistente con un profilo citogenetico eterogeneo delle EC osservate nei tumori solidi (Hida K et al. 2005). Inoltre i risultati presentati, mostrando che solo un subset di CEC presenta la delezione 13q-, suggerisce che nei pazienti con MM il microambiente neoplastico determina un'attivazione del potenziale vasculogenetico che include sia cellule neoplastiche sia CEC con caratteristiche EPC derivate dal midollo e non clonali. Tuttavia, dall'osservazione che le CEC del MM rappresentato solo una minore componente di tutte le CEC con caratteristiche EPC, è possibile speculare che le CEC neoplastiche potrebbero agire come una sorta di testa di ponte sulle quali più numerose e possibilmente specializzate e funzionalmente attive non clonali cellule EPC di origine midollare potrebbero attivamente differenziarsi in vasi maturi e contribuire alla neovascolarizzazione. In contrasto, pazienti con MGUS con delezione 13 q- non hanno nel sangue periferico CEC con tale aberrazione genetica e molte CEC presentano delle caratteristiche di cellule endoteliali mature, suggerendo che in questi pazienti lo switch angiogenetico neoplastico non è ancora avvenuto e che il potenziale vasculogenico del microambiente midollare è ancora limitato.

Alcune linee di ricerca hanno mostrato che nei disordini leucemici l'angiogenesi è aumentata e possibilmente coinvolta nei processi leucemogeni (Aguajo A et al. 1999 e 2000, Hussong JW et al. 2000, Fidler W et al. 2007, Dias S et al. 2000, Padro T et al. 2000). Nel sangue periferico dei pazienti con LAM vi è un'aumentata quantità di CEC che correlano con lo stato della malattia e della terapia (Wierzbowska A et al. 2005), supportando l'idea che le CEC potrebbero rappresentare un marcatore dell'angiogenesi. È stato recentemente trovato che le cellule VEGFR2+ che portano la fusione BCR/ABL potrebbero essere isolate dal midollo osseo della Leucemia Mieloide Cronica e che queste cellule potrebbero differenziarsi in cellule maligne ed in cellule fenotipicamente definite come EC (Fang B et al. 2005) suggerendo che il riarrangiamento BCR/ABL potrebbe avvenire prima o a livello dell'emangioblasto (Gunsilius E et al. 2000). Nella nostra ricerca (Rigolin GM et al. 2007) abbiamo dimostrato che nei pazienti affetti da LAM con note aberrazioni citogenetiche, le CECs erano aumentate in comparazione con i controlli sani e

che una significativa proporzione di queste CECs erano correlate al tumore poiché portavano la stessa aberrazione cromosomica delle cellule blastiche leucemiche. Tale fenomeno non sembra essere associato con una particolare aberrazione citogenetica o con un particolare sottotipo di LAM nella classificazione WHO. Inoltre abbiamo trovato che nelle LAM la maggior parte delle CECs presentava delle caratteristiche da ECs come l'espressione del CD133, un marcatore gradualmente perso durante la differenziazione delle EC e assente sulle cellule mature ECs mentre nei controlli moltissime delle CECs avevano un fenotipo più maturo. La risposta al trattamento era associata a una significativa riduzione delle CECs con una normalizzazione dell'EPC ratio e con la scomparsa delle EPC neoplastiche, mentre nei pazienti NR non abbiamo osservato alcuna riduzione dei livelli di CECs e sia nel ratio delle EPC che nella persistenza delle CECs clonali. Differenti meccanismi possono essere chiamati in causa come possibile spiegazione delle nostre scoperte. Primo, le ECs e i blasti possono essere derivati da un progenitore comune multi potente detto emangioblasto , come suggerito dell'evidenza proveniente dagli studi sulla Leucemia Mieloide Cronica (Fang B et al.2005, Gunsilius E et al. 2000), e dall'osservazione che moltissime CECs delle LAM dimostrano un fenotipo caratteristico delle EPCs. In accordo con questa ipotesi, nei pazienti con LAM, i fattori angiogenetici secreti nel micro ambiente midollare potrebbero attivamente reclutare i precursori neoplastici emangioblastici dal midollo osseo e indurli alla differenziazione non solo in blasti ma anche in EPCs. Queste EPCs potrebbero poi entrare nel circolo sanguigno e contribuire alla neovasculogenesi ed alla disseminazione del tumore. In alternativa, le CECs che portano la stessa lesione genetica delle cellule blastiche possono avere origine, sotto l'influenza di fattori angiogenetici del microambiente midollare, attraverso un processo di trans differenziazione incluso per primo la de differenziazione delle cellule leucemiche già commissionate alla linea mieloide in progenitori con potenzialità sia EC che mieloide seguiti da un nuova differenziazione in cellule EC like (Fidel JI et al. 2004). Per estensione vi è evidenza che la cellula leucemica è in grado di acquisire caratteristiche fenotipiche e funzionali di differenti linee, suggerendo che le caratteristiche delle EC potrebbero rappresentare uno stato funzionale dello stimolo ottenuto dall'interazione con il microambiente midollare (Rigolin GM et al. 2001). Le cellule blastiche disgiunte possono mimare le ECs funzionali, e contribuire alla neovasculogenesi neoplastica (Korbilng M et al. 2003). Un'ulteriore interessante ipotesi è che le nostre conoscenze potrebbero rappresentare i risultati di un particolare processo di fusione cellulare etero tipica, dove le cellule di differenti linee si fondono a formare, dapprima un eterocarion (una cellula con 2

nuclei), e quindi un sincarion, ossia una cellula con un singolo nucleo risultando in una perdita o in una ridistribuzione dei cromosomi. Moltissime delle cellule fuse morirebbero o entrerebbero in quiescenza, ma una frazione, possibilmente quelle in stadio sincarion, potrebbero essere in grado di proliferare e contribuire alla neovasculogenesi tumorale. Le cellule del midollo osseo sono infatti emerse come le migliori candidate per la fusione cellulare etero tipica sotto stimoli ambientali, in un processo che potrebbe coinvolgere un numero di fattori non ancora noti (Friedl P 2005, Bjerkvig R et al. 2005, Pawelek JM et al. 2000). In alternativa può essere postulato che il fenomeno del trasferimento di materiale genetico in senso orizzontale potrebbe essere avvenuto coinvolgendo la cattura da parte delle EPC di DNA frammentato proveniente da cellule neoplastiche in apoptosi. Questa acquisizione di materiale genetico potrebbe portare a una riprogrammazione nucleare delle EPC che potrebbero favorire la diffusione e la progressione della malattia (Bjerkvig R et al. 2005). Sembra improbabile che, come osservato nei tumori solidi, le nostre scoperte riflettano una certa instabilità citogenetica delle EC tumorali, poiché la FISH risulta non essere consistente con il profilo citogenetico eterogeneo delle ECs osservate nei tumori solidi (Hida K et al. 2005).

I risultati presentati qui, mostrano che nelle LAM, come nel MM, vi è un aumento delle CECs e che la frazione immatura di queste cellule presenta delle lesioni genetiche. Questo può suggerire che il microambiente midollare potrebbe determinare l'attivazione del potenziale vasculogenico che include sia CEC con caratteristiche EPCs neoplastiche che non clonali. Tuttavia, dall'osservazione che le CECs rappresentano solo una componente di tutte le CECs con caratteristiche EPC, è possibile speculare che le CECs neoplastiche potrebbero agire come una sorta di testa di ponte sulle quali molte più numerose e più specializzate e funzionalmente attive cellule EPCs derivate dal midollo di tipo non clonali potrebbero attivamente differenziarsi in vasi maturi e contribuire alla neovascolarizzazione e allo sviluppo del tumore. In linea con questa visione, è stato recentemente dimostrato, che le mutazioni dell'esone (Streubel B et al. 2004) in NPM della cellula clonale potevano non essere ritrovate nell'endotelio ottenuto da micro sezioni da 3 pazienti affetti da LAM NMPC+ CD34- (Pasqualucci et al. 2006). In contrasto, nei soggetti sani, molte delle CECs hanno le caratteristiche di ECs mature suggerendo che in questi pazienti lo switch angiogenetico neoplastico non è stato attivato e che il potenziale vasculogenetico del microambiente midollare è ancora sotto controllo. Studi addizionali sono richiesti per chiarire l'attuale contributo delle EC derivate dalla malattia con specifiche aberrazioni citogenetiche alla neovascolarizzazione tumorale. In conclusione, le nostre scoperte

suggeriscono che, similmente al MM, nelle LAM le CEC sono aumentate, presentano caratteristiche EPC e sono almeno in parte correlate al tumore. Analoghi risultati sono stati ottenuti anche nei 74 pazienti dello studio sulla LLC-B dove si è rilevato un aumento all'analisi citofluorimetrica delle EPC rispetto ai controlli normali, correlando anche con lo stadio clinico (alti livelli per stadio III e IV sec Rai, bassi per stadi 0, I e II) ed con la risposta al trattamento specifico. Anche in questo caso, come nei due studi precedenti, le EPC possono essere utilizzate come marcatori dell'angiogenesi neoplastica e della progressione della malattia ematologica. Le cellule endoteliali isolate con la stessa metodica immunomagnetica presentavano sia tutti gli antigeni caratterizzanti le CEC (un 40.7% in media di CEC presentava anche il CD133 configurando quindi l'assetto immunofenotipico della EPC) che le stesse aberrazioni citogenetiche tipiche della LLC-B correlata, dimostrando anche in questo il collegamento biologico delle CEC alla neoplasia. In questi ultimi anni si è potuto iniziare lo studio di espressione genica delle CEC comparandolo sia con CEC da donatori volontari sani sia con le cellule neoplastiche di mammella, polmone, prostata, colon retto, rene, rilevando un'aumentata espressione di geni con specifiche funzioni endoteliali, o implicati nella crescita neoplastica lasciando supporre che tali differenze siano significative ed indicative di uno stato attivo dell'angiogenesi e della progressione tumorale nei pazienti neoplastici. Applicando l'analisi del profilo di espressione genica a 12 casi di LLC e comparandoli con 2 casi di volontari sani si è potuto rilevare una differente espressione di 4419 geni tra i pazienti e i volontari sani. In particolare le CEC della LLC presentano una più elevata espressione dei geni che sottendono alla trasduzione del segnale della via WNT/beta catenina. Le proteine WNT si legano alla proteina citoplasmatica beta catenina stabilizzandola regolando così l'espressione di numerosi altri geni coinvolti nella disseminazione metastatica e nella progressione neoplastica come il c-myc e la ciclina D1. L'assenza del complesso proteico WNT induce una fosforilazione della beta catenina un conseguente legame con l'ubiquitina e la degradazione a livello del proteasoma. Un altro pattern di geni iperespressi nelle CEC della LLC è il sistema NOTCH coinvolti nella morfogenesi e nella differenziazione in senso vascolare. In questo ultimo studio con la LLC abbiamo anche confrontato il pattern di espressione genica delle CEC-LLC con le cellule leucemiche CD19+ nello stesso paziente. Nonostante i due profili fossero molto simili, essi differivano per 1029 geni differentemente espressi; tra questi spicca ancora il sistema WNT. I linfociti leucemici CD19+ mostrano un aumento nell'espressione di geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, mentre le cellule endoteliali circolanti ritrovano livelli

d'espressione di proteine tipiche della linea endoteliale, come il fattore di von Willebrand, notevolmente più elevati. Possiamo quindi affermare che l'espressione genica delle CEC della LLC presenta un aumento di espressione di geni coinvolti nel ciclo cellulare e nella diminuzione dell'adesione cellulare e un aumento delle funzioni pro angiogenetiche sottese dai geni Notch e WNT. Anche i livelli mRNA di CD61 e VEGFR1/FLT1 sono risultati iperespressi nelle CEC tuttavia ciò potrebbe non corrispondere ad una reale iperespressione delle corrispettive proteine. I livelli di espressione di FLT1 sono stati valutati con la citofluorimetria riscontrando anche con questa metodica l'up-regolazione del gene corrispettivo. Analoghi risultati sono stati ottenuti nel caso del CD61, un'integrina di membrana che gioca un ruolo nell'adesione alla matrice cellulare promuovendo la migrazione e la sopravvivenza delle cellule endoteliali durante l'angiogenesi. In conclusione, le nostre scoperte suggeriscono che in pazienti con MM,LAM e LLC-B, le CEC sono in parte tumore correlate e che presentano per la maggiore parte caratteristiche EPC. Queste CEC possono contribuire alla neovasculogenesi e possibilmente alla progressione della malattia. Lo studio delle CEC può avere delle importanti implicazioni non solo nella comprensione degli aspetti biologici specifici delle malattie ematologiche maligne, ma anche per il trasferimento di tali conoscenze nell'ambito clinico delle terapie antiangiogenetiche (Bruno B et al. 2004). Gli studi di espressione genica hanno evidenziato come vi sia un franco sbilanciamento di espressione di numerosi geni coinvolti nella progressione tumorale e nella neo vascolarizzazione; tali dati sono corroborati anche da una corrispondente situazione immunofenotipica facilmente valutabile tramite citofluorimetria. Pertanto una standardizzazione dei metodi ciofluorimetrici per meglio caratterizzare e quantificare le CEC associate a una miglior valutazione biologica e molecolare può avere delle importanti implicazioni sia nel versante della patogenesi delle malattie ematologiche maligne che in ambito clinico, prognostico e terapeutico dove le CEC possono giocare un ruolo come marcatore dell'angiogenesi.

Neoplastic circulating endothelial cells in multiple myeloma with 13q14 deletion

Gian Matteo Rigolin, Chiara Fraulini, Maria Ciccone, Endri Mauro, Anna Maria Bugli, Cristiano De Angeli, Massimo Negrini, Antonio Cuneo, and Gianluigi Castoldi

In multiple myeloma (MM), circulating endothelial cells (CECs) represent a vascular marker of angiogenesis and may reflect tumor mass. In this report, we showed that, in 5 MM patients with 13q14 deletion, CECs carried the same chromosome aberration as the neoplastic plasma cells (11%–32% of CECs with 13q14 deletion). Most of the CECs displayed immunophenotypic features of endothelial progenitor cells as they expressed CD133, a marker gradually lost during endothelial differentiation and absent on mature endothelial cells. To the contrary, in 2 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance and 13q14 deletion, CECs were cytogenetically normal and had a mature immunophenotype. In MM CECs, immunoglobulin genes were clonally rearranged. These findings suggest a possible origin of CECs from a common hemangioblast precursor that can give rise to both plasma cells and endothelial cells and point to a direct contribution of MM-derived CECs to tumor vasculogenesis and possibly to the spreading and progression of the disease. (Blood. 2006;107:2531–2535)

© 2006 by The American Society of Hematology

Introduction

Several studies have shown that bone marrow–derived endothelial cells (ECs) may contribute to tumor angiogenesis,^{1,2} and that in the peripheral blood of cancer patients there is an increased amount of circulating ECs (CECs)³ that may participate to vessel formation.⁴ Recent data also showed that microvascular ECs in B-cell lymphomas are in part tumor-related, reflecting a novel aspect of tumor angiogenesis.⁵

All together, these observations suggest that tumors can elicit the sprouting of new vessels from existing capillaries through the secretion of angiogenic factors⁶ and that, in some cases, cancer cells can also mimic the activities of ECs by participating in the formation of vascular-like networks.^{6,8}

In multiple myeloma (MM), the proliferation and survival of neoplastic plasma cells is regulated by microenvironmental bone marrow factors and, to this extent, neoangiogenesis is thought to have a key role in the pathogenesis and progression of the disease.⁹ In patients with MM, CEC levels are higher than in controls and correlate positively with serum M protein and β_2 -microglobulin, therefore representing a vascular marker which reflects tumor mass and prognosis.¹⁰ To clarify whether CECs in MM are tumor derived, we studied 5 patients with MM and 3 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) with 13q14 deletion and sought to characterize immunomagnetically sorted CECs by immunophenotypic analyses, fluorescence *in situ* hybridization (FISH), and molecular genetic studies.

Patients, materials, and methods

Patients

These patients represent consecutive cases with 13q14 deletion seen at our institution between January 2000 and June 2004. The patients were studied

by FISH on morphologically intact bone marrow cells as previously reported¹¹ using a commercially available 13q14 probe in combination with a chromosome 10-centromeric probe as control, and a 14q32 immunoglobulin H (IgH) probe (Vysis, Downers Grove, IL, distributed by Abbott, Rome, Italy). Five patients had MM (3 patients at diagnosis, 2 at relapse), and 3 patients had MGUS. All the patients carried the 13q14 deletion in 52% to 68% of neoplastic plasma cells. As controls, 5 MM patients without 13q14 deletions were analyzed. All patients gave written informed consent to an ethics committee–approved protocol.

CEC Isolation and characterization

CECs were isolated, with some modifications, as previously described.¹² Briefly, 20 mL peripheral blood was obtained at enrollment and CECs were isolated by immunomagnetic sorting, according to manufacturer's instructions, with Dynabeads Pan Mouse IgG (DynaL A.S., Oslo, Norway) by a 2-step approach. In order to eliminate hematopoietic cells that are CD45 positive and to isolate CECs that are CD45 negative, we first performed a negative selection with Dynabeads coated with anti-CD45 (clone 2D1; Becton Dickinson, Milan, Italy). CD45-negative cells were subsequently subjected to a positive selection with Dynabeads coated with anti-CD146 antibody (clone PH12; Becton Dickinson, Milan, Italy). CD146 (also known as MCAM, MUC18, Scaev-L, and Mel-CAM9) is an antigen expressed almost exclusively on endothelial cells, the exception being stromal cells, smooth muscle cells, follicular dendritic cells, and some tumor cell lines.¹³ Its absence on hematopoietic cells makes CD146 a helpful reagent to specifically discriminate endothelium from hematopoietic tissues.¹³ For further characterization, immunomagnetically sorted cells were then stained with Ulex Europaeus lectin 1 (UEA-1; Dako, Milan, Italy) followed by FITC-conjugated swine anti-rabbit immunoglobulins (Dako) as a secondary reagent, and in double-staining experiments with the following antibodies: rabbit anti-VEGFR-2 (Santa Cruz Biotechnology,

From the Hematology Section, Department of Biomedical Sciences, Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedale S. Anna, and the Microbiology Section, Department of Experimental and Diagnostic Medicine and Centro Interdipartimentale per la Ricerca sul Cancro, University of Ferrara, Italy.

Submitted May 2, 2005; accepted November 8, 2005. Prepublished online as Blood First Edition Paper, November 28, 2005; DOI 10.1182/blood-2005-04-1768.

Supported by MURST (60%), an AIRC regional grant, MUR PRIN, and MUR FIRB.

The online version of this article contains a data supplement.

Reprints: Gian Matteo Rigolin, Hematology Section, Department of Biomedical Sciences, University of Ferrara, Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedale S. Anna, Corso Giovecca 203, 44100 Ferrara, Italy; e-mail: rigolin@unife.it.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2006 by The American Society of Hematology

Santa Cruz, CA) followed by FITC-conjugated swine anti-rabbit immunoglobulin (Dako) as secondary reagent in combination with murine anti-human von Willebrand factor (vWF) antibody (Dako) followed by TRITC-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin (Dako); FITC-conjugated rabbit anti-CD44 antibody (vascular endothelial [VE]-cadherin; Serotec, Oxford, United Kingdom) in combination with murine anti-human vWF antibody followed by TRITC-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin as a secondary reagent; murine anti-human vWF antibody followed by FITC-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin as a secondary reagent in combination with PE-conjugated murine anti-CD133 antibody (clone BB4; Beckton Coulter, Milan, Italy); murine anti-human vWF antibody followed by FITC-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin as a secondary reagent in combination with PE-conjugated murine anti-CD133 antibody (clone BB4; Beckton Coulter, Milan, Italy); FITC-conjugated murine anti-CD45 antibody (clone D01) in combination with PE-conjugated anti-CD14 (clone MoP9; Beckton Dickinson). Evaluation of immunophenotypic results was performed using a Nikon fluorescence-equipped microscope with a charge-coupled black-and-white camera device and appropriate hardware and software (Cytovision System, Applied Imaging, distributed by Nikon Italy, Florence, Italy).

FISH analysis on CECs

The following probes were used simultaneously in dual-color experiments: a Spectrum orange LSI D15S25 DNA probe to the band 13q14.3 and a Spectrum green CEP 10 alpha satellite DNA probe to the centromere band region 10p11.1-q11.1 of human chromosome 10 (Yvisio). A detailed description of the technique has been reported previously.¹² Briefly, immunomagnetically sorted CECs were washed twice in 4 × saline sodium citrate (SSC; Yvisio) for 5 minutes each, subsequently dehydrated in an ethanol alcohol series (70%, 85%, and 100%), and air-dried. The slides were preincubated on a hot plate and then immersed in a 2 × SSC solution at 72°C for 5 minutes and dehydrated again with an alcohol series at -20°C. Each probe (10 μL) was added to each slide and covered with a coverslip. Rubber cement was used to seal the edges, and the slides were incubated overnight at 37°C in a moist chamber. Posthybridization washes included baths at 73°C in 0.4 × SSC/0.2% NP-40 (Yvisio) for 5 minutes, and at room temperature in 2 × SSC/0.1% NP-40, without intermittent agitation. Cells were subsequently stained with PE-conjugated murine anti-CD133 antibody (AC133; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. Evaluation of FISH results was performed using a Nikon fluorescence-equipped microscope with a charge-coupled black-and-white camera device and appropriate hardware and software. To prevent data misinterpretation because of background hybridization, only those areas with more than 80% of cells showing 2 correct signals were analyzed. As controls, we used CECs obtained in the same way from 5 MM patients without 13q14 deletion. To obtain better visualization and reproduction of the images, pseudocolors were attributed to the background, the cells, and the signals.

Immunoglobulin gene rearrangements and polymerase chain reaction

Polymerase chain reaction (PCR) was performed in 2 MM patients with 13q14 deletion for whom cell material was available. Plasma cells of the same patients isolated at the time of diagnosis were used as a positive control. To rule out contaminating plasma cells giving false-positive results, we evaluated the sensitivity of our method by analyzing negative samples with decreasing percentages of clonal plasma cell contaminations (15%, 1%, 0.1%, and 0.01%). In these experimental conditions that, due to the low number of CECs that can be isolated from the peripheral blood, are characterized by the lowest amount of DNA allowed for the method, 19 or more of contaminating plasma cells were necessary to give positive results (Figure S1; see the Supplemental Figure link at the top of the online article on the Blood website). V_H genes were amplified from genomic DNA. DNA was extracted from cryopreserved cells using Trizol reagent (Life Technologies, Paisley, Scotland). We performed a set of 8 family-specific PCRs to isolate the clonally expressed V_H genes. The same primers were from the leader regions (V_H1): 5'-ATG GAC TGS ACC TGG AGV ATC C-3'; 13q14-6: 5'-GTC TTC TGA TTT CTT GCT GCA G-3'; 14q32: 5'-CAG TCT CCT CCT CCT GCT GAC C-3'; 14q32: 5'-GCT GCT GCT TTT TTT TTT TTT C-3'; 14q32: 5'-ATG GAG TTT GGR CTG AGC TG-3'; 14q32: 5'-ATG AAG CAC CTG TGG TTT TTC CT-3'; 14q32: 5'-GCT CCT CCT GGC TCT C-3'; and 14q32: 5'-CTG TCT TCT TCC TCA TCT TCC-3'. In all the reactions, the same antisense Ig degenerate primer was employed (4qdeg: 5'-CTY ACC TGA RGA GAC RET GAC C-3'). The 30 μL reactions (10 μM of each primer, 1.5 mM MgCl₂, and 100 μM of each dNTP and 1U AmpliTaq HS Santa DNA polymerase in supplied buffer (Fisher Scientific, Hampton, NH) were cycled 35 times at an annealing temperature of 60°C. PCR products were spin-column purified (Promega, Madison, WI) and directly sequenced using the automated sequencer. Sequence alignment was to the Entrez database (National Center for Biotechnology Information [NCBI], Bethesda, MD) and to the V Base (MRC Center for Protein Engineering, Cambridge, United Kingdom).

Results

Patients

Demographic and principal clinical characteristics of the 8 patients with 13q14 deletion (5 MM and 3 MGUS) are reported in Table 1.

CEC isolation and characterization

In all experiments more than 95% of immunomagnetically sorted cells were of endothelial origin as demonstrated by phenotypic analyses (Table 2; Figure 1). In patients with the 13q14 deletion, the mean percentage of CD45⁺ cells after immunomagnetic

Table 1. Demographic and principal clinical characteristics of patients

Patient no.	Age, y/sex	Diagnosis	Stage	M compo, g/L	β-2M, mg/L	CRP, mg/L	CD133 ⁺ CECs/total CECs (%)	CECs with 13q14 deletion	
								CECs (%)	CD133 ⁺ CECs with 13q14 del (%)
1	69/M	MM IgGκ	IA	12.0	4.4	9.6	18/200 (9.0)	22/200 (11)	38/19 (19)
2	68/F	MM IgGκ	IIa	13.0	5.0	15.9	19/200 (9.4)	22/200 (11)	20/22 (19)
3	70/M	MM IgGκ	IA	29.0	2.7	0.4	19/200 (9.5)	26/200 (13)	20/22 (91.9)
4	62/F	MM IgGκ	IIa	12.1	0.1	0.9	19/200 (9.5)	19/200 (9.5)	36/36 (100)
5	44/M	MM IgGκ	IIa	30.1	2.5	8.9	19/200 (9.4)	64/200 (32)	10/64 (16.9)
MGUS									
6	49/F	IgGκ	NA	12.8	1.5	0.3	10/200 (5)	6/200 (3)	NA
MGUS									
7	47/F	IgGκ	NA	11.8	1.4	1.9	19/170 (11.6)	7/170 (4.1)	NA
MGUS									
8	61/F	IgGκ	NA	5.7	2.1	1.5	21/155 (13.5)	6/155 (3.9)	NA

M compo indicates M component; β-2M, β-2-microglobulin; CRP, C-reactive protein; and NA, not applicable.

Table 2. Immunophenotypic characterization of CECs in MM and MGUS patients with 13q14 deletion

Patient no.	UEA-1 ⁺ CECs/total CECs (%)	VEGFR-2 ⁺ VWF ⁺ CECs/total CECs (%)	CD144 ⁺ VWF ⁺ CECs/total CECs (%)	VWF ⁺ CD133 ⁺ CECs/total CECs (%)	VWF ⁺ CD133 ⁺ CECs/total CECs (%)	CD45 ⁺ cell/total CECs (%) (CD45 ⁺ CD147 ⁺ CD45 ⁺ CD147 ⁺)
1	195/200 (97.5)	198/200 (99.0)	197/200 (98.5)	1/200 (0.5)	1/200 (0.5)	0/200 (0.0) [0/0]
2	193/200 (96.5)	196/200 (98.0)	195/200 (97.5)	0/200 (0.0)	ND	2/200 (1.0) [2/0]
3	165/200 (82.5)	197/200 (98.5)	166/200 (83.0)	0/200 (0.0)	ND	1/200 (0.5) [1/0]
4	167/200 (83.5)	200/200 (100)	200/200 (100)	0/200 (0.0)	1/200 (0.5)	0/200 (0.0) [0/0]
5	104/200 (52.0)	106/200 (53.0)	127/200 (63.5)	1/200 (0.5)	0/200 (0.0)	1/200 (0.5) [0/1]
6	104/200 (52.0)	105/200 (52.5)	ND	0/170 (0.0)	ND	0/190 (0.0) [0/0]
7	154/198 (77.8)	ND	172/180 (95.6)	0/158 (0.0)	ND	3/140 (2.1) [1/0]
8	152/158 (96.2)	144/150 (96.0)	ND	ND	0/145 (0.0)	ND

ND indicates not done.

selection was 0.39% (range, 0.0%-1.0%). CD14 was expressed in 0.1% of all immunomagnetically sorted CECs (range, 0.0%-0.5%; Table 2). The great majority of immunomagnetically sorted CECs coexpressed VEGFR-2 and VWF (mean value, 98.1%; range, 95.0%-100%; Figure 1A-B), and CD144 and VWF (mean value, 98.25%; range, 95.5%-100%; Figure 1C-D). UEA-1 lectin-positive staining was present in 97.1% of all CECs (range, 96.2%-98.5%). Very few immunomagnetically sorted CECs coexpressed VWF and the plasma cell-associated antigens CD138 (mean value, 0.17%; range, 0.0%-0.5%; Figure 1E-F) and CD133 (mean value, 0.25%; range, 0.0%-0.5%; Figure 1G-H).

FISH analysis on CECs

FISH analysis showed that, in patients with MM, a significant proportion of CECs was tumor derived because they harbored the 13q14 deletion as observed in neoplastic plasma cells. The fraction of CECs showing the 13q14 deletion averaged 18% (range, 11%-32%; 200 cells observed in each case) while in 5 MM patients without 13q14 deletion the percentage of CECs with 13q14 deletion averaged 2.6% (range, 2.4%-3.5%; $P = .008$ for the comparison with CECs in patients with 13q14 deletion, Mann

Whitney *U* test; 200 cells observed in each case). In 3 MGUS patients with the 13q14 deletion, the number of CECs with the 13q14 deletion averaged 3.7% (range, 3.4%-4.1%; $P = .036$ for the comparison with CECs in MM patients with 13q14 deletion, Mann Whitney *U* test). No statistical difference was observed between MM patients without 13q14 deletion and patients with MGUS concerning the percentage of CECs with 13q14 deletion. In MM patients with 13q14 deletion, compared with MGUS patients, the majority of CECs presented features of endothelial progenitor cells (EPCs) because they expressed CD133, a marker gradually lost during EC differentiation and absent in mature ECs (86.2% CD133⁺ CECs in MM patients with the 13q14 deletion vs 10.7% CD133⁺ CECs in MGUS patients; $P = .025$, Mann Whitney *U* test; Table 1). Overall, 97.7% of MM CECs with 13q14 deletion were CD133 positive (Figure 2; Table 1).

Immunoglobulin gene rearrangement

It was possible to demonstrate by PCR analysis in 2 patients (patient 1 and patient 4) with available cells that immunoglobulin genes were clonally rearranged in MM CECs (Figure 3). Sequence

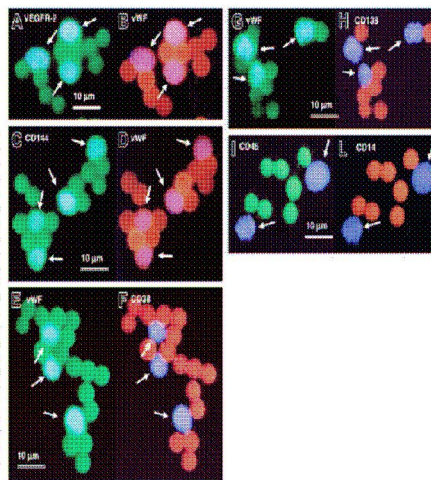


Figure 1. Immunophenotypic characterization of immunomagnetically sorted CECs by means of Dynabeads in MM patients with 13q14 deletion. In simultaneous double fluorescence staining experiments, CECs coexpress VEGFR-2 (positive green staining for anti-VEGFR-2 antibody) (A) and VWF (positive red staining for anti-VWF monoclonal antibody) (B) and CD144 (positive green staining for anti-CD144 monoclonal antibody) (C) and VWF (positive red staining for anti-VWF monoclonal antibody) (D). Immunomagnetically sorted CECs do not coexpress VWF (positive green staining for anti-VWF monoclonal antibody) (E, G) with plasma cell-associated markers CD138 (negative red staining for anti-CD138 monoclonal antibody) (F) and CD133 (negative red staining for anti-CD133 monoclonal antibody) (H). In patients with MM, immunomagnetically sorted CECs do not express CD45 (negative green staining for anti-CD45 monoclonal antibody) (I) and CD14 (negative red staining for anti-CD14 monoclonal antibody) (J). Note that several Dynabeads are attached to the cells and that beads present red or green staining depending on the filter used for fluorescence analysis. White arrows indicate CECs; cell nuclei have been counterstained with DAPI II (blue staining). Scale bars equal 10 μ m.

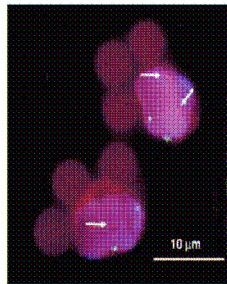


Figure 2. FISH analysis of CECs in patients with MM. Multicolour FISH analysis of immunomagnetically sorted CECs by means of Dytubebeads shows 1 CEC (bottom left) with a 13q14 deletion (1 red signal, bottom left arrow) and a normal diploid copy number of chromosome 10 (2 green signals), and 1 cytogenetically normal CEC (top right) with 2 red (top 2 arrows) and 2 green signals. In patients with MM, most CECs are EPCs because they express CD133, a marker gradually lost during EC differentiation (positive red staining for PE-conjugated mouse anti-CD133 monoclonal antibody). Note that several Dytubebeads are attached to the cells. Scale bar equals 10 μ m.

analysis showed that MM CECs carried the same immunoglobulin rearrangement as plasma cells (Patient 1: VH3-11, D1-26, JH6; Patient 4: VH2-5, D3-3, JH4).

Discussion

It has been shown that in patients with MM, ECs differ markedly from umbilical vein ECs, their quiescent counterpart, with regard to the secretion of growth factors, growth properties, genetic profile, and structural features.¹⁴ Recent findings also showed that in patients with MM, the level of CECs, which comprise mature ECs and EPCs, were higher than in controls and correlated positively with serum M protein and β 2-microglobulin, thereby representing a vascular marker that reflects tumor mass and prognosis.¹⁰ In addition, a correlation was documented between the level of CECs/EPCs and response to thalidomide treatment,¹⁰ suggesting an antiangiogenic mechanism of thalidomide action.

This is the first demonstration that, in MM patients with the 13q14 deletion, a significant proportion of CECs was tumor derived because they carried the same chromosome aberration as the neoplastic plasma cells and presented the same immunoglobulin gene rearrangement as MM plasma cells. In addition, we showed that most CECs presented EPC features as they expressed CD133, a marker gradually lost during endothelial differentiation and absent on mature endothelial cells. On the contrary, in patients with MGUS and 13q14 deletions, CECs were cytogenetically normal and had a mature immunophenotype.

Due to the very low number of CECs in peripheral blood,^{8,12} in order to avoid contamination by nonendothelial cells we used a dual-step immunomagnetic sorting by means of CD45 and CD146 antibodies to isolate CECs. By using immunomagnetic sorting in combination with CD45, we first eliminated all hematopoietic cells, which are CD45 positive, without affecting the endothelial cell component, which is characteristically CD45 negative. We then sorted CECs by means of CD146, an antigen expressed almost exclusively on ECs. Its absence on hematopoietic cells makes CD146 a helpful reagent to specifically discriminate endothelial

from hematopoietic cells.¹² To confirm the endothelial commitment of these sorted cells, we then performed additional phenotypic studies with antibodies recognizing endothelial and plasma cell antigens. CECs expressed UEA-1 lectin, VWF, CD144, and VEGFR-2. On the contrary, CD138 and CD38, 2 plasma cell-associated antigens, were not expressed on sorted CECs. In conclusion, the immunophenotypic data are consistent with the endothelial identity of these cells.

Different mechanisms may be proposed as a possible explanation for our findings.¹⁵ First, ECs and MM plasma cells may derive from the same multipotent hemangioblast precursor cell, as suggested by evidence coming from studies in patients with chronic myeloid leukemia¹⁶ and from the observation that most MM CECs display immunophenotypic features of EPCs. According to this hypothesis, in patients with MM, angiogenic factors secreted into the microenvironment could actively recruit bone marrow hemangioblast precursor cells and induce them to differentiate into plasma cells and EPCs, with both displaying the same rearrangement of immunoglobulins. These EPCs could then enter blood circulation and contribute to neovasculation and tumor dissemination. Alternatively, the ECs that carry the genetic lesion of MM plasma cells may have arisen, under the influence of microenvironmental angiogenic factors, through a process of dedifferentiation of a cell already committed to the lymphoid lineage into a cell with EPC characteristics, followed by a redifferentiation into a terminally differentiated EC.¹⁷ Disguised plasma cells may then mimic functional CECs and contribute to tumor neovasculation.¹⁸ To this extent, however, it has been shown that VEGFR-2 is the only marker shared by CECs and plasma cells, and that MM plasma cells are negative at mRNA and protein levels for most of endothelial cell markers including factor VIII-related antigen, VE-cadherin, and UEA-1.¹⁴ Cell fusion, in our study, seems unlikely because the fusion of MM plasma cells and ECs should result in a tetraploid karyotype and, in our patients with MM, all CECs contained a normal diploid copy number of chromosome 10. It seems also unlikely that, as observed in solid tumors, our findings could reflect an inherent cytogenetic instability of tumor endothelial cells, because FISH results were not consistent with the heterogeneous cytogenetic profile of ECs observed in solid tumors.¹⁹

In addition, the results presented in this paper, by showing that only a subset of CECs harbors the 13q14 deletion, suggest that in patients with MM the neoplastic microenvironment determines an activation of the vasculogenic potential that includes both neoplastic and nonclonal bone marrow-derived CECs with EPC features. However, from the observation that MM CECs represent only a minor component of all CECs with EPC features, it is possible to

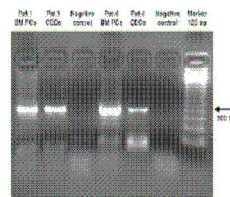


Figure 3. Immunoglobulin gene rearrangements in immunomagnetically sorted CECs in MM patients with 13q14 deletion. PCR analysis demonstrated that in MM CECs, immunoglobulin genes were clonally rearranged. Sequence analysis showed that MM CECs carried the same immunoglobulin rearrangement as bone marrow plasma cells (Patient 1: VH3-11, D1-26, JH6; Patient 4: VH2-5, D3-3, JH4). BM PCs indicate bone marrow plasma cells.

speculate that neoplastic CECs might act as a sort of bridgehead on which more numerous and possibly more specialized and functional active nonclonal bone marrow–derived EPCs could actively differentiate in mature vessels and contribute to tumor neovascularization and spreading. In contrast, patients with MGUS and 13q14 deletion do not have peripheral blood CECs with 13q14 deletion and most CECs have the features of mature endothelial cells, suggesting that in these patients the neoplastic angiogenic switch has not yet occurred and that the vasculogenic potential of the bone marrow microenvironment is still limited. Additional studies are

warranted to clarify, on biopsical samples of patients with MM, the actual contribution of MM-derived endothelial cells with specific cytogenetic aberrations to tumor neovascularogenesis and spreading.

In conclusion, our findings suggest that in patients with MM CECs are in part tumor related and have EPC features. These CECs may contribute to tumor neovascularogenesis and possibly to the spreading and progression of the disease. The study of CECs may have important implications not only for the understanding of MM-specific biological aspects but also for the translation of new antiangiogenic therapies to the clinic.²⁰

References

1. Lyden D, Hattel K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med*. 2001;7:1194-1201.
2. Hilbe W, Dirnhof S, Obermuller-Fischer F, et al. CD133-positive endothelial progenitor cells contribute to the tumor vasculature in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol*. 2004;57:965-969.
3. Peters BA, Diaz LA, Polyak K, et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med*. 2005;11:261-262.
4. Mancuso P, Barlini A, Pignatelli G, Collichino A, Martelli G, Barozzi F. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood*. 2001;97:3658-3661.
5. Beerepoot LV, Mehta M, Vermaat JS, Zonnenberg BA, Geubbink MF, Vloed EC. Increased levels of viable circulating endothelial cells are an indicator of progressive disease in cancer patients. *Ann Oncol*. 2004;15:139-145.
6. Shwehdi D, Chou A, Huber D, et al. Lymphoma-specific genetic alterations in microvessel endothelial cells by B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 2004;351:259-269.
7. Cornellet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2005;5:389-395.
8. Hendrix MJ, Satter EA, Hess AF, Satter EC. Vasculogenic mimicry and tumor cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:414-421.
9. Hideshima T, Bergsagel PL, Kahl WM, Anderson KG. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood*. 2004;104:407-418.
10. Zhang H, Vekil V, Braucstein M, et al. Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance. *Blood*. 2005;105:3236-3244.
11. Rigolin GM, Taghi A, Ciccone M, et al. Soluble and tissue-type plasminogen activator receptor (sAPAR) as an independent factor predicting worse prognosis and extra-bone marrow involvement in multiple myeloma patients. *Br J Haematol*. 2003;120:953-959.
12. Woywot A, Scheer J, Henrich L, et al. Circulating endothelial cells as a marker of endothelial damage in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2004;103:3919-3925.
13. Baratin N, George F, Hattel M, et al. s-Endo 1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing novel human endothelial antigen. *Tissue Antigens*. 1995;49:521-530.
14. Vacca A, Ria R, Semerari F, et al. Endothelial cells in the bone marrow of patients with multiple myeloma. *Blood*. 2003;102:3349-3348.
15. Fidler IJ, Ellis LM. Neoplastic angiogenesis: not all blood vessels are created equal. *N Engl J Med*. 2004;351:2152-2161.
16. Guntilius E, Dube HC, Petzer AL, et al. Evidence from a leukemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet*. 2000;355:1688-1691.
17. Kottling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair: a new therapeutic concept? *N Engl J Med*. 2005;353:763-762.
18. Rafi S, Leydan D, Benazzou F, Hattel K, Hattel B. Vascular and hematopoietic stem cells: novel targets for antiangiogenic therapy? *Nat Rev Cancer*. 2002;2:825-835.
19. Hata K, Nagatsuma M. A new perspective on tumor endothelial cells: unexpected chromosome and centromere abnormalities. *Cancer Res*. 2005;65:2507-2510.
20. Bruno B, Rotta M, Giaccone L, et al. New drugs for treatment of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2004;5:430-442.

ORIGINAL ARTICLE

Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with hematological malignancies after treatment with filgrastim and chemotherapy for autologous transplantation

Endri Mauro, Gian Matteo Rigolini, Chiara Fraulini, Olga Sofritti, Maria Ciccone, Cristiano De Angeli, Gianluigi Castoldi, Antonio Cuneo

Section of Haematology, Azienda Ospedaliera Universitaria Arcispedale S. Anna, Department of Biomedical Sciences, University of Ferrara, Ferrara, Italy

Abstract In recent years, endothelial progenitor cells (EPCs), gave rise to increasing interest because of their possible use as a therapeutic tool in the treatment of vascular lesions in ischemic tissues or as a target for anti neoplastic therapy. It has been shown that several drugs can increase the number of EPCs into the peripheral blood (PB). However, there is insufficient data concerning the mobilization and collection of EPCs during CD34+ cell mobilization. In this study, we have evaluated EPC mobilization and collection in a series of 47 patients affected by lymphoid neoplasms (31 non Hodgkin lymphoma and 16 multiple myeloma) undergoing CD34+ cell mobilization with cyclophosphamide (4000 mg/m²) and Filgrastim (5 µg/kg). PB EPCs identified by flow cytometry as CD34+/VEGFR2+/CD133+ cells showed a peak on day +10. This peak paralleled that of PB CD34+/CD45+ cells. A direct correlation was observed between CD34+ and CD34+/VEGFR2+/CD133+ cells ($r = 0.99$ $P < 0.0001$). An average of 23.7×10^6 CD34+/VEGFR2+/CD133+ cells have been collected (range $12.1-41.76 \times 10^6$). These findings showed that in hematological diseases, cyclophosphamide in combination with filgrastim allows the mobilization and collection of large numbers of EPCs which may be used for reparative medicine studies in these patients.

Key words endothelial cells; stem cells mobilization; chemotherapy

Correspondence Endri Mauro, MD, Section of Haematology, University of Ferrara, Arcispedale S. Anna, Corso Giovecca 203, 44100 Ferrara, Italy. Tel: +390532236798; Fax: +390532212142; e-mail: sse@unife.it

Accepted for publication 13 January 2007

doi:10.1111/j.1600-0609.2007.00831.x

Accumulating evidence indicate that the peripheral blood (PB) of adults contains a population of circulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPCs) with properties similar to those of embryonal angioblasts (1). EPCs are capable to proliferate and readily migrate from the bone marrow, circulate, differentiate into mature endothelial cells (ECs) and contribute to tissue revascularization. ECs and EPCs are extremely rare in the peripheral blood, representing 0.01-0.0001% of total mononuclear cells (2).

EPCs have been identified by the co-expression of CD34, vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2, also known as Flk1 or KDR), and AC133 (also known as CD133 or prominin), a stem cell glycosylated polypeptide (3) that is present on EPCs but neither on monocytes nor on mature ECs (4).

The level of circulating EPCs has been proposed as a surrogate biologic marker for vascular function suggesting that EPCs may have a role in maintenance and reparative processes and in tumor development (5, 6).

In cardiovascular disorders, a striking correlation between circulating EPCs, Framingham risk factor score and flow mediated brachial reactivity has been shown, suggesting that insufficient circulating EPCs may reflect the progression of the cardiovascular disease (7). Elevated levels of circulating CD34+ cells and EPCs were found in the PB of patients with acute myocardial infarction (8) and in early stages of heart failure (9), while an impaired mobilization and/or a decreased EPC activity was observed in advanced stages of heart failure (9), in chronic renal failure (10), in inflammatory diseases with elevated levels of C reactive protein (11) as well as in

vasculitis (Wegener's granulomatosis) or rheumatoid arthritis (12, 13).

More recently, it was shown that low levels of CD34⁺/VEGFR2⁺/CD133⁺ cells were predictive of cardiovascular events (14).

Taken together these findings suggest that EPCs, modulated by bone marrow (BM) microenvironment, cytokines, expression of receptors and/or adhesive molecules, may play a significant role in the repair of ischemic tissues particularly in cardiovascular diseases.

In the literature there are numerous observations suggesting a possible clinical application of EPCs. In patients with acute myocardial infarction, the intracoronary injection of EPCs ameliorates post ischemia remodeling (15) while in patients with chronic limb ischemia after autologous stem cells transplantation, it was observed an improvement of pain and of cutaneous ulcers due to hypoxia (16). Furthermore in hematological malignancies and in solid tumors, chemotherapy and radiotherapy may induce vascular damage in particular arterial ischemia without thrombosis, coronary, and cerebral disease (17). Thus EPC collection could represent a useful strategy for treatment of ischemic complications in these patients. Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) alone or in combination with chemotherapy, is commonly used for CD34⁺ cell mobilization for autologous transplantation (18). It has been shown that G-CSF or granulocyte monocyte colony stimulating factor (GM-CSF) may mobilize EPCs (9). However, there is insufficient data concerning the mobilization and collection of EPCs during CD34⁺ cell mobilization.

In this study, we have evaluated the efficiency of EPC mobilization and collection in subjects with hematological diseases, treated with G-CSF in combination with chemotherapy for CD34⁺ cell mobilization.

Patients and methods

Patients

The study population comprised a total of 47 consecutive with lymphoid neoplasms patients: 31 patients affected by non Hodgkin's lymphoma (NHL), and 16 by multiple myeloma (MM). Principal clinical and hematological characteristics are summarized in Table 1. An informed consent was obtained from all participants.

To mobilize CD34⁺ cells, patients were treated with cyclophosphamide (CTX) (4000 mg/m² on day +1) and filgrastin (5 µg/kg/die, Amgen) from day +4 until completion of CD34⁺ cell collection. Peripheral blood CD34⁺ cells were counted by flow cytometry on day -1, +1, +7, from day +9 until completion of CD34⁺ cell collection, and on day +20.

Table 1 Clinical and laboratory characteristics of patients

Parameters	NHL (31 pts)	MM (16 pts)	All patients (47 pts)
Sex M/F	19/12	9/7	28/19
Age yr. (SD)	45.1 (10.6)	60.1 (7.0)	50.3 (11.8)
Stage			
I	3 ¹	3 ²	-
II	6 ¹	4 ²	
III	9 ¹	9 ²	
IV	13 ¹		
LDH U/L (SD)	448 (301)	287 (61)	387 (202)
β2microglobulin, mg/dL	2.54 (1.44)	3.69 (1.74)	2.93 (1.65)

¹ According to Ann Arbor staging.

² According to Salmon Durie staging.

Leukapheresis was performed from day +9 until at least 20 CD34⁺ cells/µL were counted in the peripheral blood. The target number of CD34⁺ cells was 5 × 10⁶/kg in NHL patients, and 10 × 10⁶/kg in MM.

Enumeration of CD34⁺ cells

On days -1, +1, +7, and from day +9 until +13, PB samples were collected in Vacutainers (Becton Dickinson, Milan, Italy). CD34⁺ cells were enumerated according to standard techniques (19). Briefly 100 µL of PB were labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-CD45 and with phycoerythrin (PE) conjugated anti-CD34⁺ monoclonal antibodies (Becton Dickinson) according to manufacturer's instructions and were analyzed by flow cytometry on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson).

EPC enumeration

Enumeration of EPC was performed on immunomagnetically purified PB CD34⁺ cells (Direct CD34 progenitor cell isolation kit; Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany), CD34⁺ cell purity >85%) by triple labeling, according to manufacturers' instructions, with Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP)-conjugated anti-CD34 (Becton Dickinson), PE-conjugated anti-AC133 (Miltenyi Biotec), unconjugated anti-VEGFR-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) followed by FITC-conjugated swine anti-rabbit (Dako, Milan, Italy) as secondary reagent. EPC were identified by flow cytometry as CD34⁺ cells coexpressing AC133 and VEGFR-2 (Fig. 1A) (9). All staining were referred to isotype-matched control antibodies.

PB EPCs were enumerated on day -1, 0, +7 and on the first day of CD34⁺ cell collection.

Enumeration of endothelial colonies (CFU-end)

Endothelial cultures were performed in triplicate as previously described (7). Briefly, density gradient isolated

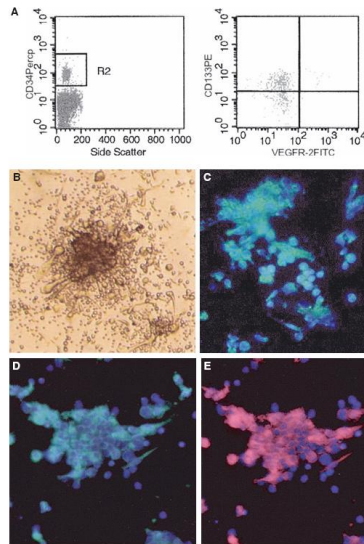


Figure 1 (A) Flow cytometric characterization of peripheral blood endothelial progenitor cells (EPCs). After gating on CD34⁺ cells that exhibited low side scatter (SSC) properties (left plot), EPCs were identified as CD34⁺ cells coexpressing AC133 and VEGFR2 (right plot). (B) Representative phase-contrast micrograph of CFU-endo, characterized by multiple thin, flat cells emanating from central cluster of rounded cells ($\times 200$). (C) Positive green staining for anti-CD31 antibody, cell nuclei have been counterstained by DAPI II (blue staining). (D-E) In simultaneous double fluorescence staining experiments, CFU-endo coexpress VEGFR2 (positive green staining for anti-VEGFR2 antibody) and factor VIII (positive red staining for anti-factor VIII monoclonal antibody), cell nuclei have been counterstained by DAPI II (blue staining).

PBMC were re-suspended in Medium 199 (GIBCO BRL Life Technologies, Paisley, UK) supplemented with 20% fetal calf serum, penicillin and streptomycin and plated on dishes coated with human fibronectin (Becton Dickinson). After 48 h, non-adherent cells were collected and replated. Growth medium was changed every 3 d and colonies were counted as previously described (7) after 7 d (Fig. 1B). Confirmation of EC lineage was performed with antibodies against CD31 (Becton Dickinson), VEGFR-2 and factor VIII (Dako) (Figs 1C-E). CFU-endo were enumerated on day -1 and from day +9 on PB. From day +9 CFU-endo were also enumerated on leukapheresis samples. Results were reported as absolute number of CFU-Endo in the total leukapheresis collection.

Leukapheresis collection

CD34⁺ cells were collected by means of leukapheresis using the COM.TEC blood cell separator (Fresenius HemoCare, Bad Homburg, Germany). Ten to 15 L of blood were processed during each leukapheresis session. Acid citrate-dextrose formula A (ACD-A) was used as anticoagulant. The peripheral blood mononuclear cell products were concentrated by centrifugation (100 \times 109 J) and mixed in a cryoprotective solution made of autologous plasma and dimethyl sulfoxide (DMSO) (10% final concentration). The suspensions were frozen in ethylene vinyl acetate (EVA) cryopreservation bags without rate-controlled freezing in an electrical freezer at -80°C and transferred for storage in liquid nitrogen.

Statistical analysis

Data are shown as mean \pm standard deviation (SD). Comparison between two or more groups was performed by Student's *t*-test and *ANOVA*, respectively. Comparison was by Tukey significance difference test. Correlations were tested by Pearson analysis. Probability was significant at level of <0.05 .

Results

Patients

Forty-seven patients, 28 male and 19 female, have been studied. The mean age of this group of patients was 50.3 yr (range 27–70), with a mean weight of 80.6 kg (range 42–120 kg).

31/47 (65.9%) of patients were affected by NHL (three cases in stage I, nine cases in stage II, six cases in stage III, 15 cases in stage IV according to Ann Arbor staging), while 16/47 (34.1%) patients were affected by MM (three cases in stage I, four cases in stage II and nine cases in stage III according to Salmon and Durie staging).

MM patients were older than NHL patients (60.12 (SD 6.90) vs. 45.19 yr (SD 10.55) respectively, $P < 0.01$).

No difference was observed concerning the other principal clinical/biological characteristics.

CD34⁺ and EPC mobilization

Following CTX and Filgrastim, 30/47 (63.6%) patients obtained a level of circulating CD34⁺ cells higher than 20 cells/ μ l and were therefore submitted to leukapheresis (25/31 NHL, 13/16 MM). CD34⁺ cells showed a peak on day +10 (mean value 61.00/ μ l, range 0.5–275; Fig. 2A) while CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺ cells showed a peak on day +9 (mean level 1.97/ μ l, range 0.13–8.6; Fig. 2B). A strict direct correlation was observed between PB CD34⁺ cells and CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺ cells during all days of mobilization (on day +9 $r = 0.99$, $P < 0.0001$, on day +10 $r = 0.99$, $P < 0.0001$, on day +11 $r = 0.99$, $P < 0.0001$, on day +12 $r = 0.99$, $P < 0.0001$). No significant correlations were instead observed between CFU-end from whole PB and from leukapheresis and CD34⁺ cells ($r = 0.03$, $P = n.s.$) or CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺ cells ($r = 0.19$, $P = n.s.$) on day +9 and on the subsequent days (data not shown).

CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺ and clinical aspects

We then evaluated CD34⁺ and CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺ mobilization according to hematological disease, age, and stage. Concerning CD34⁺ or CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺ levels, no statistically significant

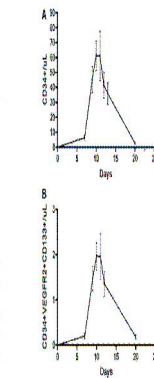


Figure 2 Level of PB CD34⁺ (A) and PB CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺ cells (B) following CTX and filgrastim treatment ($P = 0.04$ between day +7 and +9 and $P = 0.02$ between day +7 and +9, respectively, standard error mean values at each measure point are shown).

difference has been found on day +9 and +10 between NHL and MM. On day +10 no relationship between age and CD34⁺ levels ($r = -0.14$, $P = n.s.$), age and CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺ levels ($r = -0.14$, $P = n.s.$), age and CFU-end were observed ($r = -0.23$, $P = n.s.$). Disease stage didn't affect significantly the level of CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺ cells in patients with MM. In NHL patients we observed an earlier mobilization of CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺ cells in patients with limited disease (stages I and II) in comparison to patients with advanced disease (stages III and IV) ($P = 0.035$).

Collection of CD34⁺ cells, CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺, and CFU-end

Higher levels of CD34⁺ cells and CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺ cells have been collected on days +9 and +10 decreasing from +11 d (Figs 3A–B). CD34⁺ cells: $4.9 \times 10^6 \pm 347.14 \times 10^6$ SD on day +9 vs. $141.68 \times 10^6 \pm 172.52 \times 10^6$ SD on day +13, $P = 0.009$; CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺: $13.02 \times 10^6 \pm 11.09 \times 10^6$ SD on day +9 vs. $4.43 \times 10^6 \pm 5.40 \times 10^6$ SD on day +13 ($P = 0.05$).

The mean number of CFU-end collected from the leukapheresis was 1207.38 ± 2227 SD on day +9, 2081 ± 6128 SD on day +10, and 841.6 ± 784.7 SD on day +11, 475.6 ± 717.3 SD on day +12, and 965.1 ± 897.8 SD on day +13 (Fig. 3C).

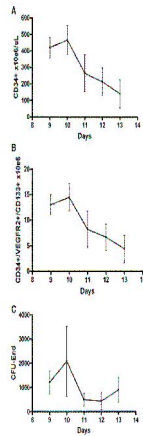


Figure 3 Test CD34⁺ cells (A), CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺ cells (B) and CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺ cells (C) during mobilization. Error bars represent standard deviation.

Discussion

In developed countries, half of deaths are caused by cardiovascular and ischemic disorders (30). From animal models (21) and clinical studies (22, 23), there is evidence that EPCs could represent a useful tool for the treatment of ischemic complications in these patients. Taken together, these observations suggest that stem cells and in particular CD133⁺ EPCs might contribute in adults to neovascularization by improving the perfusion of ischemic tissues and consequently by activating a reparative process into ischemic areas.

Several drugs have been investigated in order to improve EPC mobilization to potentiate this reparative process. To this extent, it was shown that statins and estrogen rapidly increase the numbers of circulating EPCs (24, 25). To induce an increase of circulating EPCs, stimulating factors including erythropoietin (26),

GM-CSF (27), and G-CSF (8, 28) have also been employed.

G-CSF or GM-CSF with or without high-dose cyclophosphamide is a common regimen for mobilization of hematopoietic stem cells (29). However, it is unknown whether this regimen may also induce the mobilization and collection of a significant number of EPCs. This possibility could represent a significant observation in order to use these EPCs for reparative therapies in case of possible ischemic complications in patients treated with chemotherapy and radiotherapy (17).

Following cyclophosphamide and G-CSF, we observed that in the PB of MM and NHL patients there is a significant mobilization of EPCs with CD34⁺VEGFR2⁺/CD133⁺ immunophenotype. The profile of EPC mobilization follows strictly the kinetics of CD34⁺ cell mobilization (30). Our data also showed that EPCs can be collected by leukapheresis in significant numbers. To obtain a therapeutic effect, it is very important to have a high available number of EPCs. In a recent paper (23) up to 1.5 × 10⁶ CD133⁺ BM cells were injected into the infarct border zone while in another study (21) 5.2 × 10⁶ CD133⁺ BM cells have been used. In this study, we were able to obtain an average of 23.7 × 10⁶ of CD34⁺VEGFR2⁺CD133⁺ cells (range: 12.1–41.76 × 10⁶). This number is significantly higher than that used in the previous studies.

The mobilization and collection of significant numbers of EPCs following CTX and G-CSF offers the possibility to collect these cells from PB at the time of stem cells mobilization for transplantation purposes, making an adequate number of frozen EPCs rapidly available for therapeutic applications. It is well known that mechanisms of tissue repair should be activated rapidly to obtain significant results (31) and EPCs stored at -196°C may be useful if ischemia would occur after the mobilization or after the completion of the planned treatment. Furthermore, with this approach CD34⁺VEGFR2⁺/CD133⁺ cells can be easily collected and used for *in vivo* or *ex vivo* studies to better evaluate their biologic characteristics and their therapeutic utility in reparative medicine approaches (22, 32). However, it remains to be elucidated whether these cells are able to maintain, following mobilization and collection, their functional capacities both *in vitro* and *in vivo*. We cannot exclude that cyclophosphamide could negatively influence EPC biological and replicative features.

In conclusion, we have shown that in hematological diseases cyclophosphamide in combination with filgrastim allows the mobilization and collection of large number of EPCs along with CD34⁺ cells. The possibility to collect and to store these cells could represent a promising therapeutic tool in the treatment of ischemic complications in patients treated by chemotherapy.

Acknowledgments

This work was supported by Grant (067) on AHR regional grant, MIUR PRIN, MIUR, FIRB and STAM-INA project.

References

1. Auhara T, Maruoka T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzerschlager B, Schattman Gu Iber JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997;275:964-7.
2. Ingram DA, Copple NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 2005;106:1525-31.
3. Pochler M, Nayer AJ, Ferrara D, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000;95:52-8.
4. Hängglinger R, Gvoeck PR, Löring T, Chen X, Bahring H, Neumann D, Kni S. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2005;996:141-51.
5. Kozlov AY, Fialat T. Endothelial progenitor cells. *Ann Rev Med* 2005;54:79-91.
6. Rigolin GM, Furlan C, Claes M, Mauro E, Bugli AM, De Angelis C, Negri M, Cusano A, Castoldi G. Neoplastic circulating endothelial cells in multiple myeloma with 1q41 deletion. *Blood* 2005;107:2531-5.
7. Hill JM, Zlot G, Hakon JP, Schenke WH, Wadlow MA, Qayyumi AA, Hinkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003;348:593-600.
8. Simeoni S, Minolati T, Bacci H, Ueno T, Hosoya T, Kashi A, Sasaki K, Shimada T, Oku Y, Imatani T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001;103:276-9.
9. Veljicini M, Rigolin GM, Fialat A, et al. CD133+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 2004;110:209-2.
10. Chow HH, Kim KL, Huh W, Kim B, Bean J, Suh W, Sang J, Joo HS, Oh HY, Kim DK. Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1246-52.
11. Verro S, Kulstewski MA, Li SH, et al. C-reactive protein fraction: further evidence of mechanistic link between C-reactive protein and cardiovascular disease. *Circulation* 2004;109:2054-8.
12. Häfner K, Haerter S, Oelshlegel U, Petrowski F, Försster S, Pössner J. Endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis is associated with a reduced number and impaired function of endothelial progenitor cells. *Ann Rheum Dis* 2006;65:157-63.
13. Gösser J, Aitako D, Steyer CW, et al. Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Circulation* 2005;111:204-11.
14. Werner N, Kosol S, Schiögl T, Amler P, Wlontas K, Lisk A, Böhm M, Nitzberg G. Circulating endothelial progenitor cells are cardiovascular outcomes. *A Engl J Med* 2003;349:99-106.
15. Britten MB, Abdelmalek MD, Asyem B, et al. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cells treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 2005;112:212-8.
16. Yamamoto K, Kondo T, Suzuki S, Iwata H, Kobayashi M, Enji N, Komori K, Nawa T, Takamasa J, Murohara T. Molecular evaluation of endothelial progenitor cells in patients with ischemic heart disease: effects by stem cell transplantation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:192-5.
17. Weiss RB. Miscellaneous toxicities. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenber SA, eds. *Cancer: Principles and Practice*. Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins, 2001:264-76.
18. Demner T, Buckner CD, Storer B, Lilly K, Rowley S, Chh R, Arzooian FR, Smith R, Bessinger WJ. Effect of different chemotherapy regimens on peripheral blood stem cell collection in patients with breast cancer receiving granulocyte colony-stimulating factor. *J Clin Oncol* 1998;16:2601-12.
19. Barnett D, Granger V, Kraus J, Wholly L, Ralby JL, Papp S, Gattum JW. Reduction of intra- and inter-laboratory variation in CD34+ stem cell enumeration using stable test material, standard protocols and targeted staining. *Br J Haematol* 2003;108:74-92.
20. Malhotra A, Martin JF. Stem cells and repair of the heart. *Lancet* 2005;364:113-9.
21. Andoza T, Maroto H, Takahashi T, Kishi C, Fucini C, Silver M, Amano M, Magier M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221-8.
22. Sanna C, Westphal H, Kienz HD, Pirzoch M, Kötter C, Klinge H, Schanzsch C, Namber CA, Freund M, Steinböl G. Autologous bone marrow stem cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;361:65-5.
23. Aviles FF, San Roman JA, Finkel DG, et al. Intracoronary stem cell transplantation in acute myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol* 2004;57:201-8.
24. Vasa M, Fichtelcher S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiser AM, Dimmeler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001;103:283-8.
25. Stebbins K, Werner B, Berwiler J, et al. Intracoronary bone marrow derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2003;107:956-65.

ORIGINAL ARTICLE

Neoplastic circulating endothelial-like cells in patients with acute myeloid leukaemia

Gian Matteo Rigolin, Endri Mauro, Maria Ciccone, Chiara Fraulini, Olga Solfritti, Gianluigi Castoldi, Antonia Cunzio

Haematology Section, Department of Biomedical Sciences, Azienda Ospedaliero-Universitaria Ariosteclada S. Anna, University of Ferrara, Ferrara, Italy

Abstract

Accumulating evidence suggests that angiogenesis may play a key role in the pathogenesis of leukaemic disorders. Several studies have shown that bone marrow-derived endothelial cells (EC) may contribute to tumour angiogenesis and that in the peripheral blood of cancer patients there is an increased amount of circulating ECs (CECs) that may participate to new vessel formation. In this report, we showed that, in seven acute myeloid leukaemia (AML) patients with known cytogenetic abnormalities, CEC levels were significantly increased in comparison with controls and that a significant proportion of these CECs carried the same chromosomal aberration as blast cells (20–78%, mean value 42.1% of CECs). Most of CECs (mean value 74.4%) displayed immunophenotypic features of endothelial progenitor cells as they expressed CD133, a marker gradually lost during EC differentiation and absent on mature EC. These findings suggest a possible direct contribution of AML-related CECs to tumour vasculogenesis and possibly to the spreading and progression of the disease.

Key words: circulating endothelial cells; endothelial progenitor cells; acute myeloid leukaemia; vasculogenesis

Correspondence: Gian Matteo Rigolin MD PhD, Haematology Section, Department of Biomedical Sciences, University of Ferrara, Azienda Ospedaliero-Universitaria Ariosteclada S. Anna, Corso Giovecca 203, 44100 Ferrara, Italy. Tel: +39 0532 205100, Fax: +39 0532 212142; e-mail: rigolin@unife.it

Accepted for publication 5 February 2007

doi:10.1111/j.1600-0609.2007.01839.x

Accumulating evidence suggests that angiogenesis is involved in the pathogenesis of myeloid haematological malignancies, including acute myeloid leukaemia (AML) and myelodysplastic syndromes (MDS). In AML and MDS, it was shown that vascular and angiogenic factors are increased in most patients (1, 2) and that blast cell-derived angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) are independent predictors of outcome and progression of the disease (3). It has also been demonstrated that leukemic blasts not only produce angiogenic factors but also selectively express their functional receptors resulting in the generation of an autocrine loop (4, 6) that promotes the leukemogenic process.

Several studies have suggested that bone marrow-derived endothelial cells (ECs) may contribute to tumour angiogenesis (7–9) and that in the peripheral blood of

cancer patients there is an increased amount of circulating ECs (CECs) (10) that may participate to new vessel formation (11). In an animal model of leukaemia it was also demonstrated that both an autocrine (EC-independent) and a paracrine (EC-dependent) VEGF/VEGFR signalling pathway contribute to the leukemogenic process suggesting that both the angiogenic loops need to be blocked to achieve long-term therapeutic results (5).

Recent data have showed that ECs in B-cell lymphomas and in multiple myeloma are in part tumour-related reflecting a novel aspect of tumour angiogenesis (12, 13). All together, these observations suggest that tumour cells can elicit the sprouting of new vessels from existing capillaries not only through the secretion of angiogenic factors (14) but also, in some cases, by mimicking the activities of ECs and participating in the formation of vasculature-like networks (15).

To clarify if CECs in AML are at least in part tumour-related, we studied seven patients with AML and different cytogenetic aberrations and sought to characterise immunomagnetically sorted CECs by immunophenotypic analyses, and by fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) studies.

Materials and methods

Patients

Seven patients with a diagnosis of AML and with known cytogenetic aberrations were considered in this study. The diagnosis of AML was made in accordance with FAB criteria (16). Cytogenetic analysis was performed at diagnosis according to standard techniques and results were reported using the International System for Cytogenetic Nomenclature Criteria (17). All patients carried the cytogenetic aberration in 75–100% of blast cells. Seven age- and sex-matched healthy subjects were used as normal controls. All patients and controls gave written informed consent to an ethics committee-approved protocol.

Circulating EC quantification

Circulating EC quantification was evaluated by four-colour flow cytometry as previously described (10). Briefly, flow cytometric analysis was carried out on whole peripheral blood collected in EDTA-containing tubes (Vacutainers; Becton Dickinson, Milan, Italy). All samples were analysed within 3 h from collection using 'lyse-no-wash' procedures. Multiparametric flow cytometry acquisition was performed with a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) running CELLQUEST software (Becton Dickinson). Daily instrument quality controls were performed to ensure sensitivity and reproducibility (18). At least 250 000 events were acquired for each sample. The following antibodies have been used according to manufacturers' instructions: FITC-conjugated murine anti-CD31 (clone WM59; Becton Dickinson), PerCP-conjugated murine anti-CD34 (clone 8G12; BD), APC-conjugated murine anti-CD45 (clone 2D1; Becton Dickinson), PE-conjugated murine anti-CD133 (clone AC133; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), PE-conjugated murine anti-CD146 (clone P1H12; Becton Dickinson), rabbit anti-VEGFR2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) followed by FITC-conjugated swine anti-rabbit immunoglobulins (DAKO, Milan, Italy) as secondary reagent. Isotype-matched negative controls were used in all assays. The analysis was performed excluding cellular debris in a side scatter/forward scatter dot plot. CEC were defined as negative for the haematopoietic marker

CD45 and positive for the endothelial markers CD31, CD146 and CD34. Endothelial progenitor cells (EPC) were defined as CD45 negative, CD34 positive, VEGFR-2 positive and CD133 positive cells (Fig. 1). Based on the expression of CD133, an antigen gradually lost during EC differentiation, an immature to mature CEC ratio was calculated (EPC ratio = percentage of CD133 positive CEC/percentage of CD133 negative CEC). The percentage of positive cells was calculated by subtracting the value of the appropriate isotype controls. The specific percentage of positive cells was converted into the absolute number of positive cells/ μ L using the following formula: percentage of positive cells \times WBC count/100.

Circulating endothelial cells isolation and characterisation

Circulating ECs were isolated as previously described (13). Briefly, 20 mL of peripheral blood were obtained at enrolment and CECs were isolated by immunomagnetic sorting, according to manufacturer's instructions, with Dynabeads Pan Mouse IgG (DynaL, A.S. Oslo, Norway) by a two-step approach. To eliminate haematopoietic cells that are CD45 positive and to isolate CECs that are CD45 negative, we first performed a negative selection with Dynabeads coated with anti-CD45 (clone 2D1; Becton Dickinson). CD45 negative cells were subsequently subjected to a positive selection with Dynabeads coated with anti-CD146 antibody (clone P1H12; Becton Dickinson). CD146 (also known as MCAM, MUC18, Sca-1 and Mel-CAM9) is an antigen expressed almost exclusively on EC, the exception being stroma cells, smooth muscle cells, follicular dendritic cells, some tumour cell lines (19) and activated T lymphocytes (20). Its absence on haematopoietic cells makes CD146 a helpful reagent to specifically discriminate endothelium from haematopoietic tissues (19). For further characterisation, immunomagnetically sorted cells were then stained with Ulex Europaeus lectin I (UEA-I; Dako) followed by FITC-conjugated swine anti-rabbit immunoglobulins (Dako) as secondary reagent, and in double staining experiments with the following antibodies: rabbit anti-VEGFR-2 (Santa Cruz Biotechnology) followed by FITC-conjugated swine anti-rabbit immunoglobulins (Dako) as secondary reagent in combination with murine anti-human von Willebrand factor (vWF) antibody (Dako) followed by TRITC-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins (Dako); FITC-conjugated rabbit anti-CD144 antibody (VE-Cadherin, Serotec, Oxford, UK) in combination with murine anti-human vWF antibody followed by TRITC-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins as secondary reagent; murine anti-human vWF antibody followed by FITC-conjugated rab-

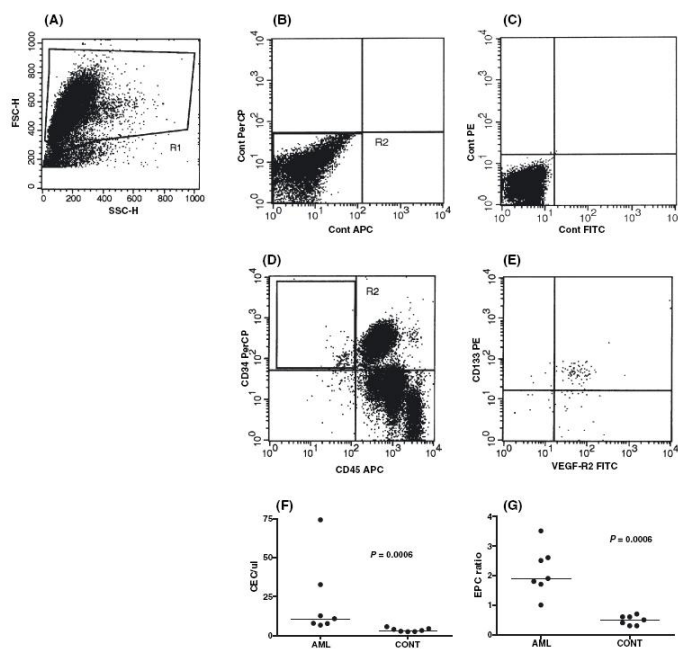


Figure 1 Four colour flow cytometric evaluation of circulating endothelial progenitor cells (EPC). After gating on forward and side scatter properties to exclude platelet, dead cells and debris (A), EPC were identified as CD45 negative and CD34 positive cells (D), expressing CD133 and VEGF-R2 (E). Panels B and C show corresponding negative controls. Based on the expression of CD133, an immature (CD133 positive) to mature CEC (CD133 negative) ratio was calculated. In F and G, CEC levels and EPC ratio in AML patients and in sex- and age-matched controls.

bit anti-mouse immunoglobulins (Dako) as secondary reagent in combination with PE-conjugated murine anti-CD13 antibody (clone L138; Becton Dickinson); murine anti-human vWF antibody followed by FITC-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulins as secondary reagent in combination with PE-conjugated murine anti-CD33 antibody (clone P67.6; Becton Dickinson); FITC-conjugated murine anti-CD45 (clone 2D1) in combination with PE-conjugated murine anti-CD14 (clone MoP9; Becton Dickinson). Evaluation of immunophenotypic results was performed using a Nikon fluorescence-equipped microscope with a charge-coupled black and

white camera device and appropriate hardware and software (Cytovision System, Applied Imaging distributed by Nikon Italy, Florence, Italy).

Fluorescence *in situ* hybridisation analysis on CECs

The following probes were used: direct red chromosome 8 alpha satellite probe (D8Z1; Q-BIO Gene, Cambridge, UK), Spectrum orange CEP 11 alpha satellite DNA probe (D11Z1; Vysis Downers Grove, IL, USA), LSI PML/RARA dual colour translocation probe (Vysis), LSI BCR/ABL dual colour single fusion translocation

probe (Vysis), LSI D75406 (7q31) Spectrum orange/CEP 7 Spectrum green probe (Vysis). A detailed description of the technique has been reported previously [2]. Briefly, immunomagnetically sorted CECs were washed twice in 4°C saline sodium citrate (SSC; Vysis) for 5 min each, subsequently dehydrated in ethanol alcohol series (70%, 85%, 100%) and air-dried. The slides were pre-warmed on a hot plate and then immersed in a 70% formalin 2×SSC solution at 72°C for 5 min and dehydrated again with an alcohol series at -20°C. Each probe (0.1 µL) was added to each slide and covered with a coverslip. Rubber cement was used to seal the edges, and the slides were incubated overnight at 37°C in a moist chamber. Post-hybridisation washes included baths at 73°C in 0.4× SSC/0.3% NP-40 (Vysis) for 5 min, and at room temperature in 2× SSC/0.1% NP-40, without intermittent agitation. Cells were subsequently stained with PE conjugated murine anti-CD133 antibody (AC133; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to manufacturer's instructions. Evaluation of FISH results was performed using a Nikon fluorescence-equipped microscope with a charge-coupled black and white camera device and appropriate hardware and software (Cytovision System). To prevent false interpretation because of inefficient hybridisation, only those areas with >80% of cells showing the expected signal configuration were analysed (control probe). The cut off values for the identification of trisomy and translocations was set at 5% and 8% respectively. To ensure better visualisation and reproduction of the images, pseudo-colours were attributed to the background, the cells, and the signals.

Results

Patients and CEC quantification

Demographic and principal clinical characteristics of the seven patients are reported in Table 1. Flow cytometric analysis was performed at diagnosis and after induction treatment. At diagnosis, the flow cytometric quantifica-

tion of CEC showed significantly ($P = 0.006$) elevated levels of CECs in AML patients (median value 10.7 CEC/µL) compared with the control group (median value 5.1 CEC/µL; Fig. 1). The EPC ratio was significantly ($P = 0.006$) increased in AML patients (median value 1.9) in comparison with controls (median value 0.5; Fig. 1). After induction treatment, patients achieving complete remission (CR) showed a significant reduction of CEC levels and EPC ratio compared with diagnosis (median CEC value 11.6 vs. 2.7/µL, $P = 0.029$; median EPC ratio 2.2 vs. 0.7, $P = 0.029$) while no difference was observed in non-responding (NR) patients (median CEC value 7.7 vs. 8.6/µL, $P = n.s.$; median EPC ratio 1.8 vs. 2.1, $P = n.s.$; Fig. 2).

CEC isolation and characterisation

In all experiments more than 95% of immunomagnetically sorted cells were of EC origin as demonstrated by phenotypic analyses (Table 2, Fig. 3). The mean percentage of CD45⁺ cells after immunomagnetic selection was 0.5% (range 0.0–0.5%). CD14 was expressed in 0.2% of all immunomagnetically sorted CECs (range 0.0–0.5%, Table 2). The great majority of immunomagnetically sorted CECs coexpressed VEGFR2 and vWF (mean value 98.9%, range 93.5–100%, Figs 3A and B), and CD144 and vWF (mean value 99.0%, range 98.00–100%, Figs 3C and D). UEA-1 lectin positive staining was present in 97.7% of all CECs (range 57.0–98.5%). Very few immunomagnetically sorted CECs coexpressed vWF and the AML blast cell associated antigens CD13 (mean value 0.2%, range 0.0–0.5%, Figs 3E and F) and CD33 (mean value 0.17%, range 0.0–0.5%, Figs 3G and H).

FISH analysis on CECs

FISH analysis showed that, in AML patients, a significant proportion of CECs was tumour-derived because they harboured the same cytogenetic lesion as observed in neoplastic blast cells. The fraction of CECs showing the cytogenetic aberration averaged 42.1% (range 20–

Table 1 Demographic and principal clinical characteristics of patients

Case no.	Name	Age/sex	Diagnosis FAE	Cytogenetics (no. cytobands analysed)	FSH (%)	WBC (10 ⁹ /L)	HB (g/dL)	Ht (10 ¹² /L)	CEC (%)	CEC (µL)	CEC ratio
1	FG	69M	M3	t(15;17)(q22;q21) [1/821]	36	5.9	8.4	14	3.11	8.6	3.6
2	BC	84F	M3	t(15;17)(q22;q21) [15/20]	36	17.9	9.1	9	3.08	16.7	1.9
3	BG	78M	M1	0k22q34[1] [1/1000]	130	63.0	13.6	36.0	2.14	74.2	2.6
4	FS	70F	M5	trisomy 7 [1/920]	55	4.6	8.3	30	3.17	7.7	1.8
5	PE	70F	M1	trisomy 8 [2/20]	30	16.4	9.0	214	2.12	12.8	1.7
6	EE	74M	M4	trisomy 11 [1/100]	36	19.1	9.6	23	2.04	7.6	1.6
7	ML	70F	M4	trisomy 8 [1/20]	62	81.5	11.3	41	2.04	32.6	2.6

FISH fluorescence in situ hybridisation; CEC, circulating endothelial cells.

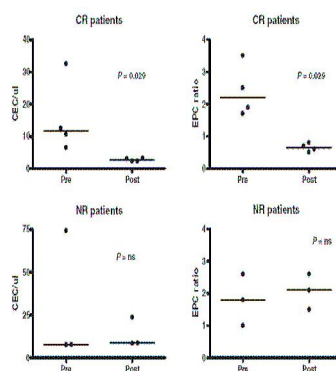


Figure 2 Circulating endothelial cell levels and endothelial progenitor cells ratio pre- and post-induction chemotherapy in patients achieving complete remission and nonresponding to chemotherapy.

Table 2 Immunophenotypic characterisation of CECs in AML patients

Case no.	UEA-1+ CECs/total CECs (%)	VEGFR-2+ vWF+ CECs/total CECs (%)	CD144 ⁺ vWF+ CECs/total CECs (%)	vWF+ CD33 ⁺ CECs/total CECs (%)	vWF+ CD133 ⁺ CECs/total CECs (%)	CD45 ⁺ cells/total CECs (%) [CD45 ⁺ CD14/CD45 ⁺ CD14 ⁺]
1	196/200 (97.5)	198/200 (99.0)	198/200 (99.0)	0/200 (0.0)	1/200 (0.5)	1/200 (0.5) (0/1)
2	196/200 (98.0)	200/200 (100)	200/200 (100.0)	0/200 (0.0)	ND	1/200 (0.5) (1/0)
3	197/200 (98.5)	197/200 (98.5)	198/200 (99.0)	0/200 (0.0)	ND	0/200 (0.0) (0/0)
4	195/200 (97.5)	198/200 (99.0)	ND	1/200 (0.5)	0/200 (0.0)	ND
5	194/200 (97.0)	197/200 (98.5)	ND	0/200 (0.0)	0/200 (0.0)	1/200 (0.5) (0/1)
6	195/200 (97.5)	197/200 (98.5)	198/200 (99.0)	ND	1/200 (0.5)	ND
7	ND	198/200 (99.0)	ND	0/200 (0.0)	0/200 (0.0)	0/200 (0.0) (0/0)

ND, not done; CECs, circulating endothelial cells; AML, acute myeloid leukaemia; vWF, von Willebrand factor.

78%, 200 cells observed in each case; Table 3). The majority of CECs presented features of EPC because they expressed CD133, a marker gradually lost during EC differentiation and absent in mature ECs (CD133⁺ CECs; mean value 74.4%, range 69–82%, Table 3). Overall 98.5% of AML CECs with cytogenetic abnormalities were CD133 positive (Fig. 4 and Table 3). Four patients (two obtaining CR and two NR) were analysed after induction treatment. In the two patients in CR (no 1 and 2) no clonal CEC were observed after induction treatment while in the two patients with resistant disease (no 3 and 4) a significant proportion of clonal CEC was still present (45% and 28% respectively).

Discussion

Several lines of research have shown that in leukaemic disorders angiogenesis is increased and possibly involved in the leukaemogenic process (1–5, 22). In the peripheral

blood of AML patients there is an increased amount of CECs that correlate with disease status and response to therapy (23) supporting the idea that CEC could represent a marker of angiogenesis.

Accumulating evidence suggests that, in different haematological malignancies, ECs may be involved in the neoplastic process. It was recently found that VEGFR2+ cells carrying the BCR/ABL fusion gene could be isolated from the bone marrow of chronic myeloid leukaemia (CML) patients and that these cells could differentiate both into malignant cells and into phenotypically defined ECs at the single-cell level (24) suggesting that the BCR/ABL rearrangement might happen at or even before the level of the haemangioblast progenitor cell (25). There is also evidence that in B-cell lymphomas and in multiple myeloma ECs are in part tumour-related reflecting a possible novel aspect of tumour angiogenesis (12, 13).

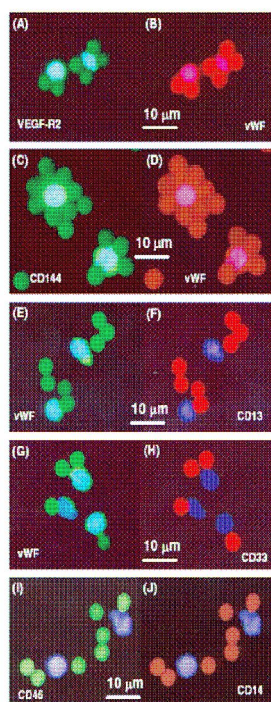


Figure 3 Immunophenotypic characterization of immunomagnetically sorted circulating endothelial cells (CECs) by means of Dynabeads in AML patients. White arrows indicate CECs: cell nuclei have been counterstained with DAPI II (blue staining). In simultaneous double fluorescence staining experiments, CECs coexpress VEGFR-2 (positive green staining for anti-VEGFR-2 antibody, A) and von Willebrand factor (vWF, positive red staining for anti-vWF monoclonal antibody, B), and CD144 (positive green staining for anti-CD144 monoclonal antibody, C) and vWF (positive red staining for anti-vWF monoclonal antibody, D). Immunomagnetically sorted CECs do not coexpress vWF (positive green staining for anti-vWF monoclonal antibody, E and G) with acute myeloid leukaemia (AML) cell associated markers CD13 (negative red staining for anti-CD13 monoclonal antibody, F) and CD33 (negative red staining for anti-CD33 monoclonal antibody, H). In AML patients, immunomagnetically sorted CECs do not express CD45 (negative green staining for anti-CD45 monoclonal antibody, I) and CD14 (negative red staining for anti-CD14 monoclonal antibody, J). Note that several Dynabeads are attached to the cells and that beads present red or green staining depending on the filter used for fluorescence analysis.

Table 3 Combined FISH and immunophenotypic characterisation of CECs in AML patients

Case no.	CD133 ⁺ CECs/total CECs (%)	CECs with abnormal cytogenetics/total CECs (%)	CD133 ⁺ CECs with abnormal cytogenetics/CECs with cytogen abnorm (%)
1	164/200 (82.0)	81/200 (40.5)	80/81 (98.8)
2	163/200 (75.0)	40/200 (20)	40/40 (100)
3	150/200 (75.0)	156/200 (78)	147/156 (94.2)
4	152/200 (76.0)	70/200 (35)	70/70 (100)
5	143/200 (71.5)	85/200 (42.5)	85/85 (100)
6	138/200 (69)	90/200 (45)	88/90 (97.8)
7	146/200 (72.5)	88/200 (44)	87/88 (98.9)

FISH, fluorescence *in situ* hybridisation; CECs, circulating endothelial cells; AML, acute myeloid leukaemia.

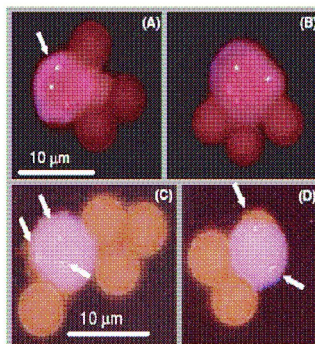


Figure 4 Multicolour fluorescence *in situ* hybridisation analysis of immunomagnetically sorted CECs by means of Dynabeads in AML patients. (A) One CEC with PM1/RARA rearrangement (one red signal, one green signal and one yellow fusion signal as indicated by the arrow) and (B) one cytogenetically normal CEC with two red and two green signals. (C) One CEC with trisomy 8 (three red signals) and (D) one cytogenetically normal CEC with two red signals (two arrows). In AML patients, most of CECs are EPCs, as they express CD133 a marker gradually lost during EC differentiation (positive red staining for PE-conjugated murine anti-CD133 monoclonal antibody). Note that several Dynabeads are attached to the cells.

In this report we have shown that in AML patients with known cytogenetic aberrations, CECs were increased in comparison with healthy controls and that a significant proportion of these CECs were tumour-related as they carried the same chromosome aberration as the blast cells. This phenomenon does not appear to be associated with a particular cytogenetic aberration or WHO

subtypes of AML. In addition, we found that in AML the majority of CECs presented EPC features as they expressed CD133, a marker gradually lost during EC differentiation and absent on mature ECs, while in controls most of CECs had a more mature phenotype. Response to treatment was associated with a significant reduction of CECs, with a normalisation of the EPC ratio and with a disappearance of neoplastic EPC, while in NR patients we observed no reduction in CEC levels and in the EPC ratio and the persistence of clonal CECs.

Different mechanisms may be proposed as a possible explanation for our findings (26). First, ECs and blast cells may have derived from a common multipotent haemangioblast precursor cell, as suggested by evidence coming from studies in CML patients (24, 25) and from the observation that most of AML CECs display immunophenotypic features of EPCs. According to this hypothesis, in AML patients, angiogenic factors secreted into the microenvironment could actively recruit bone marrow neoplastic haemangioblast precursor cells and induce them to differentiate not only into blast cells but also into EPCs. These EPCs could then enter blood circulation and contribute to neovasculogenesis and tumour dissemination.

Alternatively, the CECs that carry the same genetic lesion of blast cells may have arisen, under the influence of microenvironmental angiogenic factors, through a process of transdifferentiation including first the dedifferentiation of a leukaemic cell already committed to the myeloid lineage into a progenitor cell with EC/myeloid potentiality followed by a redifferentiation into EC-like cells (27). To this extent there is evidence that leukaemic cells can retain the capability to acquire phenotypic and functional characteristics of different lineages, suggesting that the EC characteristics could represent a functional state induced by environmental stimuli (28). Disguised blast cells may then mimic functional ECs and contribute to tumour neovasculogenesis (27).

A further intriguing hypothesis is that our findings could represent the results of a particular process of heterotypic cell fusion, where cells of different lineages fuse to form, first, a heterokaryon (a cell with two nuclei) and then a synkaryon, a cell with a single nucleus resulting from the loss or re-sorting of chromosomes. Most of the fused cells will either die or enter quiescence, but a fraction, possibly those in the synkaryon stage, might be able to proliferate, and contribute to tumour vasculature. Bone marrow-derived cells have in fact emerged as the best candidate for heterotypic fusion under environmental stimuli, in a process that may involve a number of as yet unknown environmental factors (29–31). Alternatively it may be postulated that horizontal gene-transfer phenomena might

have occurred involving the taking up by EPC of fragmented DNA deriving from apoptotic neoplastic cells. This acquisition of genetic material might then lead to EPC nuclear reprogramming that may favour the diffusion and the progression of the disease (30). It seems unlikely that, as observed in solid tumours, our findings could reflect an inherent cytogenetic instability of tumour ECs, because FISH results were not consistent with the heterogeneous cytogenetic profile of ECs observed in solid tumours (32).

The results presented in this paper, show that in AML there is an increase of CECs and that the immature fraction of these cells harbours the genetic lesion. This may suggest that in AML patients the neoplastic microenvironment might determine an activation of the vasculogenic potential that includes both neoplastic and non-clonal bone marrow-derived CECs with EPC features. However, from the observation that AML CECs represent only a component of all CECs with EPC features, it is possible to speculate that neoplastic CECs might act as a sort of bridgehead on which more numerous and more specialised and functionally active bone marrow-derived EPCs of non-clonal origin could actively differentiate in mature vessels and contribute to tumour neovasculatisation and spreading. In line with this view, it was in fact recently shown that clonal NPM exon-12 mutations could not be detected in endothelia by laser-microdissection from 3 NPMc+ CD34 negative AML patients (33). By contrast, in healthy subjects most of CECs have the features of mature EC suggesting that in these patients the neoplastic angiogenic switch has not been activated and that the vasculogenic potential of the bone marrow microenvironment is still under control. Additional studies are warranted to clarify, on hospital samples of AML patients, the actual contribution of AML-derived EC with specific cytogenetic aberrations to tumour neovasculogenesis and spreading.

In conclusion, our findings suggest that in AML patients CECs are increased, with EPC features and in part tumour related. These CECs may contribute to tumour neovasculogenesis and possibly to the spreading and progression of the disease. The study of CECs may have important implications not only for the understanding of AML-specific biological aspects but also for the translation of new antiangiogenic therapies to the clinic (34).

Acknowledgement

This study was supported by MURST 60%, by AIRC regional grant, by MIUR PRIN, by MIUR FIRB, by STAMINA project and by AIL.

References

1. Aguayo A, Kantarjian H, Maushori T, et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000;96:2240-5.
2. Hüssung JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000;95:309-13.
3. Aguayo A, Estey E, Kantarjian H, Mansouri T, Gidel C, Keating M, Giles F, Estrov Z, Barlogie B, Albitar M. Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 1999;94:3717-21.
4. Fiedler W, Graeven U, Eigon S, Vengo S, Klicic N, Stockschlader M, Hoesfeld DK. Vascular endothelial growth factor, a possible pattern growth factor in human acute myeloid leukemia. *Blood* 1997;89:1870-5.
5. Dias S, Hattori K, Zhu Z, et al. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *J Clin Invest* 2000;106:511-21.
6. Schliemann C, Bieker R, Padro T, Kessler T, Hentelmann H, Buchner T, Berdel WE, Mesters RM. Expression of angiopoietins and their receptor Tie2 in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Hematologica* 2006;91:1203-11.
7. Lyden D, Hattori K, Dias S, et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001;7:1194-201.
8. Hilde W, Dirnhofer S, Oberwiesacher F, Schmid T, Gunsilius E, Hilde G, Wolf E, Kahler CM. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 2004;57:965-9.
9. Peters BA, Diaz LA, Polyak K, et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nat Med* 2005;11:261-2.
10. Mancuso P, Burfini A, Pruner G, Goldhirsch A, Martinelli G, Bertolini F. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood* 2001;97:2658-61.
11. Beerpoort LV, Mehra N, Vermaat JS, Zonnenberg BA, Gebbink MF, Voest EE. Increased levels of viable circulating endothelial cells are an indicator of progressive disease in cancer patients. *Ann Oncol* 2004;15:139-45.
12. Straubel B, Chott A, Halber D, Exner M, Jager U, Wagner O, Schwarzenberger J. Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2004;351:250-9.
13. Rigolin GM, Fratini C, Ciccone M, Mauro E, Bugli AM, De Angeli C, Negrini M, Cuneo A, Castoldi G. Neoplastic circulating endothelial cells in multiple myeloma with 13q14 deletion. *Blood* 2006;107:2531-5.
14. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-95.
15. Hendrix MJ, Seflor EA, Hess AR, Seflor RE. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* 2003;3:411-21.
16. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flindrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposal revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 1985;103:620-5.
17. ISCN. ISCN Guidelines for cancer cytogenetics. In: Mitelman F, ed. *Supplement to an International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel, Karger, 1985, 10-215.
18. Rigolin GM, Della Porta M, Bugli AM, Castagnani B, Mauro E, Zenone Bragetti L, Ciccone M, Cuneo A, Castoldi G. Flow cytometric detection of accelerated telomere shortening in myelodysplastic syndromes: correlations with aetiological and clinical-biological findings. *Eur J Haematol* 2004;73:351-8.
19. Bardin N, George F, Malin M, Brisson C, Horschowski N, Frances V, Lesaulle G, Sampaio J, S-Endo I, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen. *Tissue Antigens* 1996;48:531-9.
20. Ushal MF, Khan SS, Takahashi Y, Solomon MA, McCoy JP Jr. CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood. *Blood* 2005;106:2923-4.
21. Rigolin GM, Della Porta M, Ciccone M, et al. In patients with myelodysplastic syndromes response to rHuEPO and G-CSF treatment is related to an increase of cytogenetically normal CD34 cells. *Br J Haematol* 2004;126:501-7.
22. Padro T, Ruiz S, Bieker R, Burger H, Steins M, Kienast J, Buchner T, Berdel WE, Mesters RM. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000;95:2637-44.
23. Wierzbowska A, Robak T, Kracwczynski A, Wrzesniewski A, Fluta A, Cebula B, Smolewski P. Circulating endothelial cells in patients with acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2005;75:492-7.
24. Fang B, Zhong C, Liao L, Han Q, Sun Z, Jiang X, Zhao RC. Identification of human chronic myelogenous leukemia progenitor cells with hemangioblastic characteristics. *Blood* 2005;105:2733-40.
25. Gunsilius E, Dulon HC, Petzer AL, Kahler CM, Grunewald K, Stockhammer G, Gebl C, Demhofer S, Clausen J, Gassl G. Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet* 2000;355:1688-91.
26. Fidler IJ, Ellis LM. Neoplastic angiogenesis. Not all blood vessels are created equal. *N Engl J Med* 2004;351:215-6.
27. Korbting M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair: A new therapeutic concept? *N Engl J Med* 2003;349:570-82.
28. Rigolin GM, Della Porta M, Bigoni R, Teggi A, Cuneo A, Castoldi G. Dendritic cells in acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2001;114:830-3.

29. Friedl P. Cell fusion: new mechanisms of plasticity in cancer? *Lancet Oncol* 2005;6:916-8.
30. Bjerkvig R, Tynes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJ. Opinion: the origin of the cancer stem cell-current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer* 2005;5:899-904.
31. Pawlcek JM. Tumour-cell fusion as a source of myeloid traits in cancer. *Lancet Oncol* 2005;6:986-93.
32. Hida K, Klagsbrun M. A new perspective on tumor endothelial cells: unexpected chromosome and centrosome abnormalities. *Cancer Res* 2005;65:2507-10.

33. Panagoulaki I, Liso A, Martelli MP, et al. Minimal nucleophosmin detects clonal multilineage involvement in acute myeloid leukemia: impact on WHO classification. *Blood*, prepublished online August 22, 2006; DOI 10.1182/blood-2006-06-028716.
34. Ralli S, Lyden D, Benzena R, Hattori K, Heiwig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer* 2002;2:326-35.

CASE REPORT

Fabio Zustovich · Fedra Gottardo · Luca De Zorzi
Attilio Cecchetto · Massimo Dal Bianco · Endal Mauro
Giuseppe Carletti

**Cardiac metastasis from renal cell carcinoma without inferior vena
involvement: a review of the literature based on a case report.
Two different patterns of spread?**

Received: April 10, 2007 / Accepted: September 25, 2007

Abstract We report the case of a 59-year-old man with advanced renal cell carcinoma (RCC), without inferior vena cava (IVC) involvement, treated with radical nephrectomy, palliative radiotherapy for bone metastasis, and medical therapy for bone and lung metastases. The patient died of cardiac arrest after evidence of massive malignant pericardial effusion. At autopsy, massive myocardial and pericardial neoplastic invasion was found. Heart involvement via the IVC is a well-known phenomenon during RCC progression, while in the absence of IVC involvement, clinically evident cardiac involvement is exceptional, with few cases reported in the worldwide literature. Analysis of prior reports and of the present case provides evidence on how the cardiac metastasis may have two distinct origins and clinical features. The first is hematogenous, via the IVC, even in the absence of renal vein involvement; it is generally circumscribed and has a good prognosis after surgery. The second is through the intrathoracic lymphatic system, in the presence of disseminated disease, especially pulmonary metastasis, and this type has a very poor prognosis.

Key words Kidney · Cancer · Renal cell carcinoma · Heart · Cardiac metastasis

Introduction

Renal cell carcinoma (RCC) represents about 3% of all malignant tumors. About one-third of patients diagnosed with RCC develop metastasis, and the prognosis is poor,

with a median survival of 6–12 months and a 5-year survival rate inferior to 10%.¹ Common sites of RCC metastases are lung, liver, bone, and adrenal glands, as well as lymph nodes. Extension of RCC to the right atrium via the inferior vena cava (IVC) is a well-known phenomenon, occurring in 5%–15% of patients.² When the IVC is not involved, the clinical diagnosis of cardiac metastasis is an exceptional event, with only a few cases reported in the worldwide literature.

Case report

At the beginning of 2005, a 59-year-old man came to our attention for a right renal mass of 6 × 8 cm, with concomitant metastasis to lung and bone. Due to pain and a high risk of fracture, he had radiotherapy (30 Gy in ten fractions) on the first lumbar vertebra. Soon after, a radical right nephrectomy was performed. The histological diagnosis was clear cell adenocarcinoma grade 3 according to the Fuhrman classification, infiltrating the perirenal fat, with lymphovascular invasion and a homolateral adrenal metastasis; lymph nodes were free of disease (stage pT3aN0M1 G3). After the surgery the patient underwent treatment with intravenous fluorodeoxyuridine in continuous infusion at a dose of 0.125 mg/kg a day, and subcutaneous interleukin (IL) 2 at a dose of 3 MU for 5 days a week continuously. To prevent “bone events”, such as further pain and fractures, intravenous zoledronic acid, at a dose of 4 mg every 4 weeks, plus an oral supplement of calcium and vitamin D3 was administered. At the progression of lung metastasis, documented by a computed tomography (CT) scan after 3 months of treatment, the patient underwent second-line chemotherapy with intravenous gemcitabine, at a dose of 1000 mg/m² on days 1, 8, and 15 every 4 weeks, but no benefit was observed. Three months after this treatment was completed, oral thalidomide, as salvage therapy, at a daily dose of 100 mg, was administered, and the patient's performance status improved. A chest X-ray 3 months after the beginning of the thalidomide treatment showed a partial response of the lung metastasis. Two months after the chest

F. Zustovich (✉) · E. Mauro · G. Carletti
Oncologia Medica I, IOV-IRCCS, Via Gattamelata, 64, 35128
Padova, Italy
Tel. +39-34-7977-5504; Fax +39-049-621-5904
e-mail: fabio.zustovich@istitutoncologicoveneto.it

F. Gottardo · L. De Zorzi · M. Dal Bianco
Divisione di Urologia, ULSS 16, S. Antonio Hospital, Padova, Italy
A. Cecchetto
Dipartimento di Patologia, Università di Padova, Padova, Italy

X-ray, the patient complained of worsening dyspnea, asthenia, and inferior limb edema and showed peripheral cyanosis. A new chest X-ray confirmed the partial response of the lung metastasis, but showed a pleural effusion with signs of pericardial effusion, increased size of the heart shadow, and wine bottle-shaped margins of the heart (see Fig. 1). Echocardiography confirmed the pericardial effusion and the patient was hospitalized. Chest CT scan was omitted. Pericardial drainage yielded 800 cc of sero-hematic fluid, with rapid symptom relief. Cytology was positive for malignancy. A few days after admission, the patient had multiple cardiac arrests that were responsive to resuscitation, but the last one was fatal. Autopsy confirmed the presence of pulmonary and bone metastases, as well as the pericardial involvement (pathology report revealed renal adenocarcinoma, Fuhrman grade 3 as the primary tumor). The autopsy also revealed a thyroid metastasis, as well as showing massive myocardial tumoral invasion (see Figs. 2 and 3).

Discussion

In post-mortem series of patients who died of advanced cancers, the presence of cardiac involvement is frequent (10%), especially by melanoma (46%), germ cell tumors (38%), leukemia and lymphomas (33% and 17% respectively), lung cancers (17%), and esophageal cancers (13%). Cardiac metastasis was shown to be present in 11% of patients who died of RCC.³ Nevertheless, in vivo clinical evidence of cardiac involvement in RCC without IVC involvement is exceptional. Table 1 summarizes 14 previous reports in the literature⁴⁻¹⁷ of cardiac metastasis from RCC without IVC involvement.

In the 15 reported patients with cardiac metastasis from RCC without IVC involvement (including the present patient), isolated metastasis to the heart and metastases to multiple sites together with heart involvement showed the same frequency (7 and 8 cases, respectively).

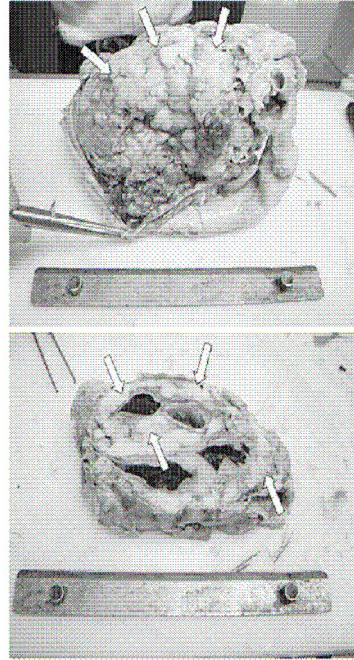


Fig. 2. Macroscopic view of the heart after autopsy. The arrows show the massive myocardial infiltration and pericardial involvement

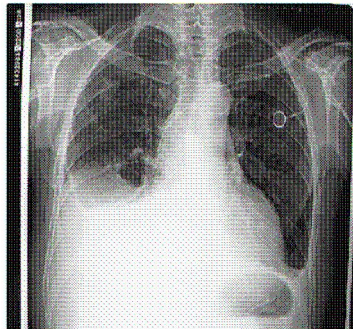


Fig. 1. Chest X-ray of the patient on admission to the hospital

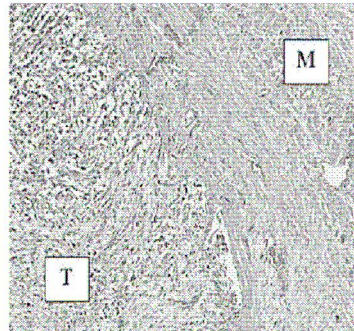


Fig. 3. Microscopic view of myocardial invasion by the tumor (T) with normal myocardial fibers (M) (H&E, x10)

Table 1. Previous reports of cardiac metastasis from RCC without IVC involvement

Author	Year	Site of relapse	Type of heart involvement	Symptoms	Pericardial involvement	Pulmonary involvement
Gooder ¹	1973	Single	Right	Obstruction	-	-
Caroli ²	1994	Single	Right	Obstruction	-	-
Bradley and Bolling ³	1995	Single	Left	None	-	Yes (prior)
Marak ⁴	1995	Single	Right	Obstruction	-	-
Sanu-Thomas ⁵	1998	Single	Right	Obstruction	-	-
Rogas ⁶	2002	Multiple	Left	Arrhythmia	Yes	Yes
Chang ⁷	2003	Multiple	Right	Obstruction	-	-
Safi ⁸	2005	Multiple	Left	Heart failure	Yes	Yes
Marak ⁴²	2004	Single	Right	Obstruction	-	-
Rokoni ⁹	2005	Multiple	Right	None	Yes	Yes
Steven ¹⁰	2005	Multiple	Right	Heart failure	Yes	Yes
Alghamdi ¹¹	2006	Multiple	Right	Obstruction	-	-
Atik ¹⁶	2006	Single	Right	Obstruction	-	-
Deerjen ¹⁷	2006	Multiple	Right	None	Yes	Yes
Present case	2007	Multiple	Left	Heart failure	Yes	Yes

The right heart was more frequently involved (11 cases out of 15) especially when the progression of the RCC was cardiac only (6 out of 7 cases). The clinical presentation was often a right polypoid endocardial mass with obstructive signs.

The left heart was generally involved when there was a multiorgan disease progression (4 cases out of 5) and, in particular, the left heart was always associated with lung and pericardial involvement, which was generally synchronous, but in the case described by Bradley and Bolling³ the single left cardiac progression occurred in the patient after a prior lung metastasectomy. The clinical pattern was usually characterized by a worsening performance status, with cardiac symptoms (tamponade, arrhythmia, and, less frequently, obstruction) representing one of the terminal events.

The two well-defined pathological and clinical entities above mentioned led us to suggest two different patterns of RCC diffusion to the heart.

The first is a venous hematogenous pathway through the renal vein to the right heart and, in patients with isolated disease and delayed disease progression to the right heart in the absence of IVC involvement, this remains the most probable mode of diffusion, by micro-dissemination.

The second pattern is through the lymphatic vessels of the thorax involving the costal lymph nodes, which collect the drainage from the posterior wall of the heart. Drainage from the anterior and inferior walls goes through the parasternal and the diaphragmatic lymph vessels. This hypothesis of the second pattern of RCC diffusion to the heart is supported by the fact that disseminated disease progression generally involves the supradiaphragmatic lymph nodes, the lung, and the pericardium, and the involved heart side is more frequently the left.

In fact, cardiac involvement by primary lung cancer has a similar pattern to that of cardiac involvement by RCC, with a predominance of pleural followed by myocardial involvement. Endocardial involvement is rare (5 cases out of 51) and esophageal cancers behave similarly.¹⁸ In post-mortem series of RCC, the probabilities of pericardial, myocardial, and endocardial involvement were reported to

be the same.^{19,20} These observations support the coexistence of two patterns, one hematogenous and one lymphatic, of RCC dissemination to the heart.

In conclusion, advanced RCC without macroscopic IVC involvement may reach the heart via microscopic hematogenous dissemination from the IVC or via pulmonary metastatic disease which, through lymphatic pulmonary drainage, reaches the costal nodes and then, through reversed lymphatic flow caused by node metastasis, reaches the pericardium and the left myocardium.

Patients with late isolated right cardiac relapse of RCC generally have obstructive symptoms and can be treated with cardiac surgery with a high rate of success, although there are patients who present with cardiac involvement as a terminal complication of advanced disease.

References

- Moster RE, Mazur EM, Bark T, et al. (1989) Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 7:2530-2540
- Paganò F, Del Bianco M, Antebi W, et al. (1992) Renal cell carcinoma with extensive into the inferior vena cava: problems in diagnosis, staging and treatment. *Eur Urol* 22:200-205
- Robert CW (1997) Primary and secondary resections of the heart. *Am J Cardiol* 80:673-682
- Gooder R, Kimbrell E, Seal B (1973) Obstruction of the right ventricular outflow tract due to metastatic hypernephroma. *Vasc Surg* 7:213-219
- Carroll JC, Quin CC, Weirald J, et al. (1994) Metastatic renal cell carcinoma to the right cardiac ventricle without contiguous venous involvement. *J Urol* 151:133-134
- Bradley SM, Bolling SB (1995) Late renal cell carcinoma metastasis to the left ventricular outflow tract. *Ann Thorac Surg* 60:284-286
- Nialele C, Ulrich L, Hehr H, et al. (1995) A rare form of heart metastasis: hypernephroma. Successful surgical treatment. *Z Kardiol* 84:643-647
- Sanu-Thomas M, Mohr NC, Robinson MJ, et al. (1998) Metastatic renal cell carcinoma involving ventricular myocardium without venous involvement. *J Cardiovasc Surg* 39:81-82
- Rogas J, Schroeder J, Radoloff B, et al. (2002) Renal cell cancer with symptomatic heart metastasis. *BJU Int* 90:622-623
- Chang A (2003) Cardiac metastasis from a renal cell carcinoma. *Int J Clin Pract* 57:437-438
- Safi AM, Rachko M, Sodeghinia S, et al. (2005) Left ventricular intracavitary mass and pericarditis secondary to metastatic renal cell carcinoma—a case report. *Angiology* 54:495-498
- Masaki M, Kuroda T, Hosen N, et al. (2004) Solitary right ventricular metastasis from renal cell carcinoma. *J Am Soc Echocardiogr* 17:397-398
- Rokoni M, Roumimo S, Saha S (2005) Renal Adenocarcinoma with intramyocardial and right atrial metastasis, latter via coronary sinus: report of a case. *Echocardiography* 22:345-348
- Steven D, Stork A, Muellerleile K, et al. (2005) Late occurrence of renal cell carcinoma metastasis in the right heart detected by cardiac magnetic resonance imaging. *Z Kardiol* 94:555-556
- Alghamdi A, Tam J (2006) Cardiac metastasis from a renal cell carcinoma. *Can J Cardiol* 22:1231-1232
- Atik FA, Navis JL, Krishnamurthi V, et al. (2006) Solitary massive right ventricular metastasis of renal cell carcinoma without inferior vena cava or right atrium involvement. *J Card Surg* 21:304-308
- Deerjen A, Conrad G, Mollmann S, et al. (2006) Cardiac metastasis of a renal cell carcinoma investigated by cardiac magnetic resonance imaging. *Clin Res Cardiol* 95:402-405
- Lam KY, Dickens P, Chak Lam Chan A (1993) Tumors of the heart, a 20-year experience with a review of 12 485 consecutive autopsies. *Arch Pathol Lab Med* 117:1027-1031
- Klatt E, Heitz D (1990) Cardiac metastases. *Cancer* 65:1456-1459

TABELLE

Angiogenic factors

Vascular endothelial growth factor (VEGF)
Acidic and basic fibroblasts growth factors (FGF)
Placenta growth factor
Platelet-derived epidermal growth factor
Platelet-derived growth factor (PDGF)
Transforming growth factor (TGF- α and - β)
Epidermal growth factor (EGF)
Hepatocyte growth factor (HGF)
Platelet-activating factor
Tumor necrosis factor- α
Insulin-like growth factor (IGF)
Angiogenin
Angiopoitin-1
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)
Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)
Interleukin-2
Interleukin-6
Interleukin-8
Prostaglandins E1, E2
Vascular integrin $\alpha v \beta 3$ (vitaxin)
Matrix metalloproteinases (MMP)

Antiangiogenic factors

Thrombospondin
Fibronectin
Angiostatin
Endostatin
Interferon- α, β, γ
Interleukin-1
Interleukin-12
Angiopoetin-2
Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)
Platelet factor 4
Retinoic acid

Tabella 1. Fattori pro e anti angiogenici coinvolti nell'equilibrio dell'angiogenesi (Dong X et al. 2007).

Drug	Sponsor	Trial	Mechanism
<i>(A) Drugs that block activators of angiogenesis</i>			
Bevacizumab	Genentech	Phase II, relapsed aggressive NHL Phase II, poor-risk hematologic malignancies (combined with cytarabine and mitoxantrone)	Binding and inactivation of VEGF
SU6668	Sugen; South San Francisco, CA	Phase I/II multiple myeloma	Blocks VEGF, FGF, and PDGF receptor signaling
Interferon-alpha	Commercially available	Phase II/III multiple myeloma	Inhibition of bFGF and VEGF production
Neovastat	Aeterna; Québec, Canada	Phase II, early relapse or refractory multiple myeloma	Naturally occurring MMP inhibitor
<i>(C1) Drugs that inhibit endothelial cells directly</i>			
Thalidomide	Commercially available, approved for leprosy; Celgene and Lafal; France	Phase II, relapsed or refractory low grade follicular NHL (combined with IFN-alpha) Phase II, relapsed CLL Phase II, relapsed or refractory low grade NHL Phase II Phase II, Mycosis fungoides, stage IB to IVB (combined with IFN-alpha) Phase I/II/III, advanced melanoma, multiple myeloma. Phase II, AML Phase II, MDS Phase II, myelofibrosis with myeloid metaplasia	Unknown
Small molecule inhibitor of $\alpha v\beta 3$ integrin	Monsanto	Multiple myeloma	Small molecule blocker of alpha-v integrins present on endothelial cell surface

Tabella 2 : elenco degli inibitori dell'angiogenesi utilizzati nelle malattie ematologiche maligne (Moehler *TM et al.* 2003).

Patient no.	Age, y/sex	Diagnosis	Stage	M comp, g/L	β -2M, mg/L	CRP, mg/L	CD133+ CECs/total CECs (%)	CECs with 13q14 del/total CECs (%)	CD133+ CECs with 13q14 del/CECs with 13q14 del (%)
1	63/M	MM IgG/k	IA	12.0	4.4	9.6	183/200 (91.5)	22/200 (11)	18/18 (100)
2	68/F	MM IgA/k	IIIA	13.9	5.0	25.9	168/200 (84)	32/200 (16)	32/32 (100)
3	70/M	MM IgG/ λ	IA	28.0	2.7	0.4	185/200 (92.5)	26/200 (13)	20/22 (90.9)
4	62/F	MM IgG/k	IIIA	12.1	3.1	0.9	158/200 (79)	36/200 (18)	36/36 (100)
5	44/M	MM IgG/ λ	IIIA	30.1	2.5	8.9	168/200 (84)	64/200 (32)	62/64 (96.9)
6	49/F	MGUS IgG/k	NA	12.8	1.5	0.3	16/200 (8)	6/200 (3)	NA
7	47/F	MGUS IgG/k	NA	11.8	1.4	1.9	18/170 (10.6)	7/170 (4.1)	NA
8	61/F	MGUS IgA/k	NA	5.7	2.1	1.5	21/155 (13.5)	6/155 (3.9)	NA

Tabella 3 principali caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti con MM e MGUS.

Case no	Name	Age/sex	Diagnosis FAB	Cytogenetics [n° of cells/total analysed]	FISH %	WBC 10 ⁹ /L	HB g/dL	Plt 10 ⁹ /L	CEC %	CEC µl	CEC ratio
1	FG	55/M	M3	t(15;17)(q22;q21) [18/21]	90	5.9	9.4	14	0.11	6.5	3.5
2	BC	84/F	M3	t(15;17)(q22;q21) [19/20]	95	17.9	9.1	9	0.06	10.7	1.9
3	BG	78/M	M1	t(9;22)(q34;q11) [20/20]	100	53.0	13.5	350	0.14	74.2	2.6
4	FS	76/F	M5	monosomy 7 [19/20]	53	4.5	8.3	30	0.17	7.7	1.8
5	PE	70/F	M1	trisomy 8 [20/20]	82	10.4	9.0	214	0.12	12.5	1.7
6	FE	74/M	M4	trisomy 11 [18/28]	68	19.1	9.6	23	0.04	7.6	1.0
7	ML	70/F	M4	trisomy 8 [15/20]	62	81.5	11.3	41	0.04	32.6	2.5

Tabella 4. Principali caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti con LAM.

Età media	65.4
Rapporto M/F	45/29
Stadio di malattia 0-II/III-IV	54/20
% di positivi/negativi al CD38	55/45
% di prognosi favorevole/intermedia/sfavorevole dopo FISH	52/35/13
Risposta CR-PR / SD-PD	35/15
CR= Remissione parziale; PR= Remissione Parziale; SD= malattia stabile; PD= malattia in progressione	

Tabella 5. Principali caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti con LLC.

Patient no.	UEA-1+ CECs/total CECs (%)	VEGFR-2+ VWF+ CECs/total CECs (%)	CD144+ VWF+ CECs/total CECs (%)	VWF+ CD138+ CECs/total CECs (%)	VWF+ CD38+ CECs/total CECs (%)	CD45+ cells/total CECs (%) [CD45+ CD14-/CD45+ CD14+]
1	195/200 (97.5)	198/200 (99.0)	197/200 (98.5)	1/200 (0.5)	1/200 (0.5)	0/200 (0.0) [0/0]
2	193/200 (96.5)	196/200 (98.0)	195/200 (97.5)	0/200 (0.0)	ND	2/200 (1.0) [2/0]
3	195/200 (97.5)	197/200 (98.5)	199/200 (99.5)	0/200 (0.0)	ND	1/200 (0.5) [1/0]
4	197/200 (98.5)	200/200 (100)	200/200 (100)	0/200 (0.0)	1/200 (0.5)	0/200 (0.0) [0/0]
5	194/200 (97.0)	196/200 (98.0)	197/200 (98.5)	1/200 (0.5)	0/200 (0.0)	1/200 (0.5) [0/1]
6	194/200 (97.0)	195/200 (97.5)	ND	0/170 (0.0)	ND	0/180 (0.0) [0/0]
7	154/160 (96.25)	ND	172/180 (95.5)	0/158 (0.0)	ND	1/140 (0.7) [1/0]
8	152/158 (96.2)	144/150 (96.0)	ND	ND	0/145 (0.0)	ND

Tabella 6. Caratterizzazione immunofenotipica delle CEC nei MM e MGUS con delezione del 13q14.

Case no	UEA-1+ CECs / total CECs (%)	VEGFR-2+ vWf+ CECs / total CECs (%)	CD144+ vWf+ CECs / total CECs (%)	vWf+ CD33+ CECs / total CECs (%)	vWf+ CD13+ CECs / total CECs (%)	CD45+ cells / total CECs (%) [CD45+ CD14-/ CD45+ CD14+]
1	195 / 200 (97.5 %)	198 / 200 (99.0 %)	198 / 200 (99.0 %)	0 / 200 (0.5 %)	1 / 200 (0.5 %)	1 / 200 (0.5%) [0/1]
2	196 / 200 (98.0 %)	200 / 200 (100 %)	200 / 200 (100.0 %)	0 / 200 (0.0 %)	ND	1 / 200 (0.5%) [1/0]
3	197 / 200 (98.5 %)	197 / 200 (98.5 %)	198 / 200 (99.0 %)	0 / 200 (0.0 %)	ND	0 / 200 (0.0%) [0/0]
4	195 / 200 (97.5 %)	198 / 200 (99.0 %)	ND	1 / 200 (0.5%)	0 / 200 (0.0 %)	ND
5	194 / 200 (97.0 %)	197 / 200 (98.5 %)	ND	0 / 200 (0.0 %)	0 / 200 (0.0 %)	1 / 200 (0.5%) [0/1]
6	195 / 200 (97.5%)	197 / 200 (98.5%)	196 / 200 (98.0%)	ND	1 / 200 (0.5 %)	ND
7	ND	198 / 200 (99.0 %)	ND	0 / 200 (0.0%)	0 / 200 (0.0%)	0 / 200 (0.0%) [0/0]

Tabella 7. caratteristiche immunofenotipiche delle CEC nei casi di LAM.

Case no	CD133+ CECs / total CECs (%)	CECs with abnormal cytogenetics / total CECs (%)	CD133+ CECs with abnormal cytogenetics / CECs with cytogen abnorm (%)
1	164/200 (82.0%)	81/200 (40.5%)	80/81 (98.8%)
2	150/200 (75.0%)	40/200 (20%)	40/40 (100%)
3	150/200 (75.0%)	156/200 (78%)	147/156 (94.2%)
4	152/200 (76.0%)	70/200 (35%)	70/70 (100%)
5	143/200 (71.5%)	65/200 (32.5%)	65/65 (100%)
6	138/200 (69%)	90/200 (45%)	88/90 (97.8%)
7	145/200 (72.5%)	88/200 (44%)	87/88 (98.9%)

Tabella 8. caratteristiche combinate di FISH e immunofenotipo delle CECs nei pazienti affetti da LAM.

Caso n°.	Anomalia citogenetica diagnostica	CD133+ CECs/ CECs totali (%)	CECs FISH pos./ CECs totali (%)	CD133+ CECs FISH pos./ CECs FISH pos. (%)
1	Trisomia 12	135/200 (67,5)	34/200 (29)	33/34 (97,06)
2	Trisomia 12	140/200 (70)	30/200 (27)	30/30 (100)
3	Trisomia 12	132/200 (66)	118/200 (49)	116/118 (98,31)
4	Delezione 13q	159/200 (79,5)	28/200 (20)	28/28 (100)
5	Delezione 13q	154/200 (77)	160/200 (78)	155/160 (96,88)
6	Delezione 13q	157/200 (78,5)	110/200 (46)	108/110 (98,18)
7	Delezione 11q	154/200 (77)	90/200 (36)	89/90 (98,89)

Tabella 9. Correlazione tra caratterizzazione immunofenotipica ed analisi FISH nei pazienti con LLC.

FIGURE

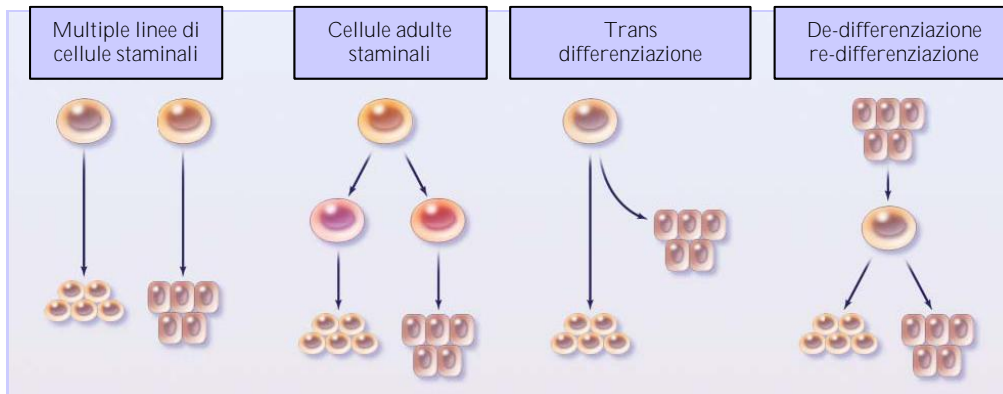


Figura 1. vari modelli per la generazione di cellule tessuto specifiche degli organi attraverso la differenziazione delle cellule staminali dell'adulto circolanti. Nel primo modello a partire da sinistra, distinte cellule staminali si differenziano , ognuna appartenente al proprio organo di origine. Nel secondo modello le cellule somatiche staminali primitive sono presenti nel tessuto emopoietico e si differenziano in varie cellule organo specifiche. Nel terzo modello, le cellule staminali come le cellule emopoietiche, si differenziano dalla loro linea predefinita un fenomeno conosciuto come transdifferenziazione. Nell'ultimo modello le cellule mature si differenziano in cellule con caratteristiche simil staminali e si re-differenziano in cellule mature del loro tessuto di origine o di altri tessuti diversi (Korbling M et al. 2003).

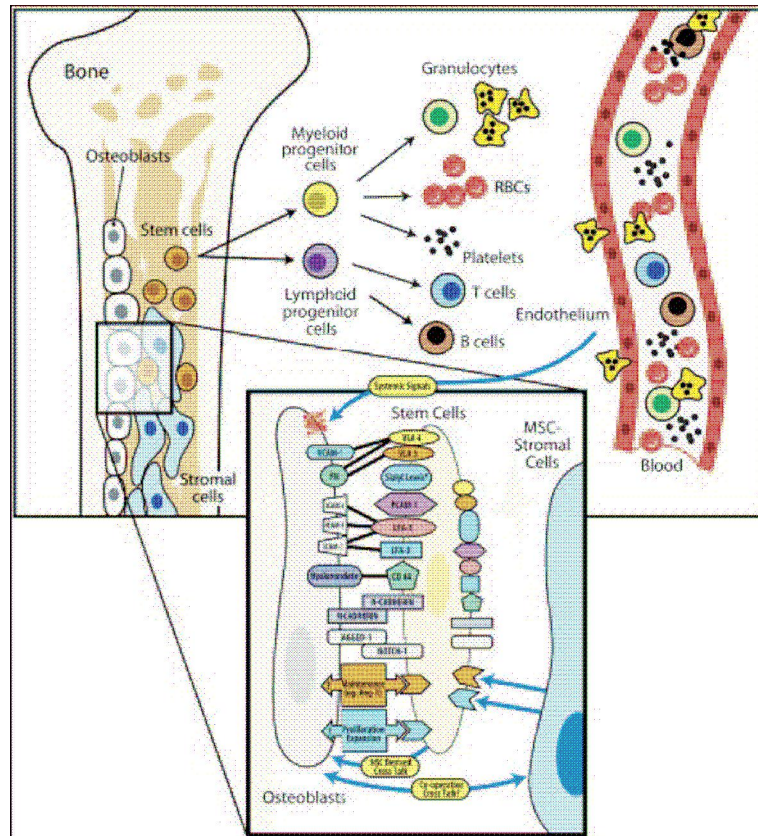


Figura 2. modello di supporto della cellula ematopoietica staminale con l'osteoblasto. La nicchia della cellula

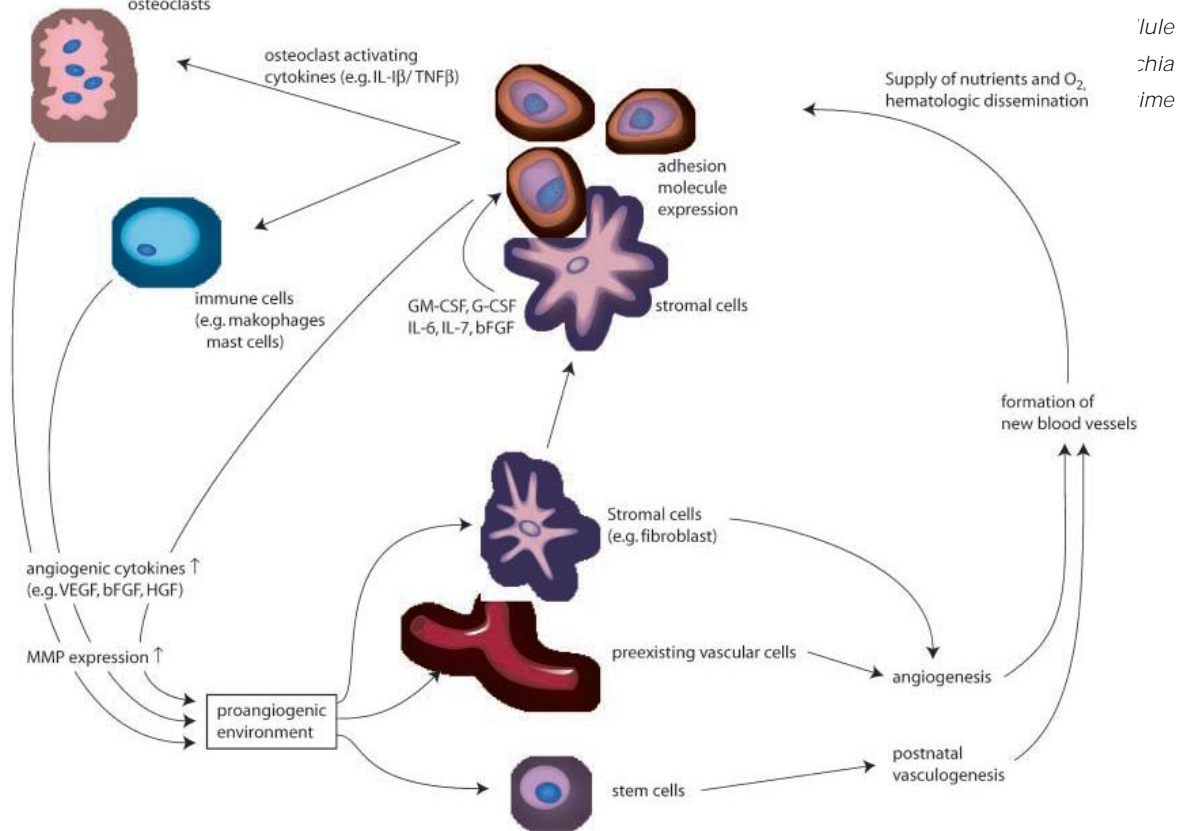


Figura 3. Rappresentazione simultanea dei più importanti circuiti per il processo angiogenetico nelle neoplasie (Moehler TM et al. 2001).

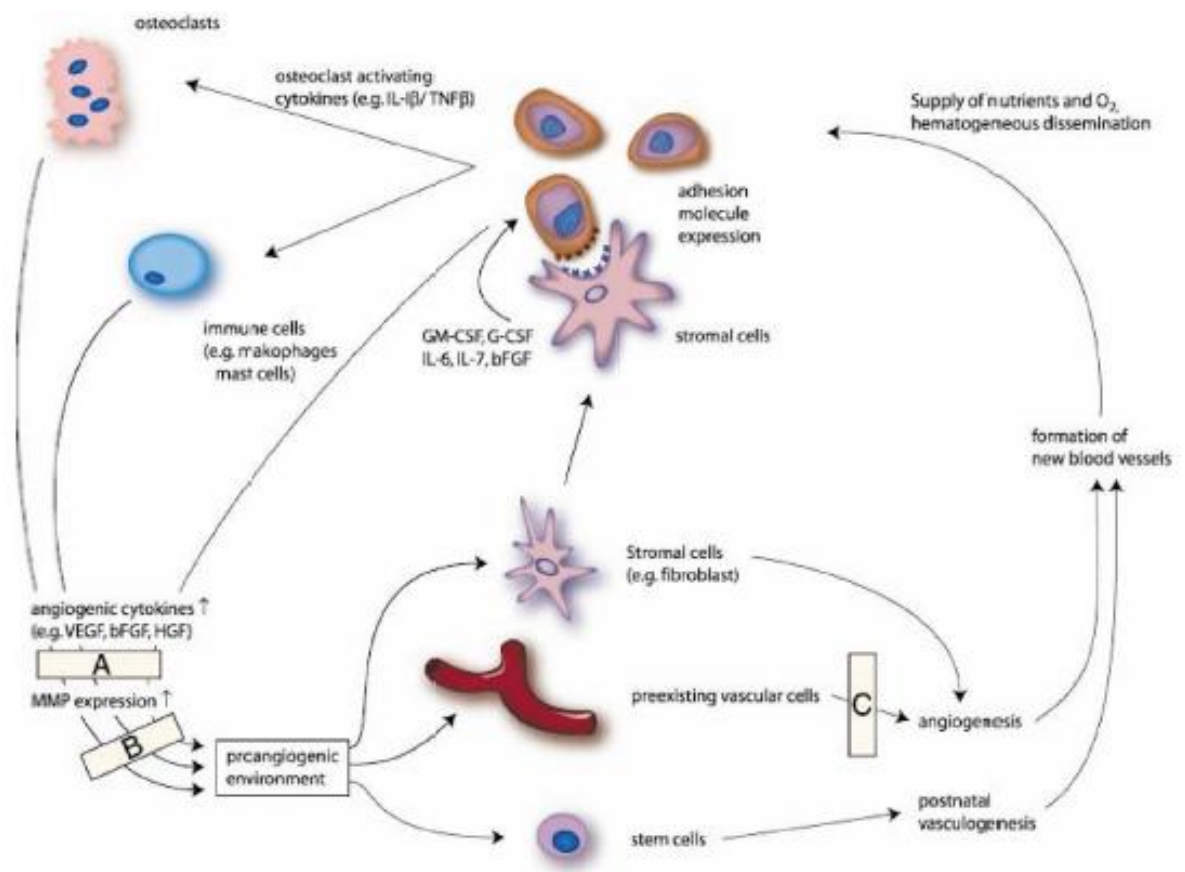
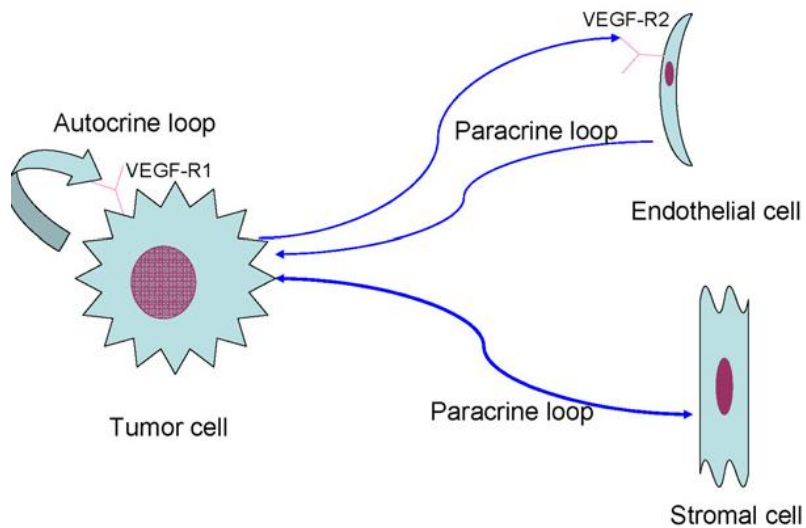


Figura 5. Rappresentazione simultanea dei più importanti circuiti per il processo angiogenetico nelle neoplasie, le barre con le lettere rappresentano i punti di attacco dei nuovi farmaci antiangiogenetici in fase di studio (Moehler TM et al. 2003).

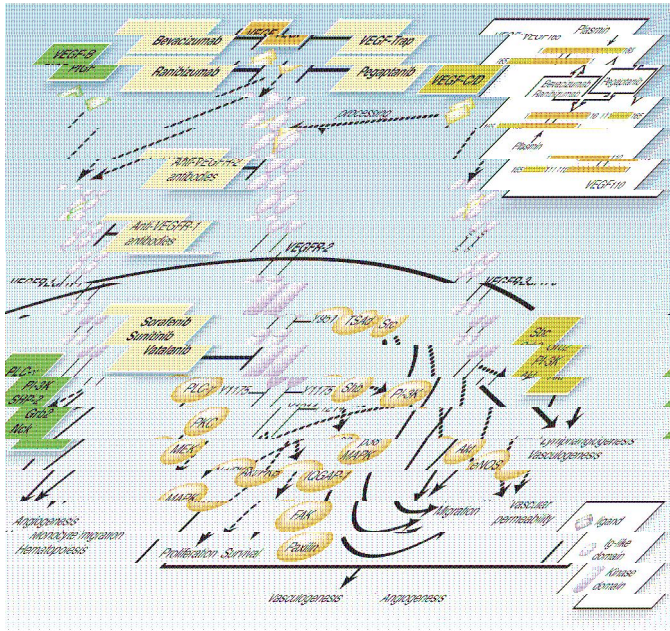


Figura 6. Segnali di trasduzione e dei processi molecolari sottesi dal VEGFR2 (Koyanetz M et al 2006)

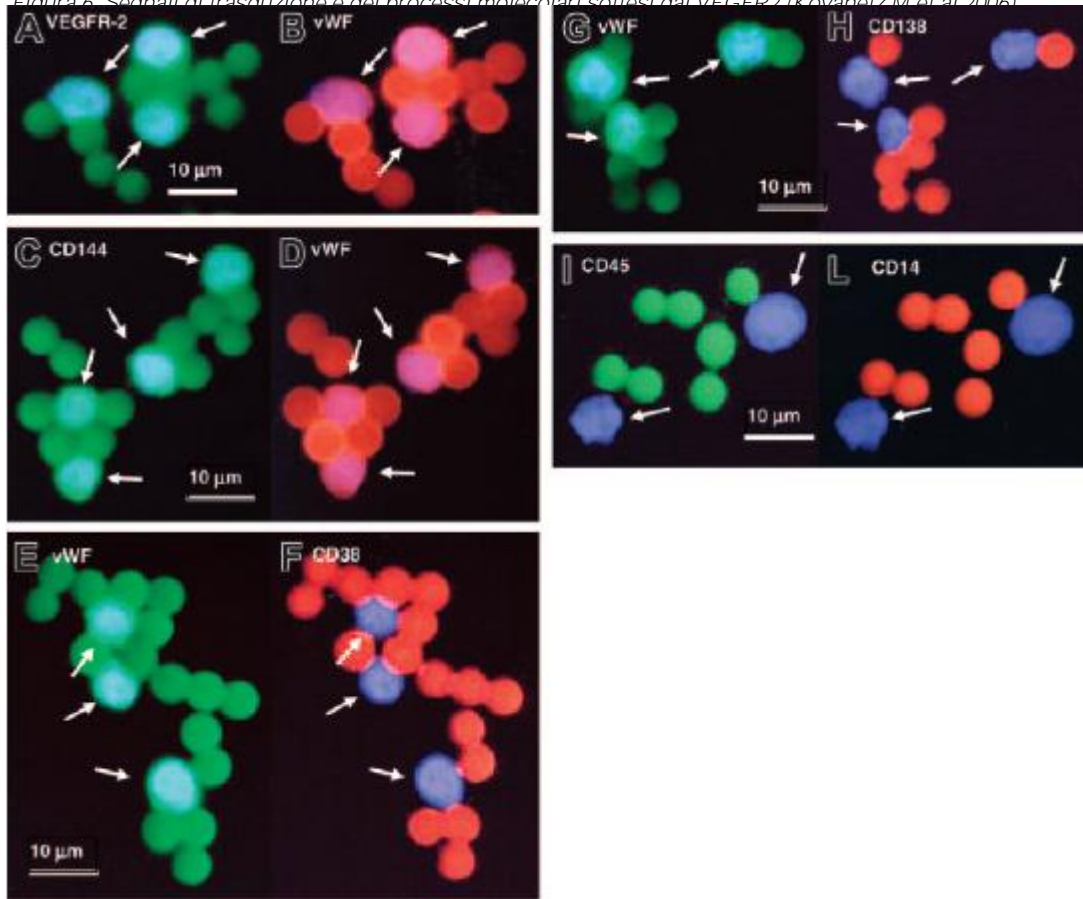


Figura 7. Caratterizzazione immunofenotipica delle CEC isolate con metodica immunomagnetica nei pazienti affetti da MM con delezione del 13q14. Le CEC coesprimono il VEGFR2 (verde A) associato al vWF (rosso B), il CD 144 (verde C) associato al vWF (rosso D), non vi è coespressione per vWF(rosso E-G) con i marcatori CD38 (rosso F) e CD138 (rosso H) tipici del MM, negativi pure il CD45 ed il CD 14 tipici della filiera leucocitaria (I-L), il nucleo delle cellule è stato marcato con DAPI II.

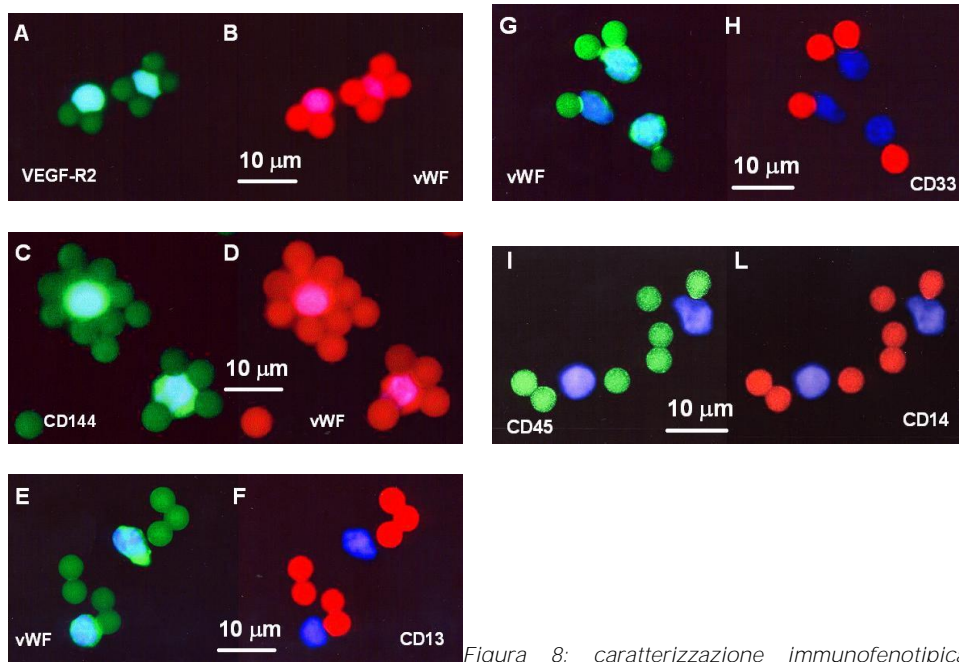


Figura 8: caratterizzazione immunofenotipica delle CEC isolate mediante metodica immunomagnetica nei pazienti affetti da LAM. Le CEC coesprimevano il VEGFR2 (verde A) associato al vWF (rosso B), il CD 144 (verde C) associato al vWF (rosso D), non vi era invece coespressione per vWF(rosso E-G) con i marcatori CD13 (rosso H) e CD33 (rosso G) tipici delle LAM, negativi pure il CD45 ed il CD 14 tipici della filiera leucocitaria (I-L). Il nucleo delle cellule è stato marcato con DAPI II.

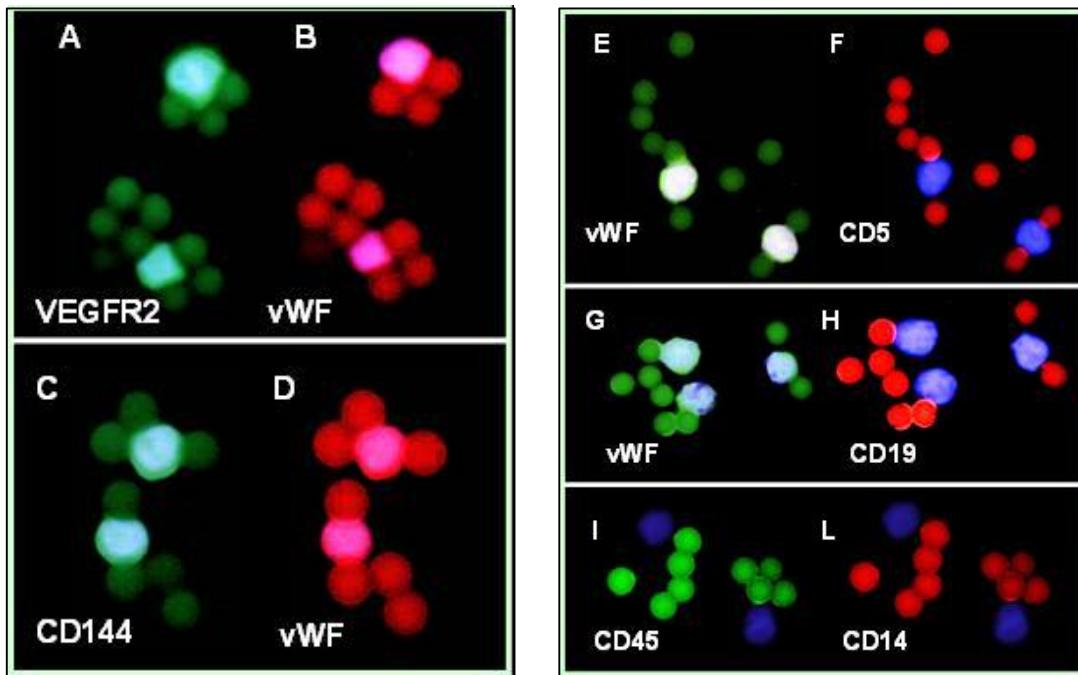


Figura 9: caratterizzazione immunofenotipica delle CEC isolate mediante metodica immunomagnetica nei pazienti affetti da LLC. Le CEC coesprimevano il VEGFR2 (verde A) associato al vWF (rosso B), il CD 144 (verde C) associato al vWF (rosso D), non vi era invece coespressione per vWF(verde E-G) con i marcatori CD5 (rosso F) e CD19 (rosso H) tipici delle LLC, negativi pure il CD45 ed il CD 14 tipici della filiera leucocitaria (I-L). Il nucleo delle cellule è stato marcato con DAPI II.

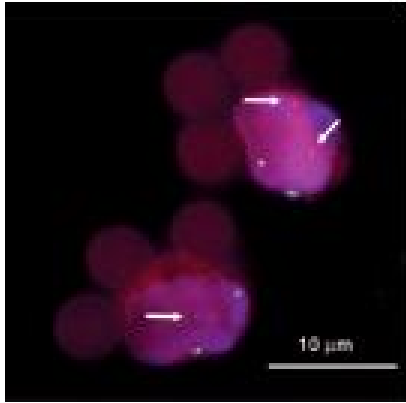


Figura 10. analisi FISH delle CECs in pazienti con MM isolate con metodica immunomagnetica a sinistra è presente una CEC con la delezione 13q14 (1 solo segnale rosso) con 2 normali segnali per il cromosoma 10 (verde). Nei pazienti con MM molti CEC hanno la caratteristica immunofenotipica delle EPC poiché esprimono il CD133.

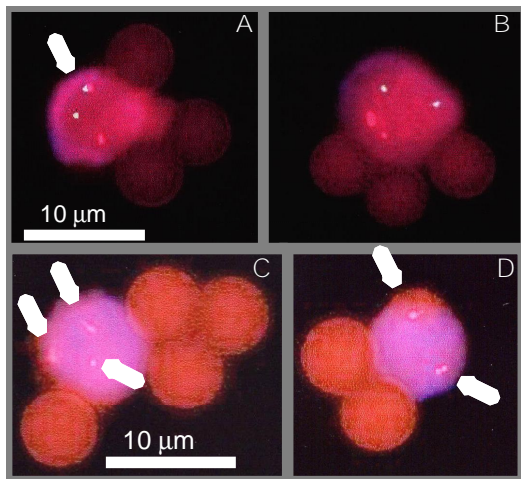


Figura 11. Analisi Fish di alcune CEC isolate con metodica immunomagnetica in pazienti affetti da LAM. (A) una CEC con riarrangiamento PML/RARA (una con segnale rosso, un segnale verde, uno rosso e uno giallo frutto della fusione di un rosso e di un verde come indicato nella figura, (B) una CEC citogeneticamente normale con due segnali rossi e due verdi, (C) una CEC con trisomia del cromosoma 8 (tre segnali) e (D) una CEC con 2 segnali rosso per lo stesso cromosoma.

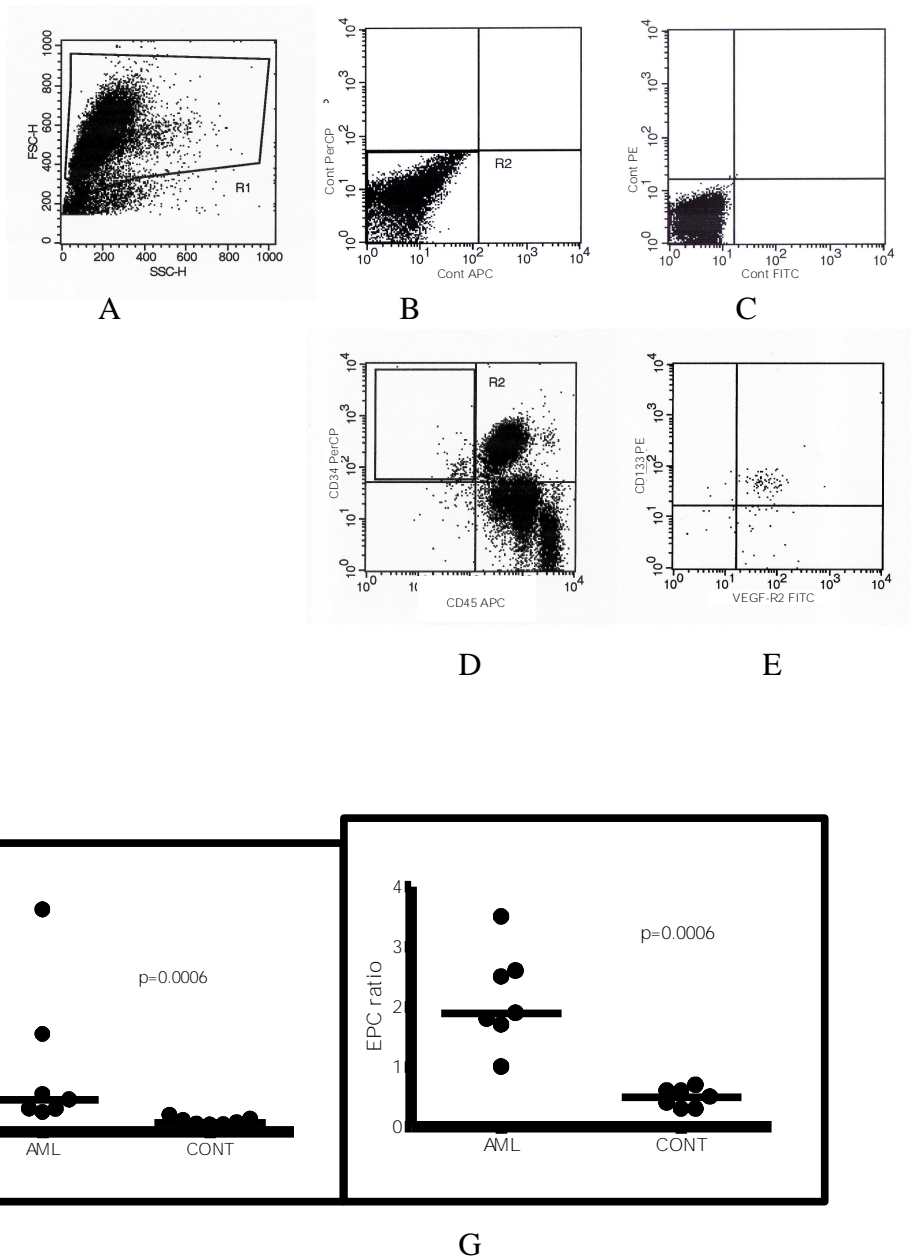


Figura 11. Valutazione citofluorimetrica a 4 colori delle EPC . Dopo opportuna formazione del gate per escludere piastrine e detriti cellulari (a), le EPC erano identificate come CD45- e CD34+ (d), ed esprimenti il CD133 ed il VEGFR2 (e). I pannelli b e c mostrano i corrispondenti controlli negativi. Basato sull'espressione CD133, veniva calcolato il rapporto tra le CEC immature (CD133+) e le CEC mature (CD 133-). In f e g vengono comparati i livelli di CEC ed il rapporto EPC tra i pazienti con LAM e i casi controllo.

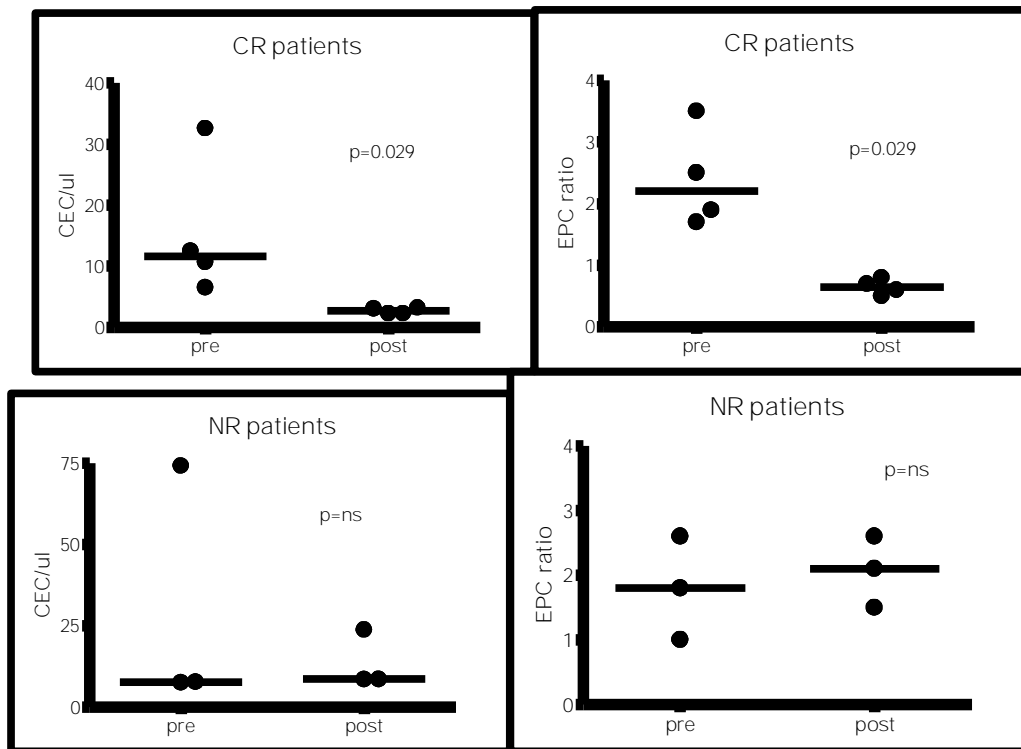


Figura 12. livelli di EPC e loro rapporto (EPC ratio), nei momenti pre e post induzione chemioterapia in pazienti che raggiungono una remissione completa (RC) e nei pazienti non responder (NR) al trattamento.

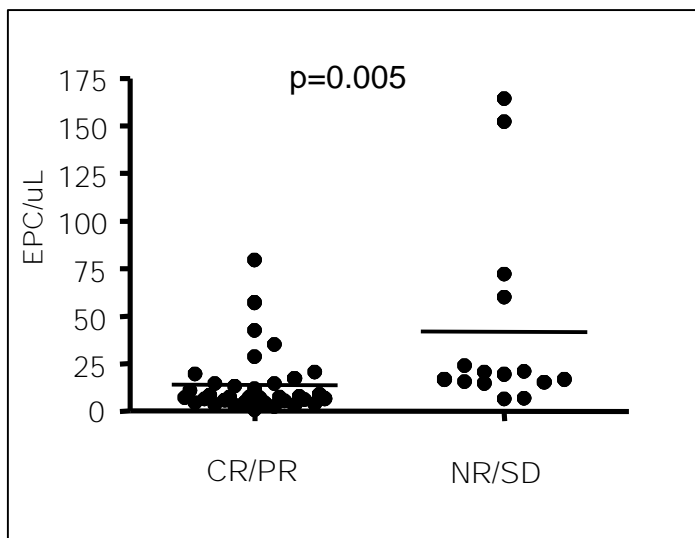


Figura 13. comparazione dei livelli di EPC in pazienti affetti da LLC che hanno risposto al trattamento (CR/PR) rispetto ai pazienti con LLC refrattari al trattamento specifico (NR/SD).

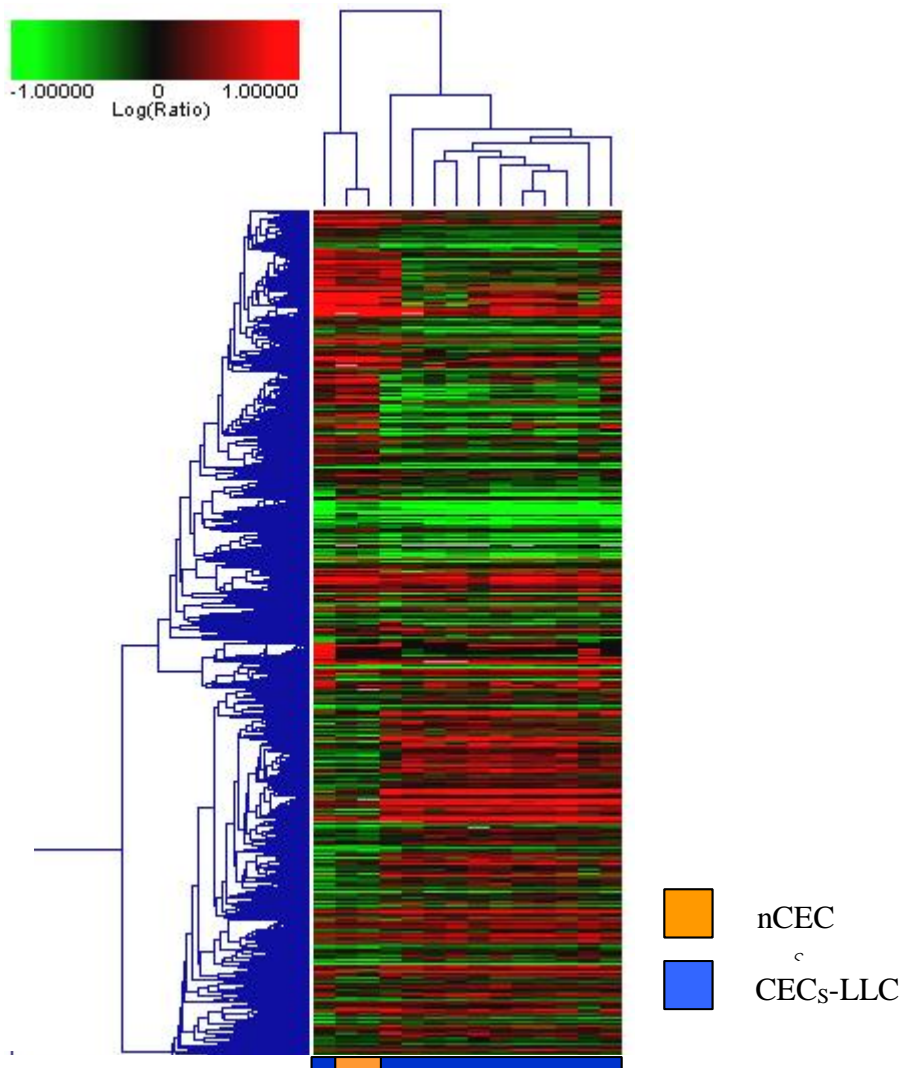


Figura 13. Rappresentazione dei microarrays che evidenziano i diversi profili d'espressione genica delle cellule endoteliali circolanti di LLC e di quelle derivanti dai controlli sani

BIBLIOGRAFIA

- *Aguayo A, Estey E, Kantarjian H, Mansouri T, Gidel C, Keating M, Giles F, Estrov Z, Barlogie B, Albitar M.* Cellular vascular endothelial growth factor is a predictor of outcome in patients with acute myeloid leukemia *Blood.* 1999; 94: 3717-3721
- *Aguayo A, Kantarjian H, Manshoury T, Gidel C, Estey E, Thomas D, Koller C, Estrov Z, O'Brien S, Keating M, Freireich E, Albitar M.* Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000; 96: 2240-2245.
- *Aguayo A, O'Brien S, Keating M, Manshoury T, Gidel C, Barlogie B, Beran M, Koller C, Kantarjian H, Albitar M.* Clinical relevance of intracellular vascular endothelial growth factor levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2000; 96: 768-770.
- *Aiuti A, Taviani M, Cipponi A, Ficara F, Zappone E, Hoxie J, Peault B, Bordignon C.* Expression of CXCR4, the receptor for stromal cell-derived factor-1 on fetal and adult human lympho-hematopoietic progenitors. *Eur J Immunol.* 1999;29:1823-31.
- *Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magne M, Isner JM.* Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for post natal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ. Res.* 1999; 85: 221-228.
- *Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Sciences* 1997; 275: 964-967.
- *Bailey AS, Jiang S, Afentoulis M, Baumann CI, Schroeder DA, Olson SB, Wong MH, Fleming WH.* Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood.* 2004; 103: 13-19.
- *Bairey O, Boycov O, Kaganovsky E, Zimra Y, Shaklai M, Rabizadeh E.* All three receptors for vascular endothelial growth factor (VEGF) are expressed on B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leuk Res.* 2004; 28(3):243-248.
- *Barillé S, Bataille R, Rapp MJ, Harousseau JL, Amiot M.* Production of metalloproteinase-7 (matrilysin) by human myeloma cells and its potential involvement in metalloproteinase-2 activation. *J Immunol.* 1999; 163: 5723-5728.
- *Bardin N, George F, Mutin M, Brisson C, Horschowski N, Frances V, Lesaule G, Sampol J.* S-Endo 1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen. *Tissue Antigens* 1996; 48: 531-539.
- *Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, Grogan TM.* Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res.* 1999; 59: 728-733. *Blood.* 2004;104: 788-794.

- *Beerepoort LV, Mehra N, Vermaat JS, Zonnenberg BA, Gebbink MF, Voest EE.* Increased levels of viable circulating endothelial cells are an indicator of progressive disease in cancer patients. *Ann Oncol* 15, 139-45 (2004).
- *Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJ.* Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 899-904.
- *Brookes JP.* Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure. *Science*.1997; 276: 81-7.
- *Bruno B, Rotta M, Giaccone L, Massaia M, Bertola A, Palumbo A, Boccadoro M.* New drugs for treatment of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2004 Jul;5(7):430-42.
- *Carmeliet P, Jain RK.* Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000; 407: 249-257.
- *Carmeliet P.* Mechanisms of angiogenesis and atherogenesis. *Nat Med.* 2000; 6: 389-395.
- *Carmeliet, P. & Luttun, A.* The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis. *Thromb Haemost* 86, 289-97 (2001).
- *Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL.* Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci.*2000 ; 14608-14613.
- *Chen H, Treweek AT, West DC, Till KJ, Cawley JC, Zuzel M, Toh CH.* In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2000; 96: 3181-3187.
- *Conget PA, Minguell JJ.* Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol.* 1999; 18: 67-73.
- *Crean SM, Meneski JP, Hullinger TG, Reilly MJ, DeBoever EH, Taichman RS.* N-linked sialylated sugar receptors support haematopoietic cell-osteoblast adhesions. *Br J Haematol.* 2004;124: 534-546.
- *Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N.* Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science.* 1994; 265: 1582-1584.
- *Dankbar B, Padró T, Leo R, Feldmann B, Kropff M, Mesters RM, Serve H, Berdel WE, Kienast J.* Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood.* 2000; 95: 2630-2636.
- *Deguchi K, Yagi H, Inada M, Yoshizaki K, Kishimoto T, Komori T.* Excessive extramedullary hematopoiesis in Cbfa1-deficient mice with a congenital lack of bone marrow. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 255: 352-9.

- *Dias S, Hattori K, Zhu Z, Heissig B, Choy M, Lane W, Wu Y, Chadburn A, Hyjek E, Gill M, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S.* Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *J Clin Inv* 2000; 106: 511-521.
- *Dong X, Han ZC, Yang R.* angiogenesis and antiangiogenetic therapy in hematologic malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2007;62: 105-118.
- *Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, Ringstedt T, Kraemer R, Hahn R, Wang S, Ibanez CF, Rafii S, Hempstead BL.* Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development.* 2000; 127: 4531-4540.
- *Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G.* Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 1997; 89: 747-54.
- *Fang B, Zheng C, Liao L, Han Q, Sun Z, Jiang X, Zhao RC.* Identification of human chronic myelogenous leukemia progenitor cells with hemangioblastic characteristics. *Blood* 2005; 105: 2733-2740.
- *Farahani M, Treweek AT, Toh CH, Till KJ, Harris RJ, Cawley JC, Zuzel M, Chen H.* Autocrine VEGF mediates the antiapoptotic effect of CD154 on CLL cells. *Leukemia.* 2005; 19: 524-530.
- *Fidel IJ, Ellis LM.* Neoplastic angiogenesis: not all blood vessels are created equal. *N Engl J Med.* 2004; 351: 215-216.
- *Friedl P.* Cell fusion: new mechanisms of plasticity in cancer? *Lancet Oncol* 2005; 6, 916-918.
- *Fiedler W, Graeven U, Ergun S, Verago S, Kilic N, Stockschlader M, Hossfeld DK.* Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia. *Blood* 1997; 89: 1870-1875.
- *Foss HD, Araujo I, Demel G, Klotzbach H, Hummel M, Stein H.* Expression of vascular endothelial growth factor in lymphomas and Castleman's disease. *J Pathol.* 1997 Sep;183(1):44-50.
- *Fruehauf S, Haas R, Conradt C, Murea S, Witt B, Möhle R, Hunstein W.* Peripheral blood progenitor cell (PBPC) counts during steady-state hematopoiesis allow to estimate the yield of mobilized PBPC after filgrastim (R-metHuG-CSF)-supported cytotoxic chemotherapy. *Blood.* 1995;85:2619-26.
- *Gazit Y, Liu Q.* Plasma levels of SDF-1 and expression of SDF-1 receptor on CD34+ cells in mobilized peripheral blood of non-Hodgkin's lymphoma patients. *Stem Cells.* 2001;19: 37-45.
- *Gerety SS, Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ.* Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol Cell.* 1999 Sep; 4: 403-14.

- *Go RS, Jobe DA, Asp KE, Callister SM, Mathiason MA, Meyer LA, Bottner WA, Cole CE, Farnen JP, Frisby KA.* Circulating endothelial cells in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Ann Hematol.* 2008; 87: 369-373.
- *Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, Grupp SA, Sieff CA, Mulligan RC, Johnson RP.* Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med.* 1997; 3: 1337-45.
- *Gora-Tybor, J., Blonski, J. Z. & Robak, T.* Circulating proangiogenic cytokines and angiogenesis inhibitor endostatin in untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mediators Inflamm* 2003 ; 12 : 167-171.
- *Greenfield EM, Horowitz MC, Lavish SA.* Stimulation by parathyroid hormone of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor expression in osteoblasts is an immediate-early gene response induced by cAMP signal transduction. *J Biol Chem.* 1996; 271: 10984-10989.
- *Gunsilius E, Duba HC, Petzer AL, Kähler CM, Grünewald K, Stockhammer G, Gabl C, Dirnhofer S, Clausen J, Gastl G.* Evidence from a leukemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. *Lancet.* 2000; 355: 1688-1691 *Lancet.* 2000 May 13; 355: 1688-1691.
- *Hamada T, Möhle R, Hesselgesser J, Hoxie J, Nachman RL, Moore MA, Rafii S.* Transendothelial migration of megakaryocytes in response to stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) enhances platelet formation. *J Exp Med.* 1998; 188: 539-548.
- *Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR, Seftor RE.* Vasculogenic mimicry and tumor cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 411-421.
- *Herzog EL, Chai L, Krause DS.* Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood.* 2003;102:3483-3493.
- *Heyns AD, Eldor A, Vlodavsky I, Kaiser N, Fridman R, Panet A.* The antiproliferative effect of interferon and the mitogenic activity of growth factors are independent cell cycle events. Studies with vascular smooth muscle cells and endothelial cells. *Exp Cell Res.* 1985; 161: 297-306.
- *Hida K, Klagsbrun M.* A new perspective on tumor endothelial cells: unexpected chromosome and centrosome abnormalities. *Cancer Res.* 2005; 65: 2507-2510.
- *Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC.* Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood.* 2004; 104: 607-618.
- *Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, Schmid T, Gunsilius E, Hilbe G, Wöll E, Kähler CM.* CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol.* 2004 Sep;57(9):965-969.
- *Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL.* The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000; 15: 2-12.

- Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, McCarville ME, Orchard PJ, Pyeritz RE, Brenner MK. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood*. 2001; 97: 1227-1231.
- *Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ*. Evidence of angiogenesis in patients with Acute Myeloid Leukemia. *Blood*. 2000; 95: 309-313.
- *Ingram, D. A., Caplice, N. M. & Yoder, M. C*. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 106, 1525-31 (2005).
- *Jackson C*. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002; 11: 295-299.
- *Jackson KA, Mi T, Goodell MA*. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96: 14482-14486.
- *Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N*. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 1993; 362: 841-844.
- *Kini, A. R., Kay, N. E. & Peterson, L. C*. Increased bone marrow angiogenesis in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 1414-1418.
- *Korbling M, Anderlini P*. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood*. 2001; 98: 2900-2908.
- *Korbling M, Estrov Z*. Adult stem cells for tissue repair: a new therapeutic concept? *N Engl J Med*. 2003; 349: 570-582.
- *Kovanetz M, Ferrara N*. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 5018-5022.
- *Kuittinen O, Savolainen ER, Koistinen P, Möttönen M, Turpeenniemi-Hujanen T*. MMP-2 and MMP-9 expression in adult and childhood acute lymphatic leukemia (ALL). *Leuk Res*. 2001; 25: 125-131.
- *Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, Kerr J, Riminucci M, Benayahu D, Robey PG*. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J Bone Miner Res*. 1997;12: 1335-1347.
- *Kuzu I, Beksac M, Arat M, Celebi H, Elhan AH, Ereku S*. Bone marrow microvessel density (MVD) in adult acute myeloid leukemia (AML): therapy induced changes and effects on survival. *Leuk Lymphoma*. 2004; 45: 1185-1190.
- *Lawson ND, Scheer N, Pham VN, Kim CH, Chitnis AB, Campos-Ortega JA, Weinstein BM*. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* 2001; 128: 3675-3683.

- *Lee B, Thirunavukkarasu K, Zhou L, Pastore L, Baldini A, Hecht J, Geoffroy V, Ducey P, Karsenty G.* Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor OSF2/CBFA1 in cleidocranial dysplasia. *Nat Genet.* 1997; 16: 307-310.
- *Lee YK, Bone ND, Strega AK, Shanafelt TD, Jelinek DF, Kay NE.* VEGF receptor phosphorylation status and apoptosis is modulated by a green tea component, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 2004; 104: 788-794.
- *Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP.* Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest.* 2000; 105: 71-77.
- *Loges S, Heil G, Bruweleit M, Schoder V, Butzal M, Fischer U, Gehling UM, Schuch G, Hossfeld DK, Fiedler W.* Analysis of concerted expression of angiogenic growth factors in acute myeloid leukemia: expression of angiopoietin-2 represents an independent prognostic factor for overall survival. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 1109-1117.
- *Lord BI, Hendry JH.* The distribution of haemopoietic colony-forming units in the mouse femur, and its modification by x rays. *Br J Radiol.* 1972; 45: 110-115.
- *Lord BI, Testa NG, Hendry JH.* The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood.* 1975; 46: 65-72.
- *Lord BI.* The architecture of bone marrow cell populations. *Int J Cell Cloning.* 1990; 8: 317-331.
- *Luttun A, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P.* The role of proteinases in angiogenesis, heart development, restenosis, atherosclerosis, myocardial ischemia, and stroke: insights from genetic studies. *Curr Atheroscler Rep.* 2000; 2: 407-416.
- *Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S.* Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med.* 2001 Nov;7(11):1194-201.
- *Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B.* Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 1364-1369.
- *Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, Goldhirsch A, Martinelli G, Bertolini F.* Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood.* 2001 Jun 1;97(11):3658-61.
- *Mancuso P, Calleri A, Cassi C, Gobbi A, Capillo M, Pruneri G, Martinelli G, Bertolini F.* Circulating endothelial cells as a novel marker of angiogenesis. *Adv Exp Med Biol* 522, 83-97 (2003).

- *Mauro E, Rigolin GM, Fraulini C, Sofritti O, Ciccone M, De Angeli C, Castoldi G, Cuneo A. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with haematological malignancies after treatment with filgrastim and chemotherapy for autologous transplantation. Eur J Haematol. 2007 May;78(5):374-380.*
- *Moehler TM, Neben K, Ho AD, Goldschmit H. Angiogenesis in hematologic malignancies. Ann Hematol. 2001; 80: 695-705.*
- *Moehler TM, Ho AD, Goldschmit H, Barlogie B. Angiogenesis in hematologic malignancies. Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2003;45: 227-244.*
- *Mollica, S. Angiogenesis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: methods of study, clinical significance and prognostic implications. Leuk Lymphoma 2000 ; 42: 603-607.*
- *Munshi NC, Wilson C. Increased bone marrow microvessel density in newly diagnosed multiple myeloma carries a poor prognosis. Semin Oncol. 2001; 28: 565-569.*
- *Munshi NC, Wilson CS, Penn J. Angiogenesis in newly diagnosed multiple myeloma: poor prognosis with increased microvessel density in bone marrow biopsies. Blood 1998; 92/S1: 98a.*
- *Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. Nature. 1996;382: 635-638.*
- *Padro T, Ruiz S, Bieker R, Burger H, Steins M, Kienast J, Buchner T, Berdel WE, Mesters RM. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. Blood 2000; 95: 2637-2644.*
- *Pawelek, J.M. Tumour-cell fusion as a source of myeloid traits in cancer. Lancet Oncol 2005; 6: 988-993.*
- *Pasqualucci L, Liso A, Martelli MP, Bolli N, Pacini R, Tabarrini A, Carini M, Bigerna B, Pucciarini A, Mannucci R, Nicoletti I, Tiacci E, Meloni G, Specchia G, Cantore N, Di Raimondo F, Pileri S, Mecucci C, Mandelli F, Martelli MF, Falini B. Mutated nucleophosmin detects clonal multilineage involvement in acute myeloid leukemia: Impact on WHO classification. Blood. 2006; DOI 10.1182/blood-2006-06-026716.*
- *Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. Blood 2000; 95: 952-958.*

- *Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. Science. 1999; 283: 845-848.*
- *Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, Botta R, Gabbianelli M, Lulli V, Marziali G, Masella B, Müller R, Sgadari C, Testa U, Bonanno G, Peschle C. Identification of the hemangioblast in postnatal life. Blood. 2002; 100: 3203-3208.*
- *Pepper MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis. Thromb Haemost. 2001; 86: 346-355.*
- *Peters BA, Diaz LA, Polyak K, Meszler L, Romans K, Guinan EC, Antin JH, Myerson D, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW, Lengauer C. Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. Nat Med. 2005; 11(3):261-262.*
- *Ponomaryov T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Magerus A, Caruz A, Fujii N, Nagler A, Lahav M, Szyper-Kravitz M, Zipori D, Lapidot T. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. J Clin Invest. 2000; 106: 1331-1339.*
- *Puduvalli VK, Sawaya R. Antiangiogenesis -- therapeutic strategies and clinical implications for brain tumors. J Neurooncol. 2000; 50: 189-200.*
- *Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. Nat Med. 2003; 9: 677-684.*
- *Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. J Clin Invest. 2000; 105: 17-19.*
- *Rafii, S., Lyden, D., Benezra, R., Hattori, K. & Heissig, B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? Nat Rev Cancer. 2002; 2: 826-35.*
- *Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. J Clin Invest. 2002; 109: 337-346.*
- *Rigolin GM, Della Porta M, Bigoni R, Tieghi A, Cuneo A, Castoldi G. Dendritic cells in acute promyelocytic leukaemia. Br J Haematol 2001; 114: 830-833.*
- *Rigolin GM, Fraulini C, Ciccone M, Mauro E, Bugli AM, De Angeli C, Negrini M, Cuneo A, Castoldi G. Neoplastic circulating endothelial cells in multiple myeloma with 13q14 deletion. Blood. 2006; 107: 2531-2535.*

- *Rigolin GM, Mauro E, Ciccone M, Fraulini C, Sofritti O, Castoldi G, Cuneo A.* Neoplastic circulating endothelial-like cells in patients with acute myeloid leukaemia *Eur J Haematol.* 2007; 78: 365-373.
- *Rodan GA, Martin TJ.* Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. *Calcif Tissue Int.* 1982; 34: 311.
- *Roodman GD.* Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med.* 2004; 350: 1655-1664.
- *Saiura A, Sata M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M.* Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. *Nat Med.* 2001;7: 382-383.
- *Schliemann C, Bieker R, Padro T, Kessler T, Hintelmann H, Buchner T, Berdel WE, Mesters RM.* Expression of angiopoietins and their receptor Tie2 in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2006; 91: 1203-1211.
- *Schreiber S, Ackermann J, Obermair A, Kaufmann H, Urbauer E, Aletaha K, Gisslinger H, Chott A, Huber H, Drach J.* Multiple myeloma with deletion of chromosome 13q is characterized by increased bone marrow neovascularisation. *Br J Haematol.* 2000; 110: 605-609.
- *Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP.* Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood.* 1998; 92: 362-367.
- *Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E.* Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843-845.
- *Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM.* Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation.* 2002;106: 1199-204.
- *Singh RK, Gutman M, Bucana CD, Sanchez R, Llansa N, Fidler IJ.* Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 4562-4566.
- *Stalmans I, Ng YS, Rohan R, Fruttiger M, Bouche A, Yuce A, Fujisawa H, Hermans B, Shani M, Jansen S, Hicklin D, Anderson DJ, Gardiner T, Hammes HP, Moons L, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P, D'Amore PA.* Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest.* 2002; 109: 327-336.

- *Steidl U, Kronenwett R, Rohr UP, Fenk R, Kliszewski S, Maercker C, Neubert P, Aivado M, Koch J, Modlich O, Bojar H, Gattermann N, Haas R.* Gene expression profiling identifies significant differences between the molecular phenotypes of bone marrow-derived and circulating human CD34+ hematopoietic stem cells. *Blood.* 2002; 99: 2037-2044.
- *Steins MB, Padró T, Bieker R, Ruiz S, Kropff M, Kienast J, Kessler T, Buechner T, Berdel WE, Mesters RM.* Efficacy and safety of thalidomide in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2002; 99: 834-839.
- *Stetler-Stevenson M, Mansoor A, Lim M, Fukushima P, Kehrl J, Marti G, Ptaszynski K, Wang J, Stetler-Stevenson WG.* Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in reactive and neoplastic lymphoid cells. *Blood.* 1997; 89: 1708-1715.
- *Streubel B, Chott A, Huber D, Exner M, Jäger U, Wagner O, Schwarzingen I.* Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 2004 Jul 15;351(3):250-259.
- *Taichman RS, Emerson SG.* Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med.* 1994; 179: 1677-1682.
- *Taichman RS, Emerson SG.* The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment. *Stem Cells.* 1998; 16: 7-15.
- *Taichman RS, Reilly MJ, Verma RS, Emerson SG.* Augmented production of interleukin-6 by normal human osteoblasts in response to CD34+ hematopoietic bone marrow cells in vitro. *Blood.* 1997; 89: 1165-1172.
- *Taichman RS.* Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create hematopoietic stem-cell niche. *Blood.* 2005;105: 2631-2639.
- *Talks KL, Harris AL.* Current status of antiangiogenic factors. *Br J Haematol.* 2000 Jun;109: 477-489.
- *Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS.* Liver from bone marrow in humans. *Hepatology.* 2000; 32: 11-6.
- *Till KJ, Spiller DG, Harris RJ, Chen H, Zuzel M, Cawley JC.* CLL, but not normal, B cells are dependent on autocrine VEGF and alpha4beta1 integrin for chemokine-induced motility on and through endothelium. *Blood.* 2005; 10: 4813-4819.
- *Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S.* Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation.* 2003; 108: 2511-2516.

- *Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Ranieri G, Serio G, Silvestris F, Dammacco F.* Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 1994; 87: 503-508.
- *Vacca A, Ribatti D, Ruco L, Giacchetta F, Nico B, Quondamatteo F, Ria R, Iurlaro M, Dammacco F.* Angiogenesis extent and macrophage density increase simultaneously with pathological progression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Cancer.* 1999; 79: 965-970.
- *Vacca A, Ria R, Semeraro F, Merchionne F, Coluccia M, Boccarelli A, Scavelli C, Nico B, Gernone A, Battelli F, Tabilio A, Guidolin D, Petrucci MT, Ribatti D, Dammacco F.* Endothelial cells in the bone marrow of patients with multiple myeloma. *Blood.* 2003; 102(9):3340-3348.
- *Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaia O, Malagutti P, Bugli AM, Bragotti LZ, Francolini G, Mauro E, Castoldi G, Ferrari R.* CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation.* 2004; 110:1209-1212.
- *Valgimigli M, Rigolin GM, Cittanti C, Malagutti P, Curello S, Percoco G, Bugli AM, Della Porta M, Bragotti LZ, Ansani L, Mauro E, Lanfranchi A, Giganti M, Feggi L, Castoldi G, Ferrari R.* Use of granulocyte-colony stimulating factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell mobilization in humans: clinical and angiographic safety profile. *Eur Heart J.* 2005; 26: 1838-1345.
- *Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW.* Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature.* 2003; 422: 901-904.
- *Visconti RP, Richardson CD, Sato TN.* Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 8219-8224.
- *Wang JF, Liu ZY, Groopman JE.* The alpha-chemokine receptor CXCR4 is expressed on the megakaryocytic lineage from progenitor to platelets and modulates migration and adhesion. *Blood.* 1998; 92: 756-764.
- *Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M.* Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature.* 2003; 422: 897-901.
- *Wierzbowska A, Robak T, Krawczynska A, Wrzesien-Kus A, Pluta A, Cebula B, Smolewski P.* Circulating endothelial cells in patients with acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 2005; 75: 492-497.
- *Woywodt A, Scheer J, Hambach L, Buchholz S, Ganser A, Haller H, Hertenstein B, Haubitz M.* Circulating endothelial cells as a marker of endothelial damage in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2004 May 1;103(9):3603-3605. 2004.

- *Yu JL, Rak JW, Coomber BL, Hicklin DJ, Kerbel RS.* Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science.* 2002; 295: 1526-1528.
- *Zhang H, Li Y, Li H, Bassi R, Jimenez X, Witte L, Bohlen P, Hicklin D, Zhu Z.* Inhibition of both the autocrine and the paracrine growth of human leukemia with a fully human antibody directed against vascular endothelial growth factor receptor 2. *Leuk Lymphoma.* 2004; 45: 1887-1897.
- *Zhang M, Volpert O, Shi YH, Bouck N.* Maspin is an angiogenesis inhibitor. *Nat Med.* 2000; 6: 196-199.
- *Zhang H, Vakil V, Braunstein M, Smith EL, Maroney J, Chen L, Dai K, Berenson JR, Hussain MM, Klueppelberg U, Norin AJ, Akman HO, Ozçelik T, Batuman OA.* Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance. *Blood.* 2005; 105: 3286-3294.
- *Zhong TP, Childs S, Leu JP, Fishman MC.* Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature* 2001; 414: 216-220.
- *Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Müller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjani ED, Peschle C.* KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science.* 1999; 285: 1553-1558.
- *Zustovich F, Gottardo F, De Zorzi L, Cecchetto A, Dal Bianco M, Mauro E, Cartei G.* Cardiac metastasis from renal cell carcinoma without inferior vena involvement: a review of the literature based on a case report. Two different patterns of spread? *Int J Clin Oncol.* 2008; 13: 271-274.

*

*

*