

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CHIRURGICHE: PROGETTO N°3 “SCIENZE
DERMATOLOGICHE”**

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 06/D4

Settore Scientifico disciplinare: MED/35

**Espressione del *vascular endothelium growth factor* (VEGF) nella
micosi fungoide.**

Presentata da: Dr. Alessandro Pileri

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. A. Stella

Chiar.ma Prof.ssa A. Patrizi

Esame finale anno 2012

A chi in tutti questi anni mi ha dato forza, sapienza, curiosità e coraggio.

Espressione del *vascular endothelium growth factor* (VEGF) nella micosi fungoide.

Riassunto

La micosi fungoide (MF) è il linfoma a cellule T primitivo della cute di più comune riscontro nella pratica clinica del Dermatologo. Sebbene la malattia, sia usualmente indolente negli stadi iniziali, la prognosi appare decisamente peggiore nelle fasi avanzate. Per i pazienti in quest'ultima condizione, nonostante i protocolli più recenti abbiano aumentato l'aspettativa di vita, al momento non sono state sviluppate strategie terapeutiche tali da indurre remissioni durature. Recenti osservazioni indicano che alti livelli di espressione del fattore di crescita dell'endotelio vasale o vascular endothelial growth factor (VEGF) nelle cellule della MF sembrano correlare con una prognosi peggiore. Nello studio oggetto della presente tesi, si è provveduto a vagliare le eventuali differenze di espressione di VEGF nella MF e nei linfociti T normali. In primo luogo sono stati confrontati 63 casi di MF con 20 campioni corrispondenti alle diverse sottopopolazioni di linfociti T normali, allo scopo di stabilire quale fra questi esprimesse maggiori livelli di *VEGF*. Tale esperimento ha dimostrato che il gene è notevolmente più espresso nella MF. In secondo luogo, si è provveduto a stabilire se tale dato sia da correlarsi ad un fenomeno patologico o fisiologico. Per tale motivo, sono state eseguite indagini di *gene expression profiling* (GEP) allo scopo di vagliare i livelli di *VEGF* nella popolazione linfocitaria T normale ($CD4^+$, $CD8^+$, $HLA-DR^+$ e $HLA-DR^-$). Tali analisi hanno dimostrato che i linfociti T attivati esprimono maggiormente *VEGF* e che il loro GEP è globalmente paragonabile a quello della MF. Alla luce di ciò, i linfociti T attivati sono stati considerati la controparte normale delle cellule della MF. Successivamente si è provveduto a confrontare l'espressione quantitativa di *VEGF* nei linfociti T attivati e nelle cellule della MF, evidenziando come questa sia maggiore nella popolazione neoplastica indipendentemente dallo stadio della malattia. Le indagini immunocitochimiche condotte su 18 casi di MF, hanno permesso di confermare quanto evidenziato attraverso il GEP. In conclusione la ricerca, oggetto della presente tesi, ha dimostrato per la prima volta l'espressione di VEGF negli elementi della MF. Ciò porta a

supporre che la de-regolazione genica della via di VEGF sia correlata nella patogenesi della MF e che tale molecola possa considerarsi un potenziale bersaglio terapeutico.

Key words: Micosi fungoide – VEGF – microarray – immunistochemica

Introduzione

La micosi fungoide (MF) rappresenta il più frequente¹ linfoma cutaneo a cellule T periferiche (CTCL). Classicamente, dal punto di vista clinico, vengono distinte tre fasi successive: in chiazza, in placca e tumorale. La malattia è usualmente indolente, con prognosi, negli stadi iniziali, sovrapponibile a quella della popolazione generale¹. Per converso i pazienti in stadio avanzato (superiore a IIA) presentano una malattia aggressiva, con possibile disseminazione a linfonodi, sangue periferico ed organi interni. Tale peculiare comportamento clinico è alla base dell'attuale sistema di stadiazione e rappresenta il razionale per un approccio terapeutico, che prevede differenti schemi (*skin directed therapy* vs terapie sistemiche) a seconda dello stadio di malattia³.

La MF è stata oggetto di pochi studi di *gene expression profiling* (GEP)⁴, volti a comprendere la patogenesi molecolare della malattia. Da questi⁴, è emerso un aumento dell'attività della pathway di NF-kB (un elemento essenziale per l'attività fisiologica dei linfociti T⁵). Al contempo, è stata avanzata l'ipotesi che l'espressione di alcune molecole potesse correlarsi, sia con lo stadio della malattia (per esempio I-IIA vs IIB o superiore) che con la prognosi (malattia indolente vs aggressiva)⁴. Tra le molecole vagliate in questi studi, si segnala l'aumento dell'espressione del gene che codifica per il *vascular endothelial growth factor* (VEGF)⁴ la quale è stata correlata a malattia refrattaria alle terapie (e di conseguenza, a prognosi peggiore). Tali osservazioni hanno, tuttavia, lasciato insoluti alcuni quesiti, non essendo chiaro: 1) se i livelli di VEGF fossero da attribuirsi alla popolazione neoplastica o al micro-ambiente circostante, 2) se i dati di GEP fossero sostenuti da studi immunohistochimici e 3) se l'espressione di VEGF fosse variabile nelle differenti sottopopolazioni linfocitarie T⁴.

Occorre ricordare che, la molecola VEGF svolge un ruolo chiave sia nell'angiogenesi, processo riconducibile alle fasi fisiologiche di sviluppo e rimodellamento tissutale, che alla neo-angiogenesi tumorale⁶. Quest'ultima viene indotta tanto da segnali cellulari dalla popolazione neoplastica, quanto dall'azione delle cellule reattive del micro-ambiente tumorale (macrofagi, mastociti e linfociti): in tal modo, viene stimolata la crescita neoplastica, per via paracrina⁷⁻⁹. Pertanto, si

considera la neo-angiogenesi un elemento cardine nello sviluppo tumorale^{10, 11} e numerosi studi hanno dimostrato come tale fattore sia direttamente correlato all'aggressività ed alla capacità metastatizzante di una neoplasia¹²⁻²¹. In campo ematologico, l'angiogenesi svolge un ruolo significativo in patologie quali: le leucemie acute, le sindromi mieloproliferative croniche ed i linfomi²²⁻³⁰. Per quanto concerne questi ultimi, De Leval e Piccaluga^{31, 32} hanno dimostrato come il linfoma angioimmunoblastico (AITL) presenti un'elevata espressione di *VEGF*. In tali studi è stata messa in luce, sia la capacità del GEP di rilevare alti livelli di *VEGF* nei campioni tumorali³¹ che la possibilità di attribuire, per mezzo delle indagini immunohistochimiche, tale espressione esclusivamente alla popolazione neoplastica³².

Lo scopo dello studio, oggetto della presente tesi, è stato quello di vagliare l'espressione di *VEGF* nella MF, ponendo l'attenzione su: 1) le possibili differenze di espressione di *VEGF* (sia genica, che proteica) fra le cellule della MF e la popolazione T normale in genere, 2) l'eventuale differente espressione di *VEGF* nelle cellule della MF e nelle cellule reattive, presenti nel microambiente tumorale.

Materiali e Metodi

Raccolta dei casi

E' stato studiato il profilo di espressione genica (GEP) di 20 campioni corrispondenti alle principali sottopopolazioni linfocitarie T normali (CD4⁺, CD8⁺, HLA-DR⁺, HLA-DR⁻) e di 63 casi di MF in vario stadio clinico (vedi oltre). Inoltre, sono stati selezionati 18 blocchetti relativi a biopsie cutanee fissate in formalina, ed incluse in paraffina, corrispondenti a diagnosi di MF e conservati negli archivi della Sezioni di Dermatologia e di Emolinfopatologia del Policlinico S.Orsola. Di tali casi, erano anche disponibili informazioni relative, sia allo stadio di malattia che al follow-up; in 13, la malattia era in stadio precoce (IA-IB), mentre in 5 era in stadio avanzato (III). Le informazioni cliniche dei casi sono riassunti nella Tabella 1. Tutti i pazienti avevano dato il proprio consenso allo studio, il quale è stato approvato dal Board locale, in ossequio alla Dichiarazione di Helsinki.

Istologia ed immunoistochimica

Dai casi selezionati sono state ottenute nuove sezioni, successivamente colorate in ematossilina eosina e Giemsa. Dal punto di vista immunofenotipico, risultavano essere già state studiate le seguenti molecole: CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD25, CD30, CD20, TIA, FOXP3, Granzyme B, Perforin, PD1, e Ki-67/MIB-1 (vedi Tabella 2). Per tutti casi si è proceduto a revisione critica dei preparati, con conferma diagnostica di MF sulla base dei criteri della IV Edizione della WHO Classification of Haematopoietic and Lymphoid Tumours¹ (Figura 1A). Da notare che 4 casi in stadio III erano caratterizzati dal punto di vista istologico da blasti citologicamente di grandi dimensioni, con morfologia anaplastica e forte espressione della molecola CD30 (Figura 1B).

Inoltre sono state ottenute sezioni aggiuntive che sono state cimentate con un anticorpo diretto contro la molecola VEGF (Tabella 2).

Le tecniche di visualizzazione degli anticorpi erano basate, sia sulla tecnica "alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase" (APAAP) che EnVision⁺ ^{33,34}.

Criteri utilizzati per la valutazione dell'espressione dei marcatori

Tutti i casi sono stati analizzati e discussi collegialmente con i Colleghi della U.O. di Emolinfopatia del Policlinico S. Orsola-Mapighi. Per quanto concerne i casi con lesioni in fase iniziale, in ossequio ai criteri diagnostici dell'ultima Classificazione WHO¹, sono stati presi in esame soltanto le lesioni aventi un infiltrato linfoide in banda, con linfociti di piccole o medie dimensioni, caratterizzati da nucleo indentato e localizzati nello strato basale dell'epidermide.

La quantità di elementi positivi all'immunocistochemica è stata valutata nel seguente modo: - = 0, rare = 1% - 20%, -/+ = 21% - 50%; +/- = 51% - 75%; + > 76% positivo. E' stata, inoltre, analizzata anche l'intensità della colorazione, anche se non è stata inclusa quale criterio per la positività cellulare, in quanto tale parametro poteva subire variazioni dipendenti dal tempo di fissazione di ciascun campione. Le sezioni sono state esaminate con un microscopio Olympus BX51, dotato di obiettivi Olympus UPlanFI con apertura numerica 2x/0.08, 10x/0.30, 20x/0.50, x40/0.75 and 60x/0.9 (Olympus Italia Srl, Italia). Le immagini sono state ottenute con una macchina digitale Olympus C7070WZ (Olympus Co, Tokyo, Giappone) e poi manipolate con Adobe Photoshop CS2 (Adobe System Incorporated, San Jose, CA, USA).

Il profilo immunofenotipico dei casi è riassunto nella Tabella 1.

Espressione genica ed analisi statistica

Per quanto concerne il GEP, sono stati utilizzati, sia i dati precedentemente generati presso la U.O. di Emolinfopatia in 20 campioni di cellule T normali (CD4⁺, CD8⁺, resting ed attivati)³⁵ che quelli relativi a 63 casi di MF⁴, questi ultimi consultabili presso l'indirizzo <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds> (GSE9479). Le caratteristiche clinico-patologiche dei suddetti casi di MF, erano state già oggetto di studi precedenti⁴. Per quanto concerne la molecola VEGF, è stata analizzata tramite tecniche di microarray (HG-U133 2.0 plus, Affymetrix, CA, USA), utilizzando 4 tipi differenti di sonde (210512_s_at; 210513_s_at; 211527_x_at; 212171_x_at). I dati ottenuti sono stati, quindi, normalizzati per la corretta interpretazione³⁶.

Per l'analisi dei livelli di espressione di *VEGF* nei campioni riferibili a materiale patologico vs sano, oppure tra campioni di MF in differente stadio, è stato utilizzato sia lo Student T-test, che il

Mann-Whitney test. I dati ottenuti sono stati, quindi, elaborati con Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, CA, USA).

Risultati

Analisi del profilo di espressione genica

In primo luogo, nello studio oggetto della presente tesi, si è vagliata la differenza di espressione di *VEGF* nelle cellule della MF e nei linfociti T normali. Pertanto, sono stati valutati i livelli di mRNA nelle due popolazioni, constatando come i livelli di *VEGF* risultassero maggiori nei casi di MF (186.02 - STD 90.14 - vs. 48.31 - STD 17.69 - $p < 0.001$) (Figura 2A).

Successivamente è stato valutato se la precedente osservazione riflettesse un fenomeno indotto dalla patologia od una reazione fisiologica del microambiente tissutale. Per tale ragione è stato studiato il GEP di *VEGF* nelle diverse popolazioni T con particolare riferimento ai linfociti T CD4⁺, CD8⁺, “resting” ed attivati. Da ciò è emerso che i livelli di mRNA di *VEGF* sono maggiori nei linfociti T attivati (HLA-DR⁺), rispetto a quelli “resting” (HLA-DR⁻) (107.27 – STD 30.29 - vs. 55.23 – STD 11.47 - $p = 0.003$) (Figura 2B), senza differenze tra elementi CD4⁺ e CD8⁺ (“resting” o attivati). Pertanto allo scopo di identificare la controparte normale delle cellule della MF è stata vagliata la firma genica globale dei linfociti T, sia attivati, che resting. Nonostante nella MF vi sia un certo grado di variabilità di espressione dei geni propri di entrambe le sotto-popolazioni T (Figura 3A), la firma genica dei linfociti T attivati è risultata significativamente sovra-espressa (paired T-test, $p = 0.0001$; Figura 3B) e pertanto tale sottopopolazione è stata considerata la controparte normale della MF.

Sulla base di tale risultato, con lo scopo di evitare che la precedente analisi fosse falsata dalla presenza dei linfociti T resting, si è provveduto a mettere a confronto la sola popolazione attivata con le cellule della MF. Anche in questo caso l’espressione di *VEGF* è apparsa maggiore nella MF (186.02 - STD 90.14 - vs. 107.27 – STD 30.29 - $p = 0.04$) (Figura 4A), sebbene la differenza in valore assoluto sia risultata minore rispetto all’analisi precedente, dato peraltro atteso, in quanto le cellule T attivate mediamente esprimono un livello di *VEGF* superiore a quello della popolazione T nel suo complesso.

Infine, sono stati confrontati i livelli di *VEGF* nella MF, a seconda dello stadio clinico, con risultato che l'espressione non è apparsa dipendere dallo stadio di malattia (176.96 – STD 86.77 - vs. 228.02 – STD – 124.54 p=0.3) (Figura 4B).

Immunostochimica

Nel corso dello studio è stata vagliata l'espressione della proteina VEGF nel materiale biotico di 18 pazienti affetti da MF. Occorre sottolineare come tale molecola sia risultata positiva in tutti i casi presi in esame ed inoltre è stato possibile chiaramente attribuire tale espressione sia alla popolazione normale, che agli elementi neoplastici. Questi ultimi presentavano, tuttavia, un livello di espressione maggiore rispetto alla restante popolazione cellulare (Figura 5). In particolare, l'intervallo di positività variava dal 21% al 100% delle cellule della MF (per maggiori dettagli si prega di consultare la tabella 1). Anche nel corso di questa analisi, analogamente a quanto osservato con il GEP, non è stato possibile evidenziare differenze di espressione stadio-dipendenti.

Discussione

La micosi fungoide (MF) corrisponde a circa il 50% di tutti i linfomi primitivi della cute ¹. Il suo decorso clinico è tipicamente indolente ³⁷; tuttavia, i casi in stadio più avanzato si caratterizzano per una prognosi del tutto sfavorevole ³⁷, fatto questo che sottolinea l'assoluta necessità di identificare nuove terapie, provviste di maggiore efficacia rispetto a quelle attualmente in uso.

Il VEGF è stato recentemente indicato quale potenziale bersaglio terapeutico in una serie di tumori ³⁸, che comprendono anche alcune neoplasie di pertinenza ematologica ^{39, 40}. Inoltre, approcci più in generale diretti contro fattori angiogenetici si sono rivelati efficaci per il trattamento dei linfomi T, come ad esempio lo AITL ³⁹.

La presente tesi fornisce il razionale biologico per approfondire lo studio della via del VEGF nella MF, proponendolo quale possibile candidato per terapie innovative. In particolare, per la prima volta, per quanto a nostra conoscenza, essa dimostra l'espressione del VEGF negli elementi della MF, utilizzando un approccio combinato molecolare ed immunocitochimico. Infatti, un precedente studio basato sulle tecniche di profilo di espressione genica aveva lasciato del tutto aperto il quesito se la sovra-espressione del *VEGF* fosse legata al tumore od al microambiente ⁴. Lo stesso approccio ha permesso di dimostrare come nello AITL la sovra-espressione di *VEGF* sia dovuta alla popolazione neoplastica e possa essere sostenuta dall'attivazione autocrina di VEGFR2/KDR ³², un'evenienza che deve essere verificata anche nel contesto della MF.

E' interessante rilevare come, per la prima volta in letteratura, la presente tesi abbia valutato l'espressione di *VEGF* nelle diverse sottopopolazioni del sistema linfocitario T. In particolare, si è rilevato come l'attivazione dei linfociti T sia associata ad un significativo incremento dell'espressione di *VEGF*, sia negli elementi CD4⁺ che in quelli CD8⁺. Pertanto, in linea teorica, l'elevata espressione di *VEGF* nella MF rispetto a quanto osservato in un pool di elementi T normali od in lesioni cutanee di tipo infiammatorio, potrebbe sia riflettere delle caratteristiche funzionali delle cellule neoplastiche, quale l'attivazione, che rappresentare un fenomeno legato al

fenotipo maligno. Al fine di rispondere a tale quesito, si è deciso di identificare la controparte normale della MF. A tale riguardo, lo studio ha fornito l'evidenza molecolare della correlazione fra MF e linfociti T attivati. Ciò risulta provvisto di particolare rilevanza, alla luce del fatto che recentemente il GEP si è dimostrato decisamente più affidabile della immunistochemica nel definire l'istogenesi di un linfoma T, alla luce delle aberrazioni fenotipiche che quest'ultimo generalmente presenta^{31, 32, 35}. In ogni caso, il GEP ha rivelato come la MF presenti una notevole variabilità nell'espressione dei programmi tipici degli elementi T normali. Ciò può riflettere la complessa composizione del microambiente (che comprende diverse categorie di linfociti T reattivi), così come la capacità fisiologica di andare incontro a diverse forme di differenziazione dopo stimolazione citochinica. A quest'ultimo riguardo, il contenuto in citochine della MF è decisamente elevato e composito⁴¹. In ogni caso, limitandosi a confrontare la MF con i linfociti T attivati, è possibile rilevare livelli significativamente più elevati di *VEGF* mRNA nei campioni tumorali. D'altro canto, in accordo con quanto precedentemente riportato in letteratura⁴, non si sono apprezzate reali differenze nell'espressione di VEGF nei casi in stadio iniziale rispetto a quelli in fase avanzata.

Complessivamente, i risultati di questa tesi sono in linea con il concetto che la produzione di VEGF probabilmente rappresenta un attributo proprio della MF, correlato al fenotipo neoplastico. In particolare, l'anomala espressione di VEGF nella MF può essere considerata quale un aspetto legato più all'insorgenza del tumore che alla progressione della malattia. Infatti, l'aumentata produzione di VEGF è stata documentata mediante l'immunistochemica in tutti i casi esaminati, incluse le lesioni in fase iniziale. D'altro canto, poiché livelli più elevati di VEGF sono stati correlati ad un decorso clinico più aggressivo⁴, è possibile che gli elementi neoplastici possano trarre vantaggio dall'aumento progressivo nella produzione di VEGF, indipendentemente dallo stadio della malattia. Al riguardo, la valutazione della valenza prognostica dell'immunocolorazione per il VEGF su sezioni di routine richiede assolutamente un ulteriore approfondimento. In ogni caso, se la crescita degli elementi della MF dipende in una qualche maniera dall'attività del VEGF,

più che mai tale via metabolica deve essere studiata quale potenziale bersaglio terapeutico nei pazienti portatori del processo.

In conclusione, la presente tesi documenta per la prima volta l'espressione di VEGF negli elementi della MF, suggerendo come questa possa costituire un evento importante nella patogenesi della malattia, proponendo al contempo la via del VEGF quale potenziale soggetto per ulteriori studi funzionali, nonché quale possibile bersaglio terapeutico.

Bibliografia

1. Swerdlow S, Campo E, Harris N, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues Lyon: IARC Press 2008.
2. Zinzani PL, Ferreri AJ, Cerroni L. Mycosis fungoides. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;65:172-182.
3. Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, et al. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood* 2007;110:1713-1722.
4. Shin J, Monti S, Aires DJ, et al. Lesional gene expression profiling in cutaneous T-cell lymphoma reveals natural clusters associated with disease outcome. *Blood* 2007;110:3015-3027.
5. Mantovani A. Molecular pathways linking inflammation and cancer. *Curr Mol Med*;10:369-373.
6. Kruizinga RC, de Jonge HJ, Kampen KR, Walenkamp AM, de Bont ES. Vascular Endothelial Growth Factor A isoform mRNA expression in pediatric acute myeloid leukemia. *Pediatr Blood Cancer*;56:294-297.
7. Nicosia RF, Tchao R, Leighton J. Interactions between newly formed endothelial channels and carcinoma cells in plasma clot culture. *Clinical & experimental metastasis* 1986;4:91-104.
8. Hamada J, Cavanaugh PG, Lotan O, Nicolson GL. Separable growth and migration factors for large-cell lymphoma cells secreted by microvascular endothelial cells derived from target organs for metastasis. *British journal of cancer* 1992;66:349-354.
9. Rak J, Filmus J, Kerbel RS. Reciprocal paracrine interactions between tumour cells and endothelial cells: the 'angiogenesis progression' hypothesis. *Eur J Cancer* 1996;32A:2438-2450.
10. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-364.
11. Skobe M, Rockwell P, Goldstein N, Vosseler S, Fusenig NE. Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nature medicine* 1997;3:1222-1227.
12. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *The New England journal of medicine* 1991;324:1-8.
13. Gasparini G, Weidner N, Maluta S, et al. Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head-and-neck squamous-cell carcinoma. *International journal of cancer* 1993;55:739-744.
14. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *The American journal of pathology* 1993;143:401-409.
15. Yamazaki K, Abe S, Takekawa H, et al. Tumor angiogenesis in human lung adenocarcinoma. *Cancer* 1994;74:2245-2250.
16. Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and breast cancer metastasis. *Lancet* 1995;346:388-390.
17. Gasparini G, Harris AL. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol* 1995;13:765-782.
18. Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J Clin Oncol* 1995;13:477-481.
19. Wiggins DL, Granai CO, Steinhoff MM, Calabresi P. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma. *Gynecologic oncology* 1995;56:353-356.
20. Fontanini G, Lucchi M, Vignati S, et al. Angiogenesis as a prognostic indicator of survival in non-small-cell lung carcinoma: a prospective study. *Journal of the National Cancer Institute* 1997;89:881-886.

21. Acenero MJ, Gonzalez JF, Gallego MG, Ballesteros PA. Vascular enumeration as a significant prognosticator for invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1998;16:1684-1688.
22. Vacca A, Ribatti D, Roncali L, et al. Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1994;87:503-508.
23. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Fanelli M, Roncali L, Dammacco F. Angiogenesis spectrum in the stroma of B-cell non-Hodgkin's lymphomas. An immunohistochemical and ultrastructural study. *European journal of haematology* 1996;56:45-53.
24. Vacca A, Ribatti D, Presta M, et al. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood* 1999;93:3064-3073.
25. Pruneri G, Bertolini F, Soligo D, et al. Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *British journal of cancer* 1999;81:1398-1401.
26. Mesa RA, Hanson CA, Rajkumar SV, Schroeder G, Tefferi A. Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2000;96:3374-3380.
27. Piccaluga PP, Visani G, Pileri SA, et al. Clinical efficacy and antiangiogenic activity of thalidomide in myelofibrosis with myeloid metaplasia. A pilot study. *Leukemia* 2002;16:1609-1614.
28. Piccaluga PP, Visani G, Finelli C, Grafone T, Baccarani M, Tura S. Efficacy of thalidomide in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2002;87:ELT18.
29. Pruneri G, Ponzoni M, Ferreri AJ, et al. Microvessel density, a surrogate marker of angiogenesis, is significantly related to survival in multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 2002;118:817-820.
30. Pruneri G, Bertolini F, Baldini L, et al. Angiogenesis occurs in hairy cell leukaemia (HCL) and in NOD/SCID mice transplanted with the HCL line Bonna-12. *Br J Haematol* 2003;120:695-698.
31. de Leval L, Rickman DS, Thielen C, et al. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood* 2007;109:4952-4963.
32. Piccaluga PP, Agostinelli C, Califano A, et al. Gene expression analysis of angioimmunoblastic lymphoma indicates derivation from T follicular helper cells and vascular endothelial growth factor deregulation. *Cancer Res* 2007;67:10703-10710.
33. Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S, et al. The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *J Clin Pathol* 1998;51:506-511.
34. Pileri SA, Roncador G, Ceccarelli C, et al. Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods. *J Pathol* 1997;183:116-123.
35. Piccaluga PP, Agostinelli C, Califano A, et al. Gene expression analysis of peripheral T cell lymphoma, unspecified, reveals distinct profiles and new potential therapeutic targets. *J Clin Invest* 2007;117:823-834.
36. Piccaluga PP, Agostinelli C, Righi S, Zinzani PL, Pileri SA. Expression of CD52 in peripheral T-cell lymphoma. *Haematologica* 2007;92:566-567.
37. Agar NS, Wedgeworth E, Crichton S, et al. Survival outcomes and prognostic factors in mycosis fungoides/Sezary syndrome: validation of the revised International Society for Cutaneous Lymphomas/European Organisation for Research and Treatment of Cancer staging proposal. *J Clin Oncol* 2010;28:4730-4739.
38. Ferrara N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature reviews* 2002;2:795-803.
39. Aguiar Bujanda D. Complete response of relapsed angioimmunoblastic T-cell lymphoma following therapy with bevacizumab. *Ann Oncol* 2008;19:396-397.

40. Leonard JP, Martin P, Barrientos J, Elstrom R. Targeted treatment and new agents in diffuse large B-cell lymphoma. *Seminars in hematology* 2008;45:S11-16.
41. Campbell JJ, Clark RA, Watanabe R, Kupper TS. Sezary syndrome and mycosis fungoides arise from distinct T-cell subsets: a biologic rationale for their distinct clinical behaviors. *Blood*;116:767-771.

Tabella 1: Riassunto delle informazioni cliniche ed immuofenotipiche.

| Patient | Stage | Age | Sex | CD3 | CD4 | CD8 | TIA | CD30 | Foxp3 | Granzyme B | Perforin | CD25 | PD1 | VEGF |
|---------|-------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-------|------------|----------|------|-----|------|
| 1 | IA | 46 years | M | + | + | - | +/- | - | - | - | - | -/+ | - | -/+ |
| 2 | III | 83 years | F | + | + | - | -/+ | - | - | - | - | + | - | -/+ |
| 3 | III | 83 years | F | + | - | - | -/+ | - | rare | - | - | + | - | +/- |
| 4 | IB | 37 years | M | + | - | + | -/+ | - | - | - | - | + | - | +/- |
| 5 | IA | 82 years | M | + | + | - | - | - | - | - | - | + | - | +/- |
| 6 | IA | 53 years | M | + | + | - | -/+ | -/+ | rare | - | - | + | + | + |
| 7 | IA | 79 years | F | + | + | - | -/+ | - | rare | - | - | + | -/+ | -/+ |
| 8 | III | 75 years | M | + | + | - | -/+ | - | - | - | - | + | + | + |
| 9 | IB | 75 years | M | + | + | - | -/+ | - | rare | - | - | + | - | -/+ |
| 10 | IB | 44 years | M | + | - | + | -/+ | - | - | - | - | + | - | +/- |
| 11 | IA | 44 years | M | + | + | - | +/- | - | rare | - | - | + | +/- | + |
| 12 | IA | 66 years | F | + | + | - | -/+ | - | rare | - | - | +/- | - | -/+ |
| 13 | IB | 38 years | F | + | -/+ | - | + | -/+ | rare | - | - | + | - | +/- |
| 14 | III | 80 years | F | + | -/+ | - | + | -/+ | rare | - | - | + | - | +/- |
| 15 | III | 78 years | F | + | - | + | - | - | - | - | - | + | - | +/- |
| 16 | IA | 54 years | F | + | - | - | - | - | - | - | - | + | - | +/- |
| 17 | IB | 58 years | M | + | + | - | - | - | - | - | - | + | - | +/- |
| 18 | IB | 45 years | M | + | - | + | - | - | - | - | - | + | - | + |

Legenda: - = 0; rare = 1-20%; +/- = 21-50%; +/- = 51-75%; + = 76-100% delle cellule neoplastiche positive.

Tabella 2: Elenco degli anticorpi utilizzati.

| Antibody anti | Clone | Source | Antigen retrieval | Dilution |
|---------------|-------------------|--|-------------------|-----------|
| CD1a | O10 | Immunotech | EDTA 750W | 1:2 |
| CD2 | AB75 | Novocastra | EDTA 750 W | 1:10 |
| CD3 | SP7* | Neomarker | EDTA 750 W | 1:250 |
| CD4 | 1F6 | Novocastra | EDTA 750 W | 1:30 |
| CD5 | S4/F6 | Dako | EDTA 750 W | 1:10 |
| CD7 | 272 | Novocastra | EDTA 750 W | 1:10 |
| CD8 | 44B | Dako | EDTA 750 W | 1:5 |
| CD25 | IL2R1 | Neomarker | EDTA 900W | 1:250 |
| CD30 | Ber-H2 | Prof. B. Falini | EDTA 900 W | 1:3 |
| TIA-1 | 2G9 | Immunotech | EDTA 750 W | 1:100 |
| Granzyme B | 11F1 | Novocastra | EDTA 750 W | 1:100 |
| Perforin | 5B10 | Neomarker | EDTA 750W | 1:10 |
| FOXP3 | 221D/D3 | Serotec | EDTA 900W | 1:180 |
| PD1 | NATPD1 | Kindly provided by Prof. M.A. Piris (CNIO, Madrid) | EDTA 900W | 1:2 |
| VEGF | Rabbit polyclonal | Lab Vision Corp. | Citrate 900W | Undiluted |
| Ki-67 | Mib-1 | Dako | EDTA 900 W | 1:20 |

* Rabbit monoclonal antibody. All the remaining monoclonal antibodies were from mouse.

Figura 1A

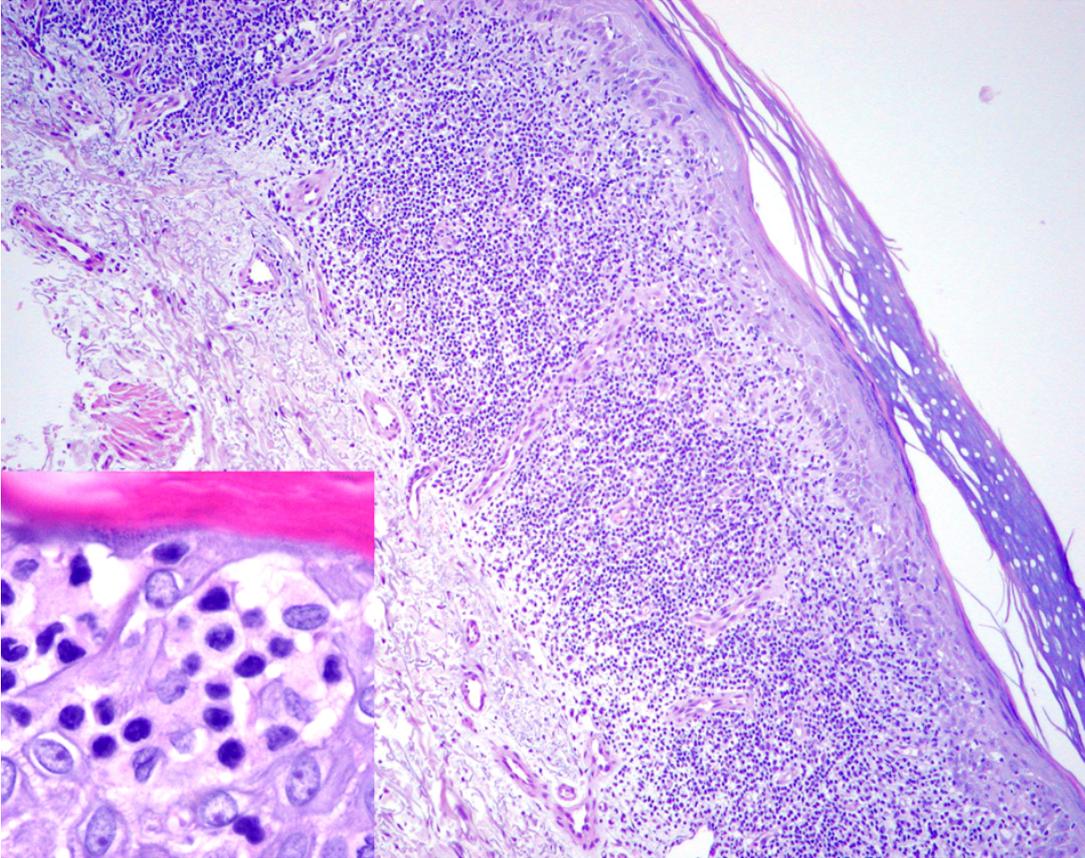


Figura 1B

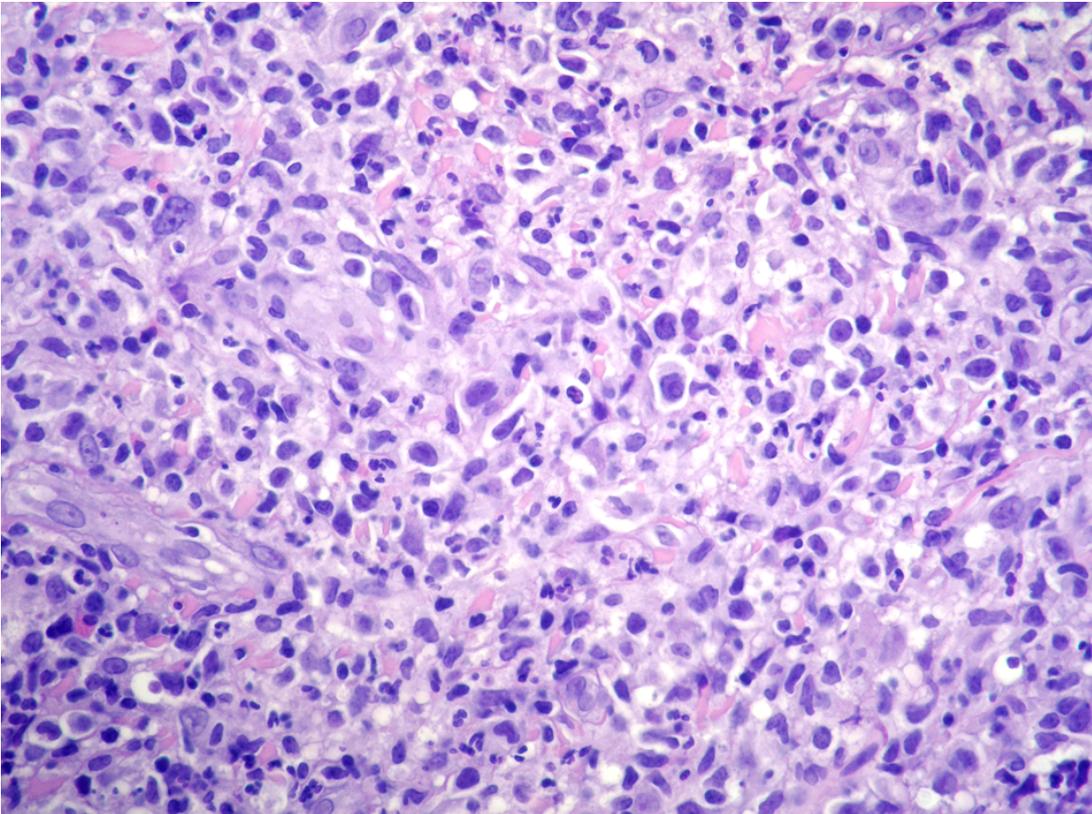


Figura 2

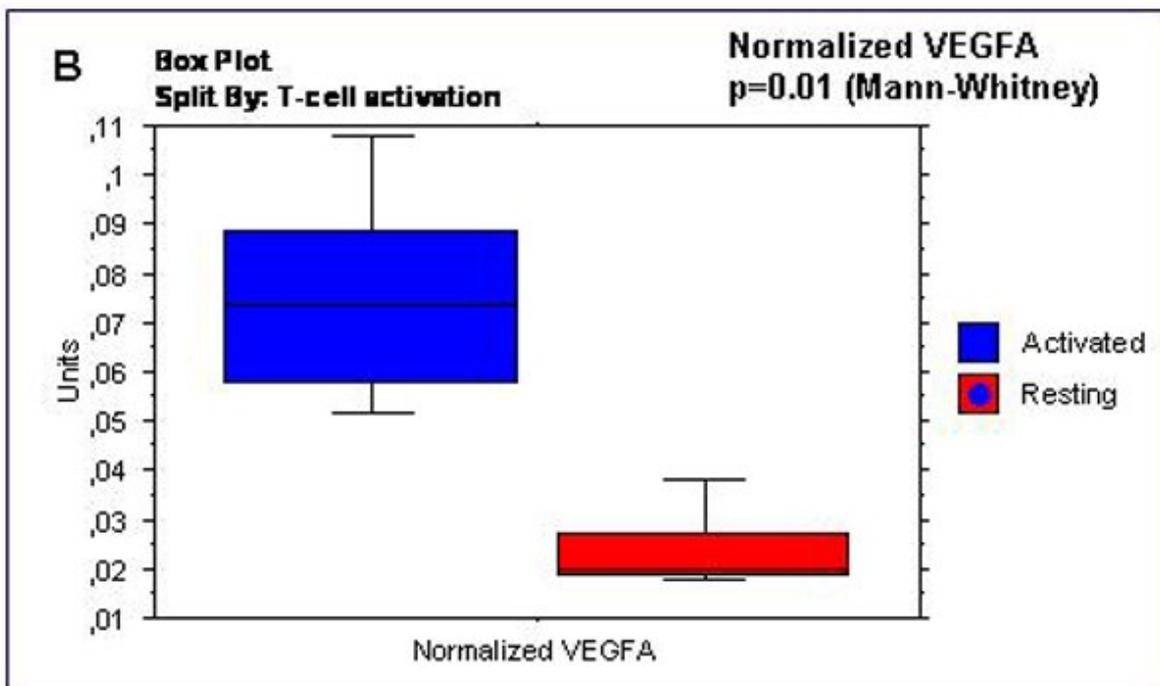
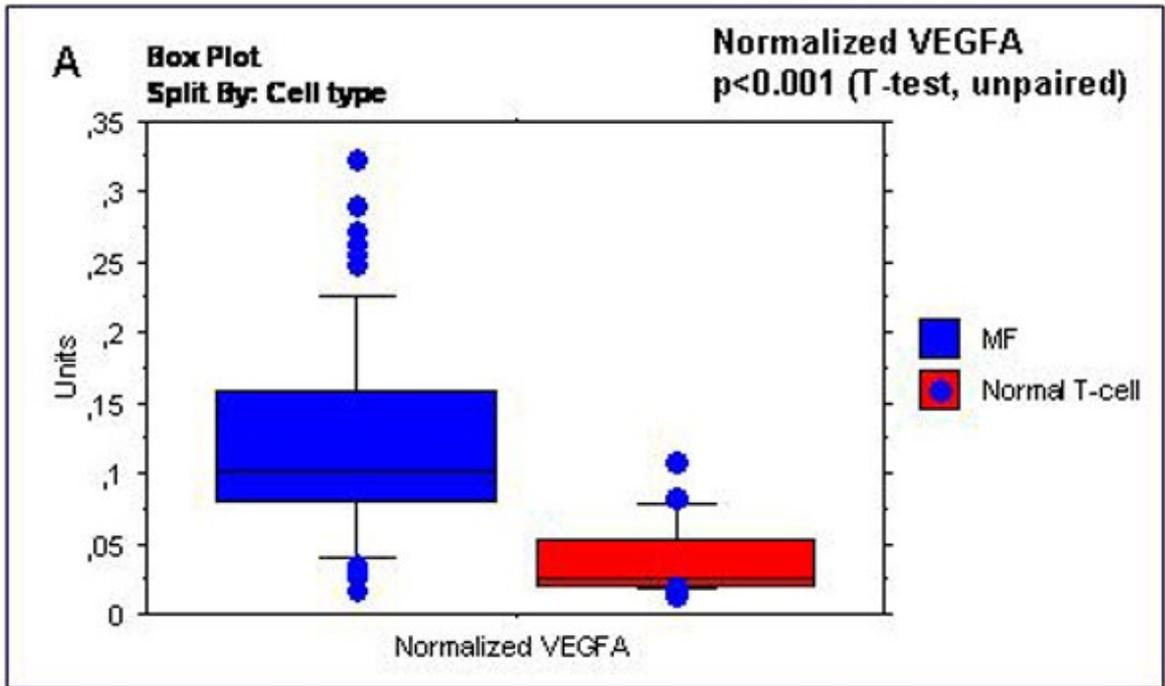


Figura 3

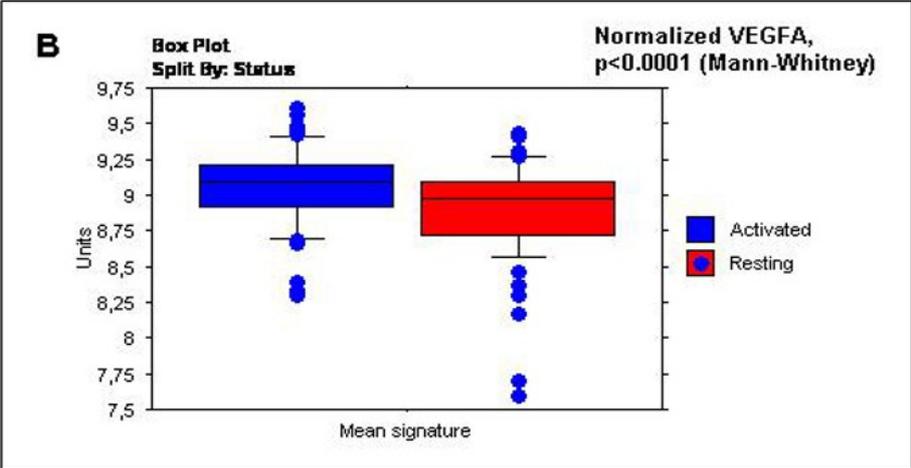
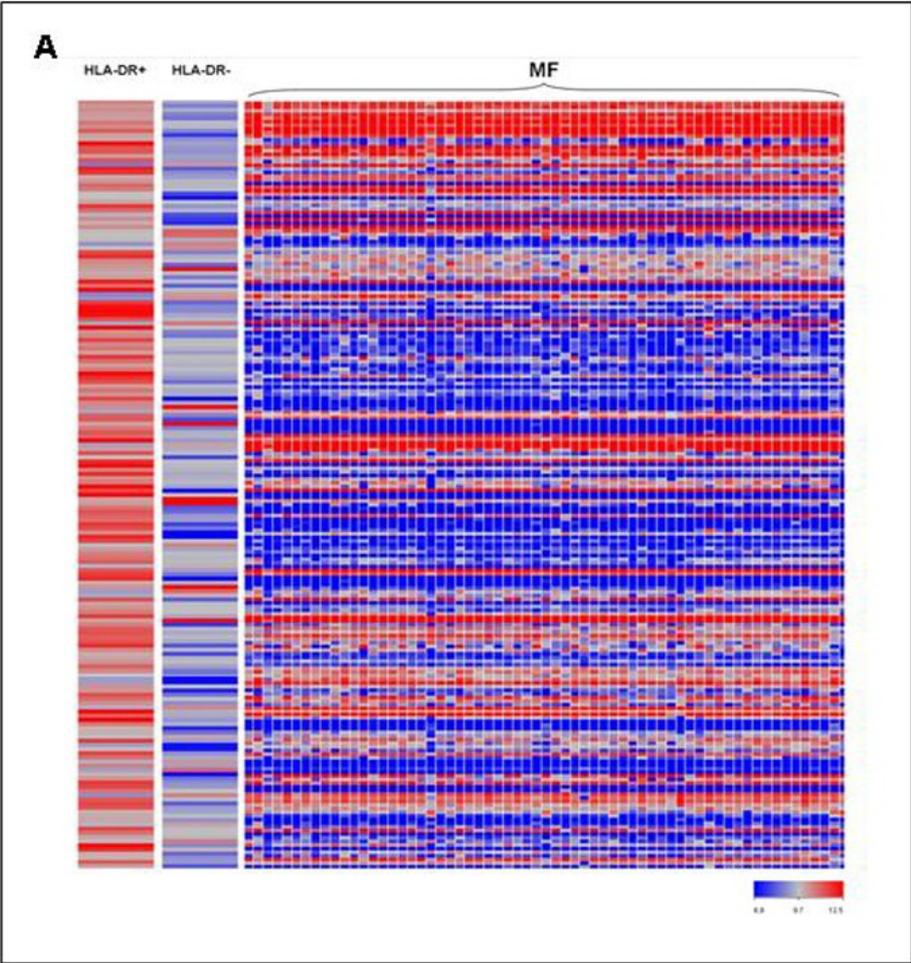


Figura 4

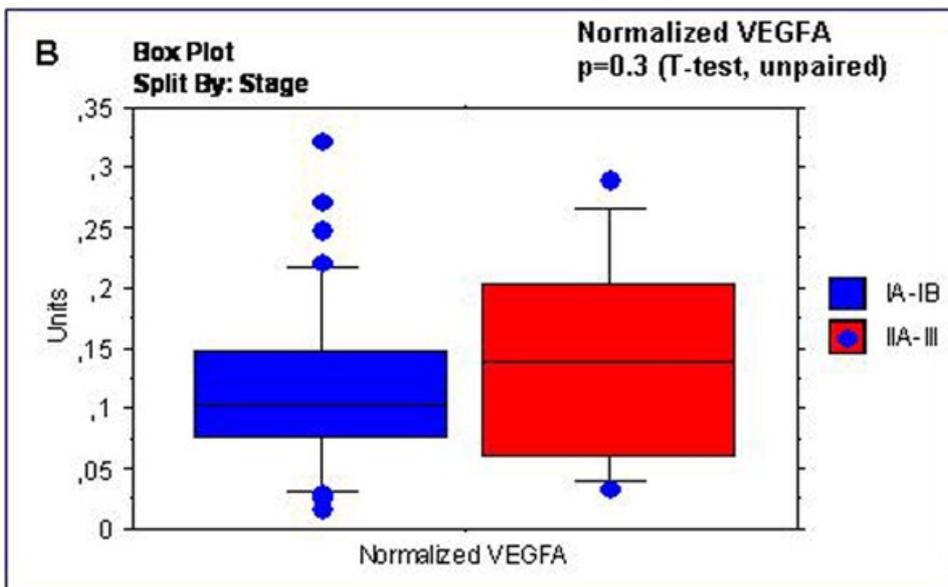
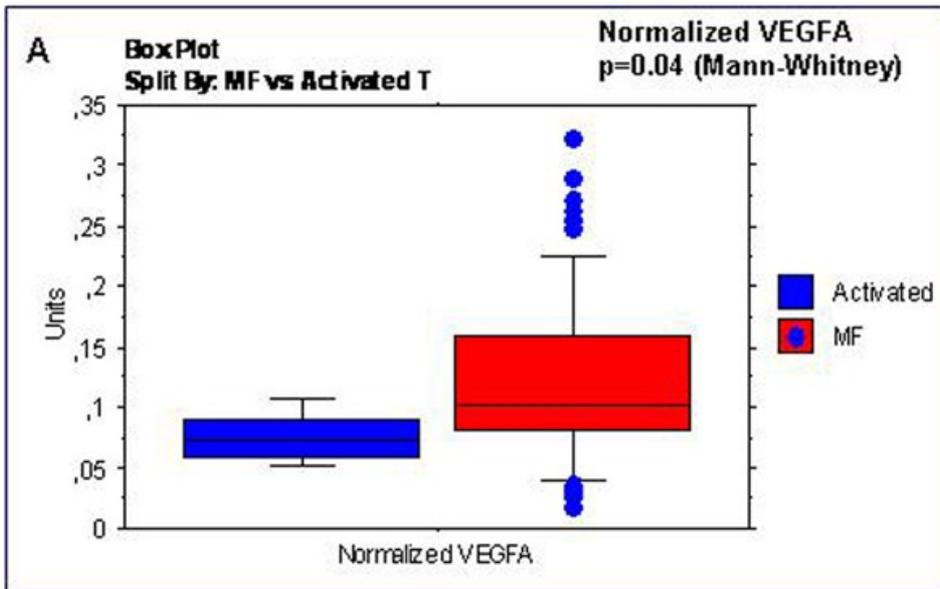
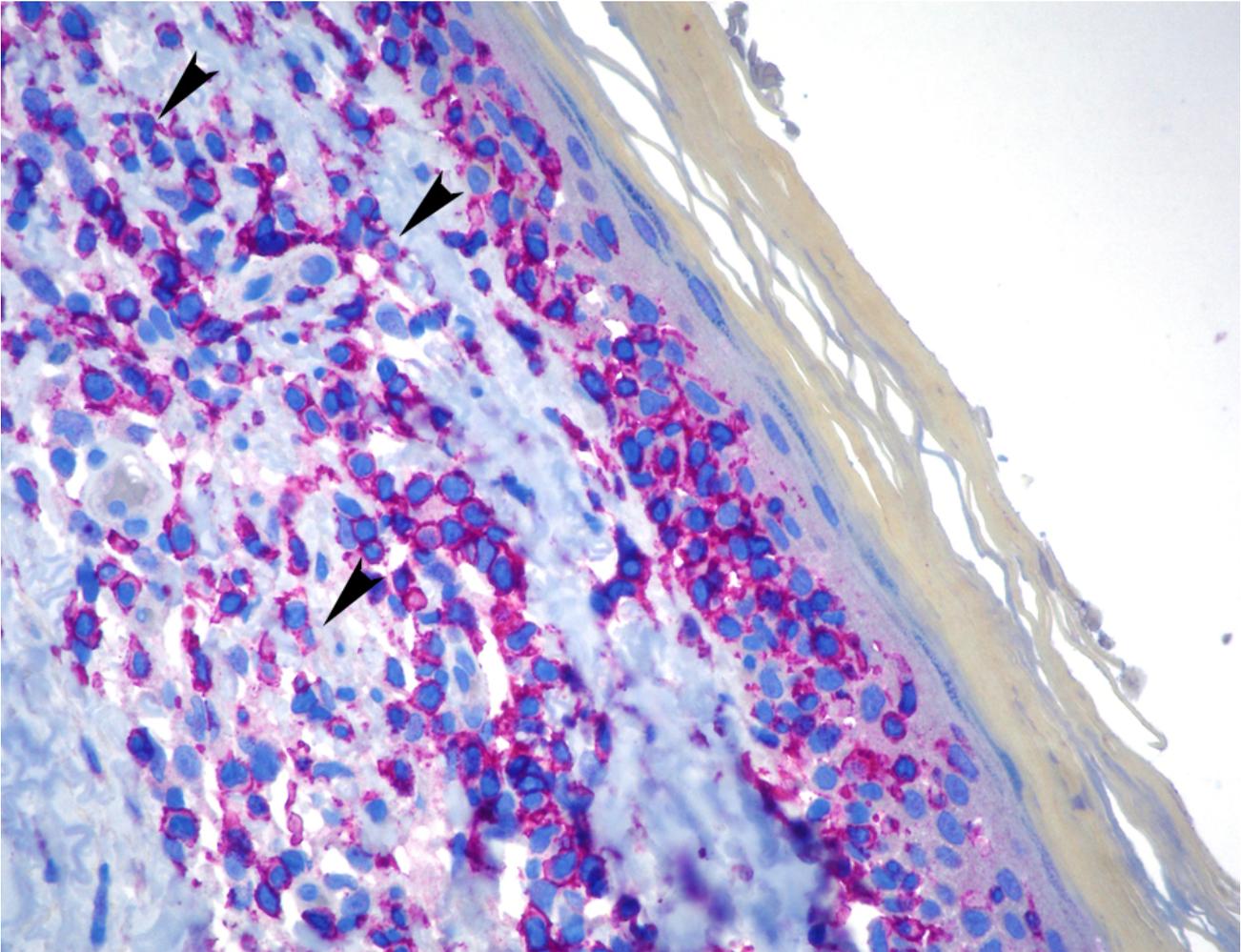


Figura 5



Legenda delle figure

Figura 1. Caratteristiche istopatologiche.

- A) Vista a piccolo ingrandimento di una chiazza di MF in un paziente in stadio IB. Nell'inserito, a maggiore ingrandimento un micro-ascesso di Pautrier (ematossilina ed eosina; Olympus BX51 microscopio; Olympus UPlanFI 10x/0.30 and 60x/0.9 come obiettivi; Olympus C7070WZ camera digitale; Adobe Photoshop CS2 programma di manipolazione delle immagini).
- B) Infiltrato neoplastico costituito principalmente da blasti in un paziente in stadio III (ematossilina ed eosina; Olympus BX51 microscopio; Olympus UPlanFI 40x/0.75 come obiettivo; Olympus C7070WZ camera digitale; Adobe Photoshop CS2 programma di manipolazione delle immagini).

Figura 2. Espressione del gene *VEGF* nella micosi fungoide e nei linfociti T normali. I diagrammi rappresentano i valori di *VEGFA* nelle popolazioni prese in esame. Sull'asse delle y è rappresentata l'espressione normalizzata di *VEGFA*. Sono stati utilizzati lo Student T-test od il Mann-Whitney per le comparazioni.

Figura 3. Correlazione fra la MF e le diverse sottopopolazioni T normali.

- A) L'espressione dei geni differentemente regolati nei linfociti T attivati e "resting" è stata applicata ai campioni di MF. Il dendrogramma è stato generato con un algoritmo di clustering gerarchico, basato sul metodo *average-linkage*. A livello della matrice ciascuna colonna rappresenta un campione e ciascuna riga rappresenta un gene. La barra della scala dei colori mostra le relative variazioni di espressione genica normalizzate per la deviazione standard. (0 è il livello medio di espressione attribuito a ciascun gene).
- B) Nel diagramma, l'espressione media della firma dei linfociti T "resting" ed attivati è stata misurata, sui campioni di MF. Per ogni campione, è stata calcolata la media di espressione

di tutti i geni della firma. La media fra tutti i campioni è stata quindi ottenuta per entrambe le firme. Sull'asse delle Y sono rappresentati in unità i valori medi di espressione. Per la comparazione è stato usato il T-test.

Figure 4. Espressione del gene per *VEGF* nella MF e nei linfociti T normali. I diagrammi rappresentano i livelli di *VEGFA* nelle differenti popolazioni (A: MF vs. linfociti T attivati; B: stadio I-IIA vs. stadio IIB-III MF). Sull'asse delle Y è rappresentato il valore normalizzato di espressione di *VEGFA*. Sono stati usati per la comparazione Student T-test oppure Mann-Whitney test.

Figure 5. Espressione di VEGF in immunistoichimica: le frecce alcuni linfociti T reattivi i quali mostrano un'intensità di colorazione nettamente inferiore rispetto alle cellule neoplastiche (APAAP technique; contro colorazione di Gill, ematossilina ed eosina; Olympus BX51 microscopio; Olympus UPlanFI 40x/0.75 obbiettivo; Olympus C7070WZ camera digitale; Adobe Photoshop CS2 programma di manipolazione delle immagini).