

INDICE

Introduzione	1
---------------------	---

Parte Prima

Capitolo 1.

La neoangiogenesi

1.1 Introduzione	3
1.1.1 Vasculogenesi	3
1.1.2 Angiogenesi	4
1.1.3 Angiogenesi e neoplasie	5
1.2 Meccanismi angiogenetici	6
1.2.1 Degradazione enzimatica della membrana basale	8
1.2.2 Migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali: fattori angiogenici	9
1.2.3 Adesione cellulare ed interazione con la matrice extracellulare: le molecole d'adesione	13

Capitolo 2

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

2.1 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)16
2.1.1 <i>Effetti Biologici del VEGF</i>	17
2.1.2 <i>Gene e struttura proteica del VEGF</i>	19
2.1.3 <i>Regolazione dell'espressione genica del VEGF</i>	20
2.1.4 <i>Isoforme del VEGF</i>23
2.1.5 <i>Proteine VEGF correlate</i>26
2.2 Recettori del VEGF27
2.2.1 <i>VEGFR-1</i>28
2.2.2 <i>VEGFR-2</i>	.30
2.2.3 <i>NEUROPILINE-1</i>32
2.2.4 <i>Eparina e Protoglicano Eparan-solfato</i>33
2.3 <i>VEGF canino</i>34

Capitolo 3

Le Metalloproteinasi

3.1 Metalloproteinasi di matrice36
3.1.1 La superfamiglia delle Metzincine37
3.1.2 Regolazione dell'attività delle MMPs41
3.1.2.1 Regolazione dell'espressione delle MMPs.....41
3.1.3 Attivazione delle MMPs latenti42
3.2 Inibitori Endogeni delle MMPs43
3.3 I substrati delle MMPs44

Capitolo 4.

Neoangiogenesi e clinica oncologica

4.1 Introduzione	45
4.2 Neoangiogenesi e tumori solidi	46
4.2.1 Considerazioni retrospettive relative al ruolo diagnostico e prognostico del VEGF nei tumori solidi	46
4.2.2 Considerazioni retrospettive relative al ruolo diagnostico e prognostico delle Gelatinasi nei tumori solidi50
4.3 Neoangiogenesi e neoplasie emoproliferative	52
4.3.1 Le neoplasie emoproliferative	52
4.3.2 Considerazioni retrospettive relative al ruolo diagnostico e prognostico del VEGF e delle gelatinasi nelle neoplasie emopoietiche53
4.3.2.1 VEGF53
4.3.2.2 Gelatinasi (MMP -2, -9)56

Capitolo 5

.Campionamento e misurazione del VEGF circolante

5.1 Introduzione	58
5.2 Raccolta del campione	58

Capitolo 6.

CRP ed LDH: stato dell'arte nella clinica oncologica veterinaria

6.1 Introduzione62
6.2 Proteina C Reattiva e Linfoma Canino64
6.3 Lattato Deidrogenasi (LDH) e Linfoma canino65

Parte Seconda: Sperimentazione

Capitolo 7.

Materiali e metodi

7.1 Introduzione	68
7.2 Contributo casistica, descrizione del campione	69
7.3 Principali Metodiche utilizzate63
7.4 Analisi statistica	78

Capitolo 8.

Risultati

8.1 Introduzione	80
8.2 Distribuzione della concentrazione di VEGF nella popolazione studiata	80
8.3 Distribuzione dell'attività gelatinolitica nella popolazione studiata	81
8.4 Distribuzione della concentrazione di emoglobina nella popolazione studiata	84
8.5 Distribuzione della concentrazione di proteina C reattiva nella popolazione in esame	84
8.6 Distribuzione della concentrazione di LDH nella popolazione in esame	85
8.7 Correlazione fra i parametri valutati e sottostadio clinico della patologia	87
8.8 Correlazione fra parametri valutati e intervallo libero da malattia (DFI)	92

Capitolo 9

Discussione e conclusioni

	98
9.1 Premessa	98
9.2 VEGF	99
9.3 MMP-2 e 9	101
9.4 CRP	102
9.5 LDH e Emoglobina	103
9.6 Conclusioni	104

Bibliografia

INTRODUZIONE

La neoangiogenesi costituisce un evento fondamentale nello sviluppo e nella diffusione di una neoplasia. Fra i molteplici fattori implicati e nonostante la crescente importanza acquisita negli ultimi anni da altre molecole pro-angiogeniche, il **Vascular Endothelium Growth Factor** e le Gelatinasi (Metallo Proteinasi di Matrice 2 e 9, MMP2 e 9) sembrano costituire ancora il punto critico e limitante del processo angiogenico, presentando una notevole importanza quali fattori diagnostici, prognostici e quali target terapeutici in molte patologie neoplastiche.

Mentre tutto ciò risulta ampiamente documentato e chiarito per quel che riguarda i tumori solidi, sono ancora molte le ipotesi sull'effettivo ruolo dei fattori neoangiogenici nel contesto delle neoplasie emolinfoproliferative. In Medicina Veterinaria, allo stato dell'arte, sono ancora frammentarie le acquisizioni riguardanti l'importanza di questi fattori di crescita in corso di neoplasie linfoproliferative e numerosi sono i dubbi sulla loro importanza diagnostica e prognostica. Poiché il linfoma rappresenta la neoplasia dei tessuti ematopoietici più frequente nei mammiferi domestici, ed in particolare nella specie canina, scopo di questa sperimentazione è stato valutare l'eventuale corrispondenza fra le concentrazioni sieriche di VEGF e MMP2 e 9, unitamente ad altri possibili indici predittivi in uso nella classificazione del paziente neoplastico, al fine di individuare il valore prognostico di tali fattori. Concentrazione sierica di VEGF, attività plasmatica di MMP 2 e 9, concentrazione emoglobinica ematica ed ancora, concentrazione sierica di proteina c reattiva e lattato deidrogenasi, sono state valutate all'ammissione, in un campione di cani affetti da linfoma non Hodgkin e comparate con l'intervallo libero da malattia al fine di indagare il loro ruolo prognostico. Il presente lavoro è stato suddiviso in due parti. La prima ha preso in considerazione i meccanismi implicati nella

regolazione del processo angiogenico (con particolare riferimento al ruolo del VEGF e delle MMPs) e le acquisizioni della clinica oncologica riguardo tale argomento. La seconda parte, comprende la valutazione del contributo casistico e delle metodiche sperimentali utilizzate. Infine, i risultati così ottenuti sono stati confrontati con i dati riportati nella più recente bibliografia inerente all'argomento trattato.

CAPITOLO UNO

LA NEOANGIOGENESI

1.1 INTRODUZIONE

La genesi di un vaso sanguigno è un processo biologico complesso, caratterizzato dall'interazione di molteplici vie metaboliche. È opportuno innanzitutto sottolineare la distinzione fra **vasculogenesi** ed **angiogenesi**. Questi termini, pur etimologicamente identici, esprimono da un punto di vista biologico due processi completamente differenti.

1.1.1 VASCULOGENESI

“La vasculogenesi è un processo tipico dello sviluppo embrionale e fetale. Con questo termine s'intende esclusivamente la formazione *ex novo* di vasi sanguigni dal mesoderma” (Drake, 2003).

Indispensabile ad ogni vita organizzata, l'apparecchio circolatorio compare molto precocemente nel periodo pre-embriale della vita. Esso deriva totalmente dal mesoderma, nel quale i primi abbozzi sono costituiti da piccoli ammassi cellulari solidi, le isole sanguigne. Sviluppatesi inizialmente alla periferia dell'area embrionale, le isole si allungano rapidamente in cordoni, mentre le loro cellule si differenziano. Le cellule superficiali si appiattiscono e si distendono per formare l'endotelio, abbozzo della parete vascolare; le altre si dissociano, fluttuano in un liquido (plasma primitivo), e costituiscono i precursori delle cellule sanguigne. Questi microvasi embrionali si anastomizzano in una rete capillare primitiva che gradualmente si estende. Questo sistema

vascolare primordiale è in grado di adattarsi a tutte le necessità, dapprima dell'embrione, poi del feto, ed infine dell'organismo in sviluppo e dell'adulto (Baron, 1993).

1.1.2 ANGIOGENESI

Il termine *angiogenesi* fu introdotto per la prima volta da Herting nel 1935 per descrivere il processo di vascolarizzazione che avviene a livello placentare. Per angiogenesi s'intende "la formazione di nuovi vasi sanguigni attraverso cellule endoteliali in partenza da un letto vascolare pre-esistente" (Josco, 2000).

L'angiogenesi è un fenomeno complesso, caratterizzato da una cascata di eventi strettamente regolati da fattori pro- ed anti-angiogenici. Importante elemento di molti processi fisiologici e patologici, la neo-angiogenesi si realizza in concomitanza alla vasculogenesi durante lo sviluppo embrionale e fetale. Nell'adulto sano è un fenomeno che avviene tipicamente a livello dell'apparato riproduttivo femminile, nel processo di rigenerazione della mucosa uterina durante il ciclo mestruale, nello sviluppo placentare e nella formazione dell'osso endocondrale, mentre come meccanismo parafisiologico si può osservare durante la riparazione dei tessuti e la guarigione delle ferite (Salven, 2001; Ferrara, 2001).

In queste circostanze il meccanismo angiogenico è strettamente controllato e permane attivo per periodi piuttosto brevi; esistono tuttavia condizioni in cui il delicato equilibrio fra fattori pro- ed anti-angiogenici risulta compromesso, ed in cui si realizza una persistente ed incontrollata crescita vasale. Queste condizioni includono comunemente patologie cardiovascolari (arteriosclerosi), stati infiammatori cronici (artrite reumatoide, malattia infiammatoria intestinale), diabete (retinopatia diabetica), patologie infiammatorie ed iperproliferative della cute quali la psoriasi, endometriosi e neoplasie (Salven, 2001).

1.1.3 ANGIOGENESI E NEOPLASIE

Lo studio della capacità di un tessuto neoplastico di indurre la formazione di una nuova rete vasale è stato uno dei principali obiettivi della ricerca scientifica nell'ultimo decennio. La comprensione di questo meccanismo ha permesso in medicina umana di affiancare alla chemioterapia "standard" nuove terapie, finalizzate all'inibizione della crescita tumorale ed al trattamento sia della neoplasia primaria, sia dell'eventuale diffusione metastatica. **L'angiogenesi tumorale è un processo di formazione di un *network* vasale all'interno di un tessuto neoplastico ed in partenza dallo stesso.** I tumori solidi sono strettamente dipendenti dalla formazione di nuovi vasi: "un tessuto neoplastico senza un letto vascolare non può crescere oltre il diametro di 1-2 mm" (Folkman 1990).

Nella fase pre-vascolare il tessuto neoplastico raramente supera i 2 mm di dimensione (es.: carcinoma *in situ*); in questo stadio le cellule possono ottenere l'ossigeno ed i nutrienti necessari alla sopravvivenza ed alla crescita, ed eliminare i cataboliti prodotti attraverso un processo di semplice diffusione passiva (Gupta, 2003).

Oltre questa estensione, tale meccanismo trofico non è sufficiente a garantire la crescita tumorale, inoltre, lo stato di ipossia che si instaura, conduce tramite attivazione della p53, all'apoptosi (Cotran, Kumar e Collins, 1999). In questa fase invece, una neoplasia può mantenersi quiescente a lungo, raggiungendo un equilibrio fra il numero di cellule che replicano e quelle che muoiono, fino a quando in alcune cellule non si realizza l'acquisizione di un **fenotipo angiogenico** (List, 2001).

Lo ***switch* angiogenico** è un fenomeno causato da un rimaneggiamento dell'espressione genica, responsabile dell'alterazione dell'equilibrio fra i fattori stimolanti ed inibenti l'angiogenesi. L'acquisizione di tale fenotipo da parte di alcune cellule tumorali consente la formazione di un adeguata trama vascolare e la crescita esponenziale della neoplasia.

Oltre ad essere un processo essenziale per la crescita della massa primitiva, l'angiogenesi ha una speciale importanza nel permettere la diffusione metastatica. I nuovi vasi, infatti, presentando una parete sottile con scarso sviluppo della membrana basale, risultano facilmente attraversabili dalle cellule neoplastiche e, perciò, rappresentano una vantaggiosa via d'accesso al circolo (Galeotti, 1997).

Ulteriore effetto dell'angiogenesi nell'ambito neoplastico è rappresentato dalla stimolazione, da parte delle nuove cellule endoteliali, della crescita di cellule tumorali contigue. Questa si realizza attraverso la produzione locale di alcuni polipeptidi quali: Insulin-like Growth Factor (IGF-1), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Interleuchina-1 (IL-1), e Granulocyte-Monocyte-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) (Cotran, Kumar e Collins, 1999).

Non bisogna dimenticare, infine, che l'attività di angiogenesi espletata dalle cellule tumorali è potenziata dalla produzione e dall'attivazione di fattori angiogenici presenti in cellule non neoplastiche dello stroma tumorale (*mastzellen*, macrofagi attivati, linfociti T) (Galeotti, 1997).

1.2 MECCANISMI ANGIOGENICI

La neoangiogenesi si realizza attraverso una complessa interazione fra **cellule endoteliali, fattori solubili, e componenti della matrice extracellulare** (Gupta, 2003).

Recentemente è stata inoltre evidenziata l'importanza nei meccanismi angiogenici, di precursori delle cellule endoteliali e di cellule ematopoietiche di provenienza midollare, la cui liberazione sembra secondaria a stimoli ischemico-tissutali e citochinici (Beerepoot, 2004).

In risposta ai fattori angiogenici espressi dalle cellule neoplastiche, le cellule endoteliali subiscono modificazioni morfologiche rappresentate essenzialmente da un aumento quantitativo di alcuni componenti citoplasmatici quali il reticolo endoplasmatico, l'apparato del Golgi ed i

mitocondri. La membrana basale dei capillari e la matrice extracellulare sono degradate ad opera di enzimi proteolitici e, contemporaneamente, si osserva la replicazione di nuove cellule endoteliali e la loro migrazione. Questi fenomeni conducono alla formazione di spazi inter- ed extra-cellulari, attorno ai quali le cellule endoteliali si dispongono in strutture tubulari. Infine, i vasi così formati sono stabilizzati da molecole d'adesione e sostenuti grazie al reclutamento di periciti, cellule muscolari lisce e fibroblasti (Josko, 2000).

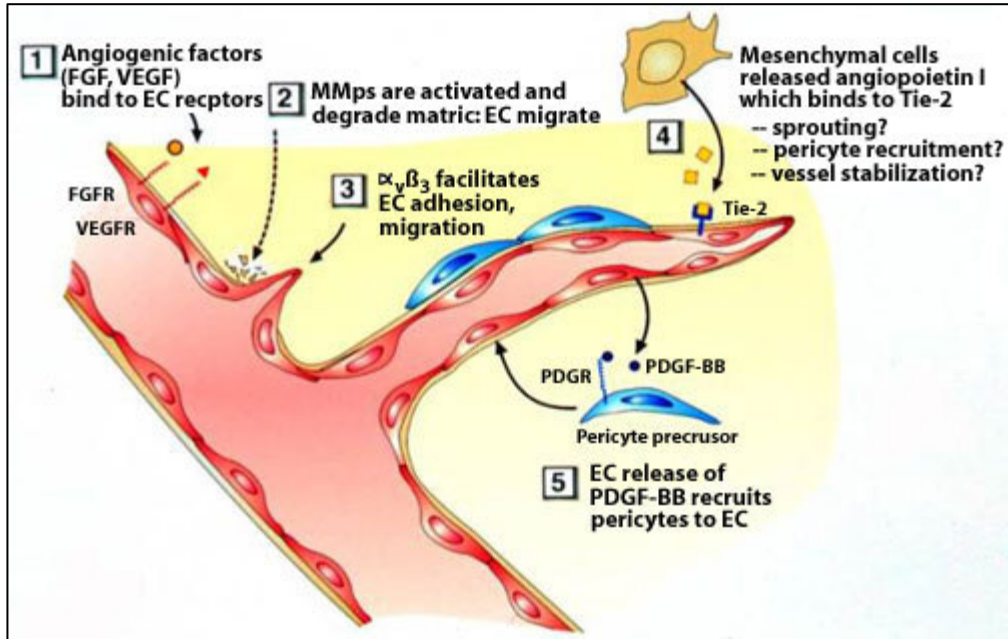


Figura 1. Meccanismi dell'angiogenesi fisiologica (adattata da Papetti ed Herman, 2002).

1.2.1 DEGRADAZIONE ENZIMATICA DELLA MEMBRANA BASALE: ENZIMI PROTEOLITICI

Tutti i tessuti sono organizzati in compartimenti separati uno dall'altro dalla **matrice extracellulare** (ECM). Dal punto di vista strutturale, tale matrice è costituita da tessuto **connettivo lasso interstiziale** in continuità con le **membrane basali**. Mentre queste ultime sono formate da un fine intreccio di collagene di tipo IV e V e da specifiche glicoproteine (es.: laminina e proteoglicano eparan-solfato), nel connettivo lasso interstiziale, prevalgono vari tipi di collagene cosiddetto fibrillare (tipo I, II e III), proteoglicani e glicoproteine come la fibronectina (Galeotti, 1997).

Come precedentemente riportato, l'attiva degradazione enzimatica della membrana basale sottostante, rappresenta il primo passo che le cellule endoteliali devono compiere per dare il via alla formazione di una nuova rete di capillari. Questo processo si avvale essenzialmente di due meccanismi: l'attivazione delle **metalloproteinasi di matrice (MMPs)** e quella del **sistema attivatore del plasminogeno (tPA)**.

Le metalloproteinasi costituiscono una vasta famiglia di enzimi proteolitici e rappresentano i modulatori chiave di diversi processi biologici, sia parafisiologici che patologici (processi degenerativi, infiammatori e neoplastici). Nell'uomo sono state identificate circa 22 MMPs in grado di degradare diverse componenti della ECM, ma anche recettori cellulari e citochine.

In particolare, le gelatinasi (MMP-2 e 9), grazie alla loro specifica attività proteolitica nei confronti del collagene di tipo IV, rivestono un ruolo fondamentale nei meccanismi angiogenici e come tali verranno trattate dettagliatamente nei prossimi capitoli.

Il **tissue-type Plasminogen Activator (tPA)** e l'**urokinase-type Plasminogen Activator (uPA)** sono due serinproteasi responsabili della conversione del plasminogeno in plasmina. Nello specifico, mentre l'attivazione del plasminogeno a livello ematico avviene per opera del

tPA, nei tessuti l'attività fibrinolitica è essenzialmente regolata dall'uPA. L'interazione di uPA con il proprio recettore (uPAR), una proteina transmembrana presente su diversi tipi cellulari, stimola la trasduzione del segnale all'interno delle cellule con conseguente degradazione di molteplici substrati: fibrina, fibronectina, laminina ed alterazione del core proteico dei proteoglicani. Inoltre, la plasmina, così attivata, è ritenuta in grado di innescare alcune MMPs quali MMP-1, MMP-3, MMP-9, con conseguente amplificazione dell'effetto proteolitico.

In sintesi, nell'ambito dell'angiogenesi, la regolazione della degradazione della matrice extracellulare sembra avvenire attraverso tre meccanismi complementari (Liekens et al., 2001):

- sovra-espressione di pro-enzimi ad opera di fattori di crescita angiogenica e citochine;
- attivazione proteolitica di pro-MMPs e pro-uPA;
- contemporanea secrezione di inibitori: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP), e Plasminogen Activator Inhibitor (PAI).

1.2.2 MIGRAZIONE E PROLIFERAZIONE DELLE CELLULE ENDOTELIALI: I FATTORI ANGIOGENICI

Grazie alla degradazione della membrana basale sottostante ed al raggiungimento di un certo grado di permeabilità vasale, le cellule endoteliali iniziano la loro migrazione. Come riportato in precedenza, il mantenimento dell'omeostasi vasale è reso possibile dalla continua interazione di fattori stimolanti ed inibenti l'angiogenesi in equilibrio fra loro (Josko, 2000). In condizioni normali, le cellule endoteliali presentano un turnover di circa 1000 giorni, ma, in particolari situazioni (sia parafisiologiche che patologiche), possono andare incontro ad una rapida replicazione con un turnover anche di soli 5 giorni. In queste

condizioni si verifica una temporanea alterazione dell'equilibrio fra i fattori di controllo, caratterizzata dal prevalere delle molecole pro-angiogeniche (Folkman e Shing, 1992). Queste molecole costituiscono un gruppo numeroso ed eterogeneo ma possono essere suddivise fondamentalmente in tre classi (Liekens et al., 2001):

- fattori che agiscono specificamente sulle cellule endoteliali (es.: famiglia del **VEGF** o Angiopoietine);
- molecole che operano con un meccanismo diretto prevalentemente su altre popolazioni cellulari (citochine, chemiochine ed enzimi angiogenici);
- sostanze che agiscono indirettamente mediando il rilascio di altri fattori proangiogenici da macrofagi, cellule endoteliali, cellule infiammatorie o neoplastiche (es.: TNF e TGF).

Oltre ai fattori pro-angiogeneci propriamente secreti dalle cellule, non bisognerebbe tralasciare le numerose proteine di membrana ed i meccanismi biomeccanici, che, agendo sull'endotelio, contribuiscono ai processi di rimodellamento caratteristici dell'angiogenesi (Papetti ed Herman, 2001).

Con l'eccezione del Vascular Endothelil Growth Factor, che sarà approfondito nel capitolo seguente, i fattori pro-angiogenici e le loro caratteristiche sono sinteticamente descritti nella tabella seguente.

FATTORI	AZIONE BIOLOGICA
Mediatori solubili	
VEGF	Aumento della permeabilità delle ECs Stimolazione della proliferazione delle ECs Amplificazione della migrazione delle ECs Stimolazione della proliferazione delle ECs Stimolazione della produzione di uPA/uPAI-1 nelle ECs Stimolazione dell'angiogenesi in vivo
ANG1	Stimolazione della gemmazione di ECs in vitro Aumento della stabilità e della circonferenza dell'endotelio
ANG2	Antagonizzazione del segnale mediato dall'ANG1/ destabilizzazione endotelio
aFGF, bFGF	Stimolazione della proliferazione delle ECs Amplificazione della migrazione delle ECs Stimolazione della produzione di PA/collagenasi nelle ECs Stimolazione della formazione della struttura vasale Stimolazione dell'angiogenesi in vivo
PDGF	Stimolazione della sintesi del DNA nelle ECs Stimolazione delle ECs a costituire strutture cordoniformi in vitro Stimolazione della proliferazione di cell.muscolari lisce e di periciti Induzione dell'espressione di VEGF e VEGFR-2 nelle ECs cardiache Aumento della stabilità della parete dei capillari
TGF-β	Sostegno della crescita dei fibroblasti Inibizione proliferazione/migrazione delle Ecs Stimolazione/Inibizione formazione delle strutture vasali tubulari in vitro Modulazione dell'espressione di uPA/PAI-1 Inibizione della produzione di altre proteasi/Stimolazione della produzione di inibitori delle proteasi Segnale chemiotattico per monociti e fibroblasti Stimolazione dell'angiogenesi in vivo in presenza di una risposta infiammatoria Aumento della stabilità della parete vasale
TNF-α	Stimolazione dell'angiogenesi in vivo Stimolazione della formazione delle strutture vasali tubulari in vitro Inibizione proliferazione delle Ecs
EGF, TGF-α	Stimolazione dell'angiogenesi in vivo Stimolazione della proliferazione delle ECs
G-CSF, GM-CSF	Stimolazione della proliferazione e della migrazione delle ECs
Angiogenina	Stimolazione dell'angiogenesi in vivo Sostegno dell'adesione fra ECs e della loro gemmazione.
Angiotropina	Stimolazione della migrazione casuale delle ECs Stimolazione della formazione di strutture tubulari Stimolazione dell'angiogenesi in vivo

Fattore Tissutale	Stimolazione della maturazione della trama vasale del sacco vitellino
Fattore V	Stimolazione della maturazione della trama vasale del sacco vitellino
Prostaglandina	Stimolazione dell'angiogenesi in vivo
Nicotinamide	Stimolazione dell'angiogenesi in vivo
Monobutirina	Stimolazione dell'angiogenesi in vivo Stimolazione della migrazione delle ECs in vitro
Proteine di membrana	
$\alpha_v\beta_3$ - Integrine	Altamente espresse sulla superficie delle ECs attivate Mediatrici dell'adesione, gemmazione e migrazione delle ECs Richieste per i meccanismi angiogenici mediati da FGF Inibizione del segnale apoptotici nelle ECs
$\alpha_v\beta_5$ - Integrine	Necessarie nei meccanismi angiogenici VEGF-mediati
$\alpha_5\beta_1$ - Integrine	Necessarie nei meccanismi angiogenici non VEGF-mediati
VE-caderine	Possibile mediazione della permeabilità endoteliale Richieste per l'espletamento dell'angiogenesi in vivo Prevenzione del segnale apoptotici nelle ECs
Eph-4b, Ephrin-B2	Colonizzazione dell'interfaccia arteria/vena nell'ambito dello sviluppo embrionale Richieste nei meccanismi angiogenici di testa e sacco vitellino
Ephrin-A1	Necessario per l'angiogenesi indotta dal TNF- α IN VIVO Azione chemiotattica sulle ECs in vivo
Eph-2°	Necessaria per la formazione della struttura tubulare in vitro
Fattori Biomeccanici	
Flusso ematico, Stress da taglio	(se laminare) Aumento della formazione delle fibre (se turbolento) Promozione della divisione cellulare Stimolazione della trascrizione dei geni di b-FGF e di TGF- α

Tabella 1. Sintesi dei fattori implicati nell'angiogenesi fisiologica e delle loro attività biologiche (tratta da Papetti ed Herman, 2002).

1.2.3 ADESIONE CELLULARE ED INTERAZIONE CON LA MATRICE EXTRACELLULARE: LE MOLECOLE D'ADESIONE

Durante e dopo la fase di replicazione e migrazione, le cellule endoteliali non necessitano solo dell'azione dei fattori di crescita e dei loro recettori, ma dipendono strettamente dalla presenza di cosiddette molecole d'adesione (Liekens et al., 2001).

I meccanismi d'adesione fra cellule possono essere giunzionali o non giunzionali. Le giunzioni sono strutture di specializzazione della membrana plasmatica e sono suddivisibili in tre categorie:

- desmosomi e giunzioni aderenti;
- giunzioni strette (attraverso le quali è impedito il passaggio di molecole extracellulari);
- giunzioni discontinue e sinapsi chimiche (implicate nella comunicazione intercellulare).

L'adesione non giunzionale è invece caratterizzata da modificazioni dello strato esterno della membrana (rimozione di cariche negative o digestione parziale del glicocalice) o ancora dall'intervento di molecole d'adesione che ancorano le membrane cellulari contigue. Negli ultimi anni sono stati identificati numerosi recettori glicoproteici di transmembrana. Riconosciamo molecole d'adesione cellulare (Cellular Adhesion Molecules o CAMs) e molecole d'adesione di substrato (Substrate Adhesion Molecules o SAMs) le quali, complessivamente, sono indicate con il nome di molecole d'adesione di superficie o **citoadesine** (Marcato, 1997).

Le principali famiglie in cui si raggruppano le molecole d'adesione sono quattro:

- selectine (la famiglia delle selectine consiste in tre glicoproteine: "E" endoteliali, "P" piastriniche ed "L" leucocitarie);

- caderine;
- superfamiglia delle immunoglobuline;
- integrine.

“I Membri di ognuna di queste famiglie prendono parte al processo di neovascolarizzazione” (Liekens et al., 2001).

Le **integrine** sono molecole proteiche costituite da eterodimeri formati da **catene α e β** legate tramite legame non covalente. La maggior parte delle integrine conosciute funziona come recettore per le proteine della matrice extracellulare. Un'altra importante funzione di queste molecole è rappresentata dalla loro partecipazione alla trasduzione di segnale che trasporta all'interno della cellula l'informazione sulla struttura della matrice. In particolare, riveste importanza nella biologia della neoangiogenesi e nei processi neoplastici, la regolazione, mediata da integrine, degli enzimi cellulari che degradano il connettivo interstiziale e i componenti della membrana basale. Da qui l'importanza di questa classe di molecole d'adesione, non solo durante la fase terminale del processo neoangiogenico (formazione vera e propria della struttura vasale), ma anche nella fase di moltiplicazione e migrazione delle cellule endoteliali. Le cellule endoteliali sono in grado di esprimere molteplici combinazioni eterodimeriche delle subunità α e β e queste combinazioni determinano la specificità dell'adesione con i componenti della matrice extracellulare. Ruolo predominante nell'angiogenesi sembra quello dell'integrina $\alpha_v\beta_3$. Questa molecola d'adesione (non rilevata nell'endotelio quiescente, ma abbondantemente espressa in seguito alla liberazione di citochine e nell'ambito della neoangiogenesi di origine tumorale) costituisce un recettore in grado di legare numerose proteine tra le quali possiamo includere: fibronectina, vitronectina, fibrinogeno, laminina ed anche il fattore di von Willebrand (molecole esponenti la specifica sequenza aminoacidica Arg-Gly-Asp). Inoltre, questa integrina sembrerebbe capace di legare ed attivare la MMP-2 e di

reprimere l'attività della p53, con conseguenti effetti proteolitici ed anti-apoptotici (Marcato, 1997; Liekens et al., 2001).

Un ulteriore recettore coinvolto in questo processo è rappresentato dall'integrina $\alpha_v\beta_5$. Recenti ricerche hanno dimostrato che l'utilizzo di un anticorpo diretto contro questa molecola è in grado di inibire l'azione angiogenica del VEGF, mentre anticorpi diretti contro la $\alpha_v\beta_3$ possono specificatamente inibire l'angiogenesi indotta da FGF-2 o TNF- α .

Ciò permette di dedurre come, distinte citochine possano stimolare la neoangiogenesi attraverso differenti vie di trasduzione del segnale, mediate a loro volta da integrine specifiche (Liekens et al., 2001).

Oltre alle integrine devono essere ricordate altre molecole d'adesione. Le **caderine** dell'endotelio vascolare (VE-caderine) regolano le interazioni intercellulari calcio-mediate e una loro deficienza si rende responsabile di letalità embrionale (Liekens et al., 2001).

Molecole d'adesione intercellulare-1 (ICAM-1), e **molecole d'adesione delle cellule vascolari-1 (VCAM-1)**, appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline, sono normalmente espresse dall'endotelio quiescente, ma risultano notevolmente aumentate in seguito a stimolazione di TNF, IL-1, IFN- γ . Infine, molecole quali **la P-selectina** e la **E-selectina**, normalmente espresse dalle cellule endoteliali e fondamentali nel reclutamento dei leucociti circolanti, sono state recentemente rivalutate proprio in merito ad una loro possibile attività neoangiogenica (Marcato, 1997; Liekens et al., 2001).

CAPITOLO DUE

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)

2.1 VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)

Fra tutti i fattori che regolano la genesi di un nuovo vaso, il **Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)** rappresenta quello ad oggi più studiato e maggiormente caratterizzato (Papetti ed Herman, 2002).

Risalgono a più di un secolo fa le prime pubblicazioni che evidenziavano una correlazione fra crescita tumorale e proliferazione vasale, ed al 1930 le ipotesi relative alla presenza di specifici fattori in grado di stimolare l'angiogenesi. Bisogna però attendere sino al 1968 per avere la dimostrazione diretta dell'esistenza di mediatori neoangiogenici diffusibili. In quell'anno, due studi evidenziarono la capacità di cellule neoplastiche trapiantate di indurre una proliferazione vasale nei tessuti vicini, anche attraverso un filtro che le separava dalle cellule dell'ospite. Dopo questa scoperta (spiegabile solo con la produzione da parte del tessuto neoplastico di sostanze capaci di diffondere attraverso i tessuti e di stimolarne il processo angiogenico), i numerosi tentativi fatti per identificare questi fattori portarono all'evidenziazione del **VPF** (Vascular Permeability Factor), del **VEGF** e della Vasculotropina. In seguito a studi molecolari approfonditi, nel 1990 queste tre sostanze si dimostrarono coincidenti e presero il nome di **VEGF-A** (Ferrara, 2002).

Nonostante la crescente importanza acquisita negli ultimi anni da altre molecole pro-angiogeniche, l'attivazione del VEGF sembra, a tutt'oggi, costituire ancora il punto critico, limitativo del processo angiogenico sia fisiologico che patologico. Anche alla luce delle molteplici variabili che ne influenzano la regolazione, questo fattore presenta attualmente una notevole importanza quale marker diagnostico,

prognostico e come target terapeutico in molte patologie (Ferrara,1997; Ferrara et al., 2003).

2.1.1 EFFETTI BIOLOGICI DEL VEGF

Il **Vascular Endothelium Growth Factor-A** è una molecola la cui attività mitogena si esplica quasi esclusivamente a livello delle cellule endoteliali di arterie, vene e di vasi linfatici, essendo i suoi recettori prerogativa di queste popolazioni cellulari. Nonostante ciò, recentemente, è stata riscontrata un'azione proliferativa VEGF-mediata (sia *in vivo*, che *in vitro*) anche a carico di altre cellule quali cellule dei dotti pancreatici, linfociti, cellule di Schwann, cellule neuronali, cellule pigmentate dell'epitelio retinico, epatociti e cellule endoteliali sinusoidali (Ferrara, 2001; Robinson e Stringer, 2001; Ferrara et al., 2003; Lammert et al., 2003).

Oltre alla caratteristica capacità di indurre proliferazione, migrazione e differenziazione delle cellule endoteliali con una azione di tipo diretto, il VEGF-A appare implicato in altre importanti funzioni pro-angiogeniche:

- aumento della permeabilità vasale: conosciuto anche come **Vascular Permeability Factor (VPF)**, il VEGF è in grado di indurre un importante aumento dell'essudazione vasale. Mediando il passaggio nella ECM di proteine plasmatiche (in particolare fibrinogeno) il VEGF facilita la formazione di un substrato extracellulare ottimale per l'attecchimento e la proliferazione endoteliale (Gupta e Qin, 2003). Inoltre, in correlazione a questa proprietà, recenti studi hanno dimostrato: 1) la formazione, VEGF-indotta, di fenestrature a livello di endoteli di piccole venule e capillari (Esser, 1998); 2) l'aumento della conduttività idraulica dei singoli vasi, attraverso un aumento del flusso del calcio (Ferrara et al., 2003);

- inibizione dei fenomeni apoptotici ed aumento dell'emivita delle cellule endoteliali: l'attività antiapoptotica del VEGF si realizza tramite l'espressione di specifiche proteine a livello endoteliale, **Bcl-2** e **A1**, e tramite la via di trasduzione del segnale che, attraverso la fosfatidilinositolo-3-kinasi (PI-3K), attiva le serina/treonina kinasi-proteina kinasi B (PKB/Akt) e la protein kinasi C (PKC). Grazie a questa capacità di contrastare la morte programmata delle cellule endoteliali, il VEGF limita la regressione delle strutture neoformate e stabilizza il tessuto vascolare sia nell'ambito di processi fisiologici, sia in processi patologici quali quelli neoplastici;
- induzione dell'espressione, da parte delle cellule endoteliali, di proteasi quali uPA, uPAR, tPA, e metalloproteinasi-collagenasi interstiziale; l'espressione di queste molecole comporta la degradazione ed il rimodellamento della membrana basale vascolare e della matrice extracellulare, permettendo la migrazione e la gemmazione delle cellule endoteliali;
- mantenimento dell'equilibrio del processo proteolitico attraverso la contemporanea induzione dell'espressione del **PAI-1** (Ferrara e Davis-Smyth, 1997);
- aumento nelle cellule endoteliali della capacità di trasporto dell'esoso, in sintonia con le maggiori esigenze nutrizionali delle cellule in rapida proliferazione;
- induzione dell'espressione di molecole di adesione, VCAM-1 e ICAM-1 a livello endoteliale;
- amplificazione dei meccanismi di adesione delle cellule natural killer all'endotelio, proprio attraverso il legame VCAM-1 endoteliali/CD18 e VLA4 linfocitarie (Ferrara e Davis-Smyth, 1997).

Come evidenziato in precedenza, effetti VEGF-indotti si realizzano, inoltre, a livello di cellule non endoteliali:

- cellule della linea ematopoietica: promozione della chemiotassi monocitaria ed induzione della formazione di colonie di cellule progenitrici di macrofagi e neutrofili (Ferrara et al., 2003);
- cellule presentanti antigene (per esempio le cellule dendritiche) che **vengono selettivamente inibite** se si trovano in uno stadio di immaturità, inducendo un calo della risposta immunitaria (Ferrara e Davis-Smyth, 1997);
- cellule neuronali: studi recenti hanno evidenziato un'attività neurotrofica del VEGF che, tramite interazione con i recettori tirosin chinasi e neuropiline a livello di sistema nervoso periferico, si rende responsabile della **stimolazione della crescita assonale** grazie ai suoi effetti proliferativi ed antiapoptotici (Sondell, 1999).

2.1.2 GENE E STRUTTURA PROTEICA DEL VEGF

Il gene del VEGF appartiene ad una famiglia di geni (PDGF/VEGF growth factor family) che codifica altri importanti fattori di crescita: **Placental Growth Factor (PIGF)**, **VEGFB**, **VEGFC**, **VEGFD**, ed il recente **EG-VEGF** (un fattore angiogenico organo-specifico isolato nel 2001, con azione esclusiva sull'endotelio delle ghiandole endocrine).

Il gene del VEGF umano è assegnato al cromosoma 6p21.3. Ogni gene è costituito da otto esoni, separati fra loro da sette introni. Nel gene del VEGF umano la regione codificante misura approssimativamente 14 Kb. Il gene del VEGF, come la maggior parte del corredo genetico degli eucarioti superiori, è un gene cosiddetto "interrotto". Questi geni, oltre alle normali sequenze codificanti (esoni), presentano delle sequenze addizionali (introni) che, essendo interne alla regione codificante, interrompono la sequenza. Attraverso lo *splicing* nucleare, a partire dal singolo gene del VEGF, sono generate diverse isoforme. Nella grande maggioranza dei casi, i geni interrotti sono trascritti in un RNA che dà origine, in seguito a *splicing*, ad un singolo tipo di mRNA. Gli RNA di

alcuni geni, fra cui il gene del VEGF, seguono invece schemi di *splicing alternativo*. In tal caso un solo gene dà origine a più di una sequenza di mRNA e, conseguentemente, a diverse sequenze proteiche (Lewin, 2001).

Tramite cristallografia ai raggi X di un suo frammento, è stato possibile valutare la struttura e classificare il VEGF fra le proteine appartenenti alla superfamiglia dei fattori di crescita cisteinici. Questa famiglia comprende molecole le cui strutture terziarie appaiono stabilizzate dal gruppo tiolico del residuo di cisteina, il cosiddetto "nodo cisteinico". La superfamiglia è ulteriormente suddivisa in sottogruppi ed il VEGF sembra fare parte della famiglia del **PDGF**. Dal punto di vista strutturale, il VEGF è una molecola omodimerica, con peso molecolare variabile tra i 34 ed i 46 kDa. I monomeri da cui è costituita sono legati da un ponte disolfuro che si stabilisce fra due residui cisteinici. La mutagenesi sito-specifica identifica 3 residui acidi sul terzo esone e 3 basici sul quarto, fondamentali per il legame del VEGF con il VEGFR-1 ed il VEGFR-2, rispettivamente. Tre anse molto flessibili si sviluppano attorno ad ogni polo della molecola sull'interfaccia del dimero. La seconda ansa, sulla quale si trova il determinante per il legame con il VEGFR-1, si trova in stretto contatto con la terza ansa del monomero opposto e su questa, a sua volta, è localizzato il determinante per il VEGFR-2. Tale particolare conformazione facilita la dimerizzazione del recettore, essenziale per la trans-fosforilazione e la trasmissione del segnale (Robinson e Stringer, 2001).

2.1.3 REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DEL VEGF

Numerosi meccanismi si rendono responsabili della regolazione genica del VEGF. Molteplici colture cellulari rispondono ad un calo della tensione d'ossigeno proprio con un aumento dell'espressione dell'RNAm codificante per il VEGF. Studi sul miocardio canino hanno evidenziato

un aumento sostanziale dell'espressione del VEGF nelle 24 ore successive all'instaurarsi di uno stato di ipossia. *In vivo*, nel glioblastoma multiforme, ed in altre neoplasie caratterizzate da intensa necrosi tissutale, l'RNAm del VEGF risulta ampiamente espresso soprattutto dalle cellule tumorali più vicine alle aree di necrosi. Tutti questi eventi testimoniano l'importanza della carenza d'ossigeno nella regolazione genica del VEGF sia *in vitro*, che *in vivo*, rendendo quindi il VEGF-A **l'unico mediatore angiogenico ipossia-dipendente** (Josko, 2000; Robinson e Stringer, 2001; Ferrara et al., 2003). L'ipossia induce l'espressione del VEGF con un meccanismo molto simile a quello attraverso cui si rende responsabile della regolazione dell'eritropoietina. In entrambi i casi la correlazione fra tensione d'ossigeno ed espressione genica è da ricondurre all'attivazione di uno specifico "**Hipoxia Response Element**" (HRE) che si comporta da *enhancer*. L'HRE è una sequenza genica di 28 basi, localizzata nella regione 5' del promotore del VEGF umano e murino, in cui si attiva la trascrizione proprio in seguito ad un calo della tensione d'ossigeno. Questa sequenza presenta un'elevata omologia strutturale e funzionale con la regione del gene dell'eritropoietina che si lega all'Hipoxia-Inducibile Factor (HIF-1), fattore chiave anche nella regolazione ossigeno-dipendente del VEGF.

E' stato, inoltre, dimostrato che l'accumulo di adenosina che si verifica in condizioni d'ipossia, attivando i recettori A₂, esiti in un aumento della concentrazione di cAMP.e questo, a sua volta, attraverso la protein chinasi-A, amplifichi l'espressione del VEGF (Levy, 1995; Robinson e Stringer, 2001).

Oltre ad aumentare la trascrizione del VEGF, lo stato di ipossia è anche in grado di indurre una maggior stabilizzazione del RNAm , agendo quindi con un meccanismo post-trascrizionale. In assenza di fenomeni ipossici, la stabilizzazione dell' RNAm del VEGF avviene tramite inattivazione del fattore di soppressione proteica tumorale di von Hippel Lindau a cui si associa sempre un aumento dell'attivazione dell'HIF (Levy et al., 1996; Ferrara, 1999; Ferrara, 2002).

Nonostante il ruolo fondamentale dell'ipossia, a cui si può associare l'effetto simile dimostrato dalla carenza cellulare di glucosio, (Shweiki et al., 1994), non si deve dimenticare che anche numerosi fra i più importanti fattori di crescita determinano una *up-regulation* dell'RNAm del VEGF o, in alternativa, ne inducono il rilascio. Oltre all'azione del TGF- α , TGF- β , Keratinocyte Growth Factor, IGF-1, FGF e PDGF, bisogna ricordare quella di **IL-1 α** e **IL-6**. Queste citochine sembrano indurre, negli stati infiammatori, l'espressione del VEGF in svariate popolazioni cellulari, per esempio nei fibroblasti sinoviali, in accordo con l'ipotesi che il VEGF abbia un ruolo fondamentale anche nella mediazione dei fenomeni flogistici (Ferrara e Davis-Smyth, 1997). Sono implicate nella regolazione del VEGF anche alcune vie ormonali: TSH, ACTH e gonadotropine quali FSH ed LH, estrogeni e progesterone svolgono un'attività di facilitazione nei confronti dell'espressione di questa proteina (Wong et al., 2001). Shoji e collaboratori sostengono l'importanza del fattore tissutale (TF) nell'amplificazione dell'espressione del VEGF, ed il suo ruolo chiave nella patogenesi della formazione della fibrina e nella promozione del processo angiogenico in numerosi tumori (Shoji et al., 1998).

Infine, fra i meccanismi regolatori devono essere ricordati alcuni importanti eventi di trasformazione cellulare: mutazioni a carico di oncogeni, amplificazione dell'espressione di RAS e, come precedentemente accennato, la mancata espressione della proteina di von Hippel Lindau (vHL) (Robinson e Stringer, 2001). Nella sindrome di von Hippel Lindau, infatti, in seguito all'inattivazione del gene di questa proteina, frequentemente si sviluppa un emangioblastoma a livello di retina o di cervelletto, o in alcuni casi un carcinoma delle cellule renali (clear-cell renal carcinoma). Anticorpi monoclonali per il VEGF rallentano l'attività proliferativa di tutte le cellule portatrici della mutazione del gene della VHL, poichè la principale funzione di questo fattore è proprio quella di inibire la regolazione dei fattori pro-angiogenici, e, nello specifico, del VEGF (Ferrara e Davis-Smyth, 1997).

Fra i fattori in grado di inibire la secrezione del VEGF devono essere ricordati, inoltre, actinomicina-D, monossido di carbonio ed ossido nitrico (Josko, 2000). Il loro ruolo nel processo neoangiogenico sarà descritto in seguito.

2.1.4 ISOFORME DEL VEGF

E' stato precedentemente accennato come, da un solo gene, attraverso un meccanismo di *splicing alternativo*, siano prodotte più isoforme della stessa proteina. Inizialmente furono descritte quattro diverse isoforme di VEGF umano: **VEGF₁₂₁**, **VEGF₁₆₅**, **VEGF₁₈₉** e **VEGF₂₀₆**. Le stesse furono poi individuate anche nel topo e nel ratto, con l'unica particolarità di presentare un aminoacido in meno rispetto alle corrispondenti umane. Recentemente sono state scoperte due nuove isoforme, espresse meno frequentemente, **VEGF₁₄₅** e **VEGF₁₈₃**. In particolare, **VEGF₁₄₅** e **VEGF₂₀₆** sembrano specifiche delle cellule di origine placentare, mentre le altre sono comunque prodotte dalla maggior parte delle cellule che esprimono il fattore di crescita vasale. Tutte queste isoforme differiscono fra loro per la presenza o l'assenza di alcune sequenze aminoacidiche codificate dal 6° o dal 7° esone (Ferrara et al., 2003). Il VEGF nativo è una glicoproteina omodimerica di 45 kDa, le cui proprietà corrispondono a quelle del **VEGF₁₆₅**, l'isoforma principale. Quest'ultima presenta caratteristiche basiche, si trova solo per il 40% libera, mentre la restante parte è legata, o alla membrana cellulare, o alla matrice extracellulare attraverso proteoglicano eparan-solfato (HSPG). Il **VEGF₁₆₅** presenta una moderata capacità di legame con l'eparina, grazie alla presenza di 15 aminoacidi basici nei 44 residui codificati dal settimo esone. Il **VEGF₁₂₁**, mancante proprio di questa regione, è una proteina debolmente acida, non legante l'eparina, ed è rilasciato dalle cellule produttrici sottoforma di fattore solubile.

Le isoforme $_{189}$ e $_{206}$, contengono delle sequenze addizionali codificate dal sesto esone, sono in grado di legarsi più strettamente all'eparina rispetto all'isoforma $_{165}$, ma si trovano quasi totalmente sequestrate all'interno della matrice extracellulare.

Il VEGF $_{145}$, infine, possiede una sequenza aminoacidica codificata dal sesto esone, che gli conferisce un'affinità per l'eparina simile a quella che, nell'isoforma $_{165}$, è codificata dal settimo esone. Questa sequenza permette al VEGF $_{145}$ di legarsi all'ECM anche attraverso meccanismi indipendenti da eparina ed eparan-solfato, formando un complesso che presenta attività mitogena a carico dell'endotelio (Robinson e Stringer, 2001).

Le isoforme più lunghe, sequestrate dalla matrice extracellulare, non presentano un'efficace attività mitogena, anche a causa di impedimenti sterici, ma costituiscono un'importante riserva di fattore di crescita. I VEGF $_{183/189/206}$ possono essere rilasciati in forma solubile grazie all'eparina, all'eparan-solfato ed all'eparinasi poiché il loro sito di legame è rappresentato da proteoglicani contenenti molecole eparino-simili. Queste isoforme possono essere anche mobilizzate rapidamente da specifici enzimi proteolitici, plasmina o uPA, i quali, tramite clivaggio del terminale ossidrilico, inducono la formazione di un frammento bioattivo, il VEGF $_{110}$, con massa molecolare di circa 34 kDa.

Tutto questo suggerisce che il Vascular Endothelial Growth Factor sia in grado di interagire con le cellule endoteliali per mezzo di due meccanismi principali: sottoforma di fattore solubile (VEGF $_{121}$ e VEGF $_{165}$) o tramite attivazione proteasica e clivaggio delle isoforme più lunghe (VEGF $_{183}$, VEGF $_{189}$ e VEGF $_{206}$). Occorre tuttavia ricordare che la perdita del dominio legante l'eparina risulta in una sostanziale diminuzione dell'efficacia del VEGF come agente mitogeno e questo può in parte spiegare l'importanza assunta nell'angiogenesi dall'isoforma $_{165}$, l'unica che lo mantiene (Ferrara, 2001).

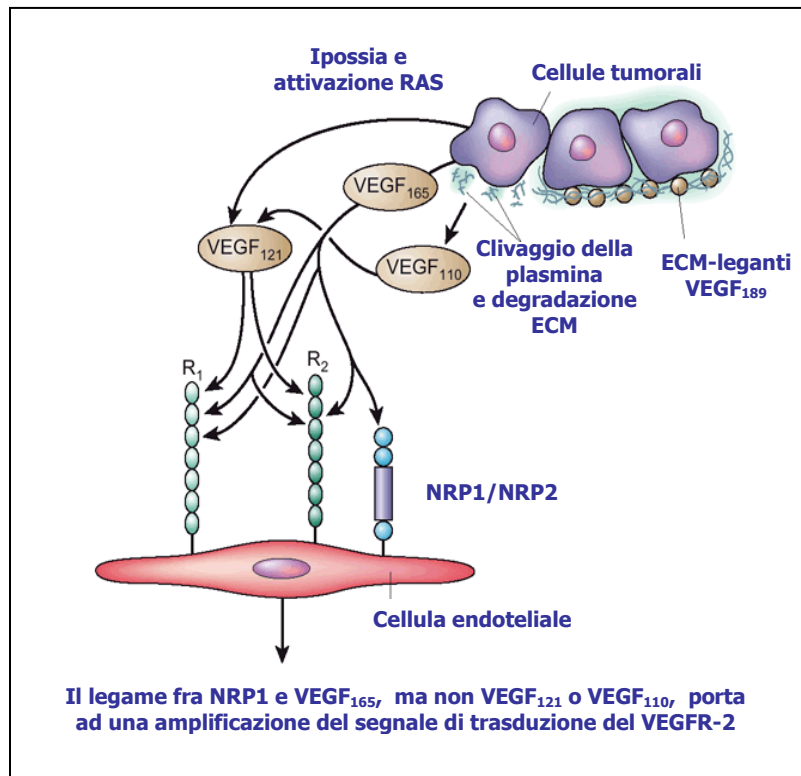


Figura 2: Le isoforme del VEGF e le loro interazione con i recettori (da Ferrara et al., 2003)

Le isoforme considerate, oltre a distinguersi per struttura, recettori (di cui si parlerà in seguito) e modalità d'attivazione, giocano un ruolo differente nell'ambito del meccanismo neoangiogenico. In particolare, studi condotti sulla vasculogenesi tumorale in corso di neoplasie encefaliche hanno dimostrato che la sovra-espressione di VEGF₁₆₅ e di VEGF₁₂₁ induce un aumento significativo delle emorragie cerebrali, mentre ciò non accade per il VEGF₁₈₉. Ancora, in alcune tipologie di tumore mammario l'isoforma più breve (₁₂₁) è risultata essere quella maggiormente espressa, mentre in studi sull'adenocarcinoma polmonare si è osservata la prevalenza del VEGF₁₈₉ sulle altre isoforme (Guo et al., 2001). Tutto ciò suggerisce la presenza di una eterogeneità biologica non sottovalutabile fra le diverse isoforme del VEGF (Ferrara, 2001).

ISOFORME	VEGF ₁₂₁	VEGF ₁₆₅	VEGF ₁₈₉
Affinità con l'eparina	+	++	++++
Potenza biologica	++	++++	?
Diffusibilità	++++	+++	+
Legame con NRP1	Assente	Presente	Dubbio

Tabella 2. Proprietà delle principali isoforme del VEGF (modificato da Ferrara, 2001).

2.1.5 PROTEINE VEGF-CORRELATE

Il VEGF appartiene ad una famiglia di fattori di crescita i cui membri hanno in comune una significativa omologia aminoacidica.

Il **PDGF** (da cui il VEGF origina) condivide con il VEGF fra il 24 ed il 18% della totale sequenza aminoacidica ed otto residui cisteinici. Nonostante la comune presenza di questi residui cisteinici le due molecole si legano a recettori differenti (Robinson e Stringer, 2001; Papetti ed Herman, 2002). Il Placenta Growth Factor (**PIGF**), condivide con la regione PDGF-simile del VEGF il 53% della sequenza aminoacidica ed è in grado di legarsi a due dei recettori tipici di questo fattore di crescita (VEGFR-1 e neuropilin-1). Il PIGF, espresso normalmente solo a livello placentare, può agire in sinergismo con il VEGF tramite la costituzione del complesso VEGF/PIGF (Papetti ed Herman, 2002).

Il **VEGF-B**, risulta sovrapponibile per il 43% al VEGF₁₆₄ e per il 30% al PIGF. Questa proteina, sintetizzata prevalentemente da cellule muscolari ed in minor misura da cellule encefaliche, polmonari e renali, si può legare al VEGFR-1 ed al neuropilin-1, può sviluppare un effetto mitogeno a carico delle cellule endoteliali e, come già visto per il PIGF, può legare il VEGF amplificandone l'azione (Papetti ed Herman, 2002).

Il **VEGF-C** ed il **VEGF-D** sono due molecole strutturalmente molto simili che costituiscono una sottofamiglia a parte. Queste proteine tramite il legame con il VEGFR-2 inducono un lieve effetto mitogeno a carico delle cellule endoteliali, mentre legandosi con il VEGFR-3 attivano e regolano il processo linfangiogenico. La linfangiogenesi, così come accade per l'angiogenesi, si realizza in numerose condizioni, sia fisiologiche che patologiche ed assume un'importanza particolare nell'ambito della crescita tumorale e dei processi metastatici linfonodali (Stacker, 2002).

Infine, fra i fattori di crescita VEGF-correlati, sono già stati ricordati il **VEGF-E**, codificato da un Orf-virus, ed il EG-VEGF, specifico per le cellule endoteliali delle ghiandole endocrine (Robinson e Stringer, 2001).

	VEGFR-1(FLT-1)	VEGFR-2(FLK-1)	VEGFR-3(FLT-4)
VEGF-A	SI	SI	NO
VEGF-B	SI	NO	NO
VEGF-C	NO	SI	SI
VEGF-D	NO	SI	SI
VEGF-E	NO	SI	NO
PlGF	SI	NO	NO

Tabella 3. Legame fra le principali proteine VEGF-correlate ed i recettori tyrosin-chinasici (modificato da Ferrara, 2001).

2.2 RECETTORI DEL VEGF

I primi siti recettoriali per il VEGF furono individuati sulla superficie di cellule endoteliali *in vitro* ed *in vivo*; in seguito si scoprì la loro presenza in popolazioni cellulari di origine midollare (linea ematopoietica e linfopoietica). Il VEGF si lega a due specifici recettori

tirosin chinasi (RTKs), **VEGFR-1** e **VEGFR-2**. Entrambi sono costituiti da sette domini extracellulari immunoglobulino-simili, da una regione transmembranaria e da un dominio intracellulare tirosin-chinasico interrotto da un dominio chinamico. Il **VEGFR-3** (fms-like-tyrosin kinase, flt-4) appartiene alla stessa famiglia di RTK, ma non si lega con il VEGF-A, rappresentando un sito recettoriale specifico per VEGF-C e VEGF-D. La sua espressione avviene solo sulla superficie delle cellule endoteliali dei vasi linfatici, nell'adulto. Oltre a questi recettori il VEGF è in grado di interagire con una famiglia di co-recettori: le neuropiline (Ferrara et al., 2003).

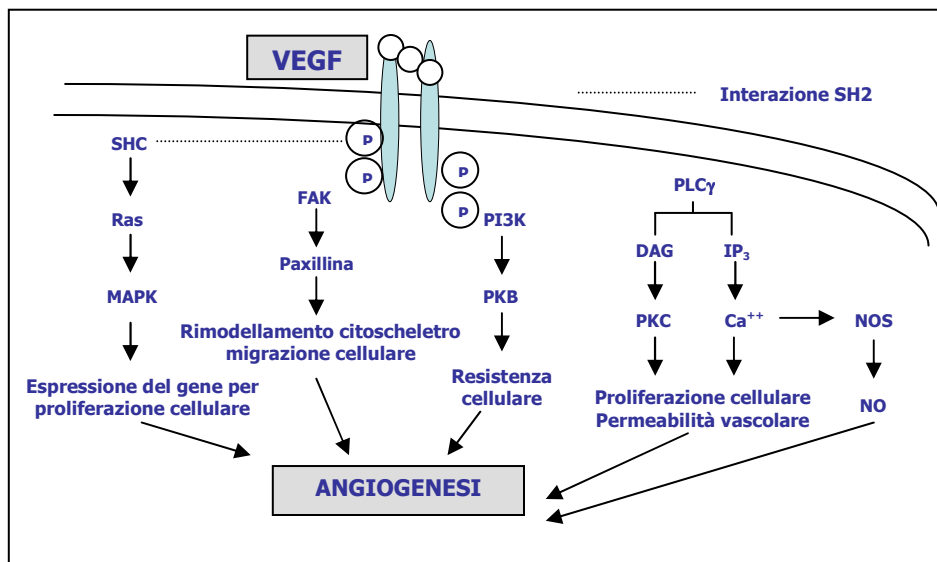


Figura 3. Attivazione di un recettore con attività tirosin chinasi ed interazioni necessarie alla trasduzione di un segnale (modificato da Giles, 2001).

2.2.1 VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase receptor/Flt-1)

Nonostante sia stato il primo ad essere scoperto, questo recettore del VEGF è a tutt'oggi quello meno conosciuto. Ciò sembra riconducibile alle diverse proprietà che questa proteina acquisisce, al variare del grado

di sviluppo e della tipologia delle cellule su cui si localizza. I ligandi del VEGFR-1 sono rappresentati, oltre che dal VEGF-A, dal VEGF-B e dal PlGF. Questo recettore viene espresso, tramite *splicing* alternativo, in due isoforme: una solubile (sFlt-1) e una di membrana, localizzata sulla superficie di cellule endoteliali, di cellule muscolari lisce e di monociti. Il VEGFR-1 presenta la maggior affinità di legame con il VEGF; tuttavia la sua attivazione conduce solo ad una debole autofosforilazione. L'assenza, nelle cellule endoteliali, di segni di proliferazione o migrazione correlabili alla attivazione del VEGFR-1, ha permesso di supporre che questa proteina non sia principalmente implicata nel processo pro-angiogenico, ma, piuttosto, costituisca un recettore “*decoy*” (trappola). Il VEGFR-1 sembra modulare in senso negativo l'attività del VEGF sulle cellule endoteliali, prevenendo o limitando il legame di quest'ultimo al VEGFR-2 (Ferrara et al., 2003).

Attraverso quest'ipotesi è possibile spiegare l'azione di sinergismo svolta da PlGF e VEGF-B, i quali, occupando competitivamente il VEGFR-1, aumentano la quota di VEGF-A libera di legarsi al VEGFR-2. Sempre in accordo con quest'ipotesi, studi recenti hanno rilevato come cavie, mancanti di entrambi gli alleli codificanti per il VEGFR-1, non superino l'ottavo/nono giorno di vita embrionale. In questi soggetti le cellule endoteliali si sviluppano normalmente, ma non sono in grado di organizzarsi in una struttura vascolare a causa di un'eccessiva proliferazione angioblastica. Infine, individui in cui il recettore è presente, possiede un normale sito di legame per il VEGF, ma risulta mancante del dominio tirosin-chinasico, non sembrano presentare alcuna anomalia di sviluppo vascolare (Ferrara, 2001).

Il VEGFR-1, oltre a controllare ed inibire la moltiplicazione delle cellule endoteliali, presenta numerose attività pro-angiogeniche. Aumenta l'espressione sulla superficie delle cellule endoteliali del TF, dell'uPA e del PAI-1, stimola la chemiotassi monocitaria e è responsabile dell'espressione delle metalloproteinasi di matrice nelle cellule muscolari perivasali. Legandosi al PlGF, infine, il VEGFR-1 riattiva l'ematopoiesi

attraverso il reclutamento di cellule staminali (Ferrara, 2001; Robinson e Stringer, 2001; Ferrara et al., 2003;).

2.2.2 VEGFR-2 (KDR/Kinase domain region, o Flk-1/ Fetal liver Kinase)

Il VEGFR-2 possiede un ruolo chiave nello sviluppo angiogenico ed ematopoietico. La mancanza di questa proteina negli embrioni di cavia, non permette loro di sopravvivere oltre l'ottavo o il nono giorno di gestazione. Il VEGFR-2 è ampiamente espresso da numerosi precursori cellulari, sia endoteliali, che ematopoietici, ma non dalle cellule vasali quiescenti, in cui si realizza una *down-regulation*. L'attivazione di questo recettore (ad opera di VEGF-A, -C, -D) si rende responsabile della proliferazione, migrazione e dell'aumento della permeabilità delle cellule endoteliali. Tale attivazione è inoltre necessaria perché si realizzi l'effetto antiapoptotico del VEGF. La regolazione dell'espressione di questo recettore, così come quella del VEGFR-1, si realizza attraverso diversi meccanismi. L'ipossia rappresenta il principale induttore, ma, mentre il Flt-1 così come il VEGF presenta una sequenza di consenso per l'HIF-1 a livello del suo promotore, il Flk-1 non la possiede e la sua trascrizione è solo debolmente regolata dall'ipossia. Brogi e collaboratori tuttavia, sostengono che i tessuti ischemici sono in grado di liberare un fattore, non ancora ben identificato, capace di amplificare i livelli post-trascrizionali del VEGFR-2 (Robinson e Stringer, 2001).

Inoltre, numerosi fattori di crescita fra cui il VEGF stesso, ma anche il TNF- α ed il TGF- β , regolano l'espressione dei recettori tirosin chinasi. All'azione di queste proteine va aggiunta l'interazione fra le cellule endoteliali o fra cellule e matrice extracellulare (Ferrara, 2001; Robinson e Stringer, 2001; Ferrara et al., 2003).

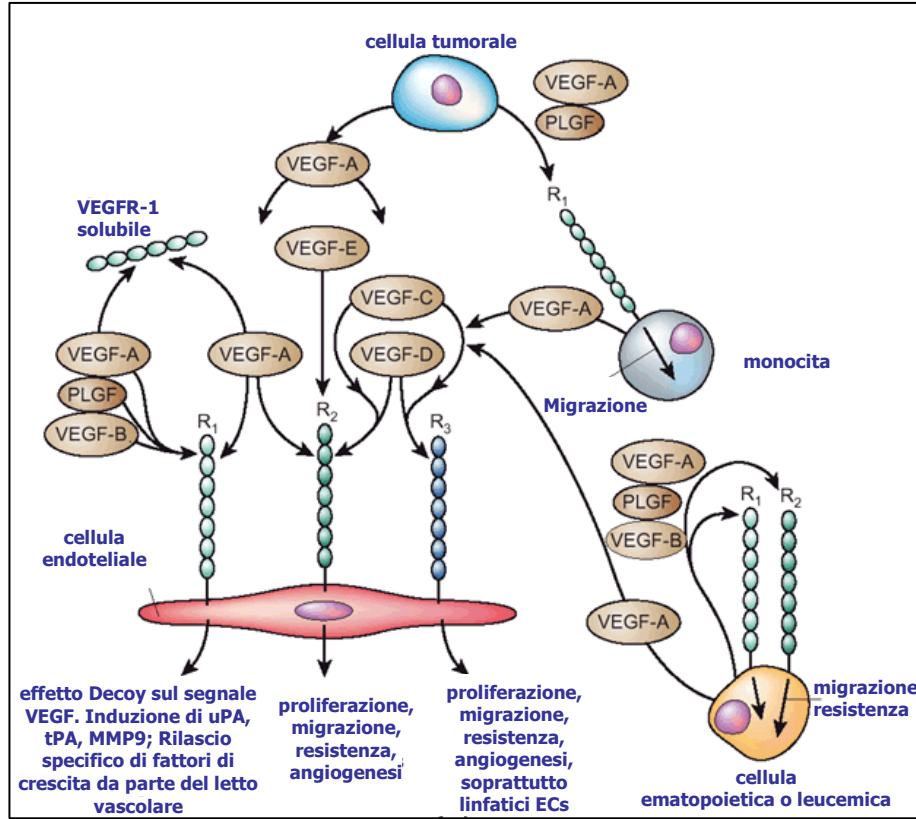


Figura 4. Ruolo dei recettori tirosin-chinasici nelle diverse popolazioni cellulari (modificato da Ferrara et al., 2003)

2.2.3 NEUROFILINA-1 e altre molecole leganti il VEGF

Oltre ai recettori tirosin chinasi, è stata recentemente dimostrata l'esistenza di un ulteriore sito recettoriale per il VEGF. Questo recettore, capace di riconoscere il dominio del VEGF codificato dal settimo esone (e quindi capace di legarsi all'isoforma₁₆₅, ma non alla ₁₂₁), coincide con la **neuropilina-1 umana (NRP-1)** (Soker et al, 1998). Le NRP sono delle glicoproteine conosciute per la loro attività recettoriale neuronale e per la loro capacità d'interazione con membri della famiglia delle collapsine/semaforine. In particolare, la NRP-1, implicata durante la vita embrionale nel controllo della crescita dell'assone, possiede un'ampia distribuzione tissutale, incluse alcune cellule di natura neoplastica e cellule endoteliali. Ad oggi, non essendo stati evidenziati segnali di trasduzione correlabili al solo legame VEGF/NRP, si è ipotizzato che il ruolo di NRP nel processo angiogenico sia quello di presentare l'isoforma ₁₆₅ al VEGFR-2, in modo da amplificare l'efficacia del segnale di trasduzione da esso mediato. Questo fatto spiegherebbe, almeno in parte, la maggior efficacia dimostrata dall'isoforma ₁₆₅ rispetto alla ₁₂₁ (Robinson e Stringer, 2001; Ferrara et al., 2003). Oltre a quest'isoforma del VEGF-A, altre molecole VEGF-correlate presentano affinità per la neuropilina. PlGF-2 e VEGF-B₁₆₇ si legano a questo recettore, nonostante l'effetto biologico di tale legame non sia ancora stato chiarito. Oltre alla NRP-1 sono stati recentemente identificati altri recettori VEGF₁₆₅-specifici (per esempio la NRP-2), tuttavia il loro significato biologico non è ancora stato chiarito (Robinson e Stringer, 2001).

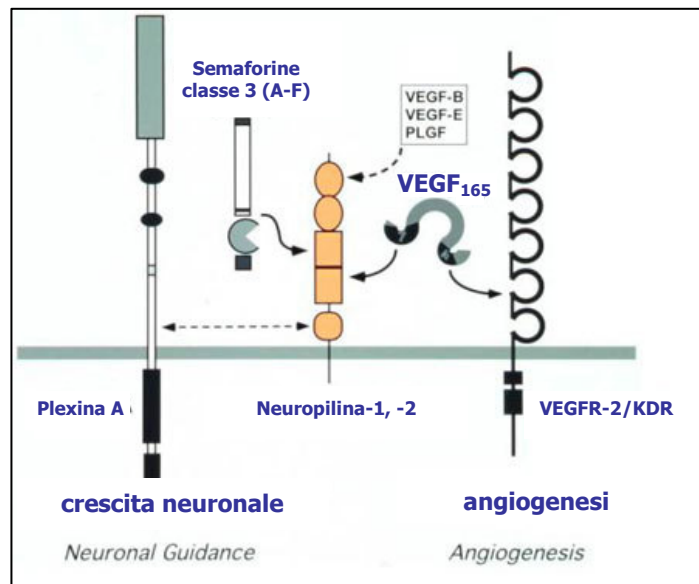


Figura 5. Attività recettoriale della neuropilina.

2.2.4 EPARINA E PROTO GLICANO EPARAN-SOLFATO.

L'eparina è un glicosaminoglicano acido ad azione anticoagulante ed antilipemica. Chimicamente è un polisaccaride complesso ricco di solfati, rilasciato dai mastociti. L'eparansolfato è una molecola che si trova sulla superficie cellulare e nella matrice extracellulare come componente dei proteoglicani eparansolfati (HSPGs). Proteine specifiche sono in grado di riconoscere e legare i diversi gruppi solfati espressi da questi polisaccaridi (eparina e HSPGs). Il legame così formato ha lo scopo di proteggere ed immobilizzare il ligando e, in alcuni casi, è in grado di influenzarne l'attività biologica. Gli effetti regolatori dell'eparina e dell'eparansolfato sul VEGF e sulla capacità di interazione di quest'ultimo e VEGFR-1, VEGFR-2 e NRP-1, dipendono sia dal tipo di recettore coinvolto, sia dall'isoforma del VEGF-A considerata. Tessler e collaboratori sostengono che, basse concentrazioni di eparina, potenziano la capacità di legame del VEGF₁₆₅ al VEGFR-2, mentre alte

concentrazioni possiedono un effetto inibitorio (Robinson e Stringer, 2001).

I proteoglicani eparan-solfati possono influenzare la biodisponibilità del VEGF attraverso il suo sequestro a livello di matrice extracellulare e di superficie cellulare. Questo legame protegge il fattore di crescita dalla degradazione enzimatica e dai processi di inibizione che si realizzerebbero attraverso il legame del VEGF con proteine quali α_2 **macroglobuline** o **platelet factor 4 (PF-4)**. Rappresenta un'eccezione l'interazione fra HSPG e VEGF₁₈₉, che non sembra impedire l'azione proteolitica di plasmina ed uPA. Infine, nei tessuti infiammati e nei processi di cicatrizzazione delle ferite, agenti ossidanti e radicali liberi possono inattivare varie proteine. L'eparina pare essere coinvolta nel ripristino della funzionalità del VEGF₁₆₅ in seguito al suo danneggiamento (Robinson e Stringer, 2001).

2.3 VEGF CANINO

Nel cane sono state identificate le stesse isoforme VEGF presenti nell'uomo dalle quali tuttavia si differenziano per la mancanza di un residuo a livello della regione N-terminale. Nel cane, come nella maggior parte dei mammiferi, è opportuno quindi utilizzare la seguente terminologia: VEGF₁₆₄ e VEGF₁₂₀, (isoforme solubili) e VEGF₂₀₅, VEGF₁₄₄ e VEGF₁₈₈ (isoforme insolubili, legate alla matrice extracellulare). Fra uomo e cane esiste una completa omologia della sequenza aminoacidica coinvolta nella formazione del legame recettoriale. Questa corrispondenza non solo implica che le due proteine (umana e canina) presentino le stesse proprietà di legame, ma spiega la capacità del VEGF₁₆₄ canino di attivare le cellule endoteliali umane nella stessa misura del VEGF₁₆₅.

Anche le isoforme del VEGFR-1 canino corrispondono a quelle umane e la sovraespressione di questo recettore, unitamente a quella del VEGF, è stata evidenziata in numerose neoplasie canine (Scheidegger et al., 1999).

CAPITOLO TRE

LE METALLOPROTEINASI

3.1 METALLOPROTEINASI DI MATRICE

Le **metalloproteinas** di matrice (**MMPs**) costituiscono una famiglia di enzimi zinco- e calcio-dipendenti prodotti da numerosi tessuti e coinvolti nella degradazione dei componenti della matrice extracellulare (ECM) e della membrana basale (MB).

Questi enzimi proteolitici, suddivisibili in sotto-famiglie a seconda della loro specificità di substrato, sono attivi in tutti i processi di **rimodellamento tissutale**, durante l'embriogenesi, la riparazione delle ferite e l'angiogenesi fisiologica (Matrisian, 1990). Le MMPs sono coinvolte in meccanismi patologici quali artrite reumatoide, sclerosi multipla e diffusione neoplastica (Lindberg et al, 2001). Ad oggi, grazie a ricerche che hanno evidenziato ed in parte chiarito, il legame fra MMPs e diversi substrati quali, fattori di crescita, chemiochine, molecole d'adesione e recettori di membrana, il ruolo delle MMPs sembra destinato ad un'importante rivalutazione.

Alla luce del loro complesso ruolo le MMPs non potranno infatti essere considerate ancora a lungo come semplici degradatori della membrana extracellulare, ma dovranno essere riconosciute come parte fondamentale dell'elegante **sistema di comunicazione** con il quale cellule epiteliali e neoplastiche interagiscono con lo stroma (Hamacher et al 2004).

3.1.1 LA SUPERFAMIGLIA DELLE METZINCINE

Le MMPs sono proteasi incluse nel “**MB clan**” delle metallopeptidasi, enzimi endopeptidasici caratterizzati dal motivo HEXXHXXGXXH e da un sito attivo legante lo zinco. I membri del “**MB clan**” sono generalmente indicati come “**Metzincine**” in quanto tutti loro possiedono un motivo contenente tre **istidine** che legano un atomo di **zinco** al sito catalitico e sono accomunati dal **Met Turn**: un residuo di metionina che si trova al di sotto del sito attivo dello zinco.

Le metzincine contengono diverse famiglie. Le MMPs fanno parte della famiglia 10 e sono conosciute anche con il nome di **matricine**.

Attualmente sono state individuate 25 MMPs nei vertebrati e 22 omologhe umane, oltre a diverse MMPs negli invertebrati (Remacle et al., 2005).

Ogni MMP possiede una propria specificità di substrato (talvolta parzialmente sovrapposta ad altre MMPs) e, virtualmente, l'insieme delle MMPs dei vertebrati è in grado di degradare tutte le proteine della matrice extracellulare. Le metalloproteinasi sono generalmente indicate o con nomi propri, o nei vertebrati, secondo una specifica nomenclatura numerico sequenziale (Tabella 4) (Sternlicht e Werb, 2001).

MMPS	NOME	CLASSE STRUTTURALE
MMP-1	COLLAGENASI-1	DOMINIO EMOPEXINA SEMPLICE
MMP-2	<i>GELATINASI-A</i>	GELATIN-BINDING
MMP-3	STROMOLISINA-1	DOMINIO EMOPEXINA SEMPLICE
MMP-7	MATRILISINA	MINIMAL DOMAIN

MMP-8	COLLAGENASI-2	DOMINIO EMOPEXINA SEMPLICE
MMP-9	<i>GELATINASI-B</i>	<i>GELATIN-BINDING</i>
MMP-10	STROMOLISINA-2	DOMINIO EMOPEXINA SEMPLICE
MMP-11	STROMOLISINA-3	FURINA ACTIVATED SECRETED
MMP-12	MACROFAGO- METALLOELASTASI	DOMINIO EMOPEXINA SEMPLICE
MMP-13	COLLAGENASI-3	DOMINIO EMOPEXINA SEMPLICE
MMP-14	MT1-MMP	TRANSMEMBRANA
MMP-15	MT2-MMP	TRANSMEMBRANA
MMP-16	MT3-MMP	TRANSMEMBRANA
MMP-17	MT4-MMP	GPI-LINKED
MMP-18	COLLAGENASI-4	DOMINIO EMOPEXINA SEMPLICE
MMP-19	RASI-1	DOMINIO EMOPEXINA SEMPLICE
MMP-20	ENAMELISINA	DOMINIO EMOPEXINA SEMPLICE
MMP-21	XMMP	INSERTO VITRONECTINA- LIKE
MMP-22	CMMP	
MMP-23		TYPE 2 TRANSMEMBRANA
MMP24	MT5-MMP	TRANSMEMBRANA
MMP25	MT6-MMP	GPI-LINKED
MMP-26	MATRILISINA-2	<i>MINIMAL DOMAIN</i>
MMP-28	EPILISINA	FURINA ACTIVATED SECRETED

Tabella n 4: nomenclatura numerico sequenziale delle MMPs dei vertebrati (Sternlicht e Werb, 2001)

Come altri enzimi proteolitici, le MMPs sono inizialmente sintetizzate in forma di zimogeni inattivi con una sequenza di segnale ed un pro-peptide che deve essere rimosso durante l'attivazione (Nagase e Woessner, 1999). Tutte le MMPs presentano una sequenza N-terminale (*pre-domain*) che viene rimossa dopo aver diretto la sintesi delle MMPs al reticolo endoplasmatico. Questo dominio *pre-* è seguito da un dominio propeptidico *pro-*, che ha la funzione di mantenere la latenza dell'enzima. La latenza delle MMPs è mantenuta attraverso un gruppo sulfidrilico di cisteina posto all'estremità C-terminale del dominio propeptidico. Il gruppo sulfidrilico agisce come un quarto ligando per lo ione zinco del sito attivo. L'attivazione avviene attraverso la rimozione proteolitica del dominio del pro-peptide. Il gruppo tiolo rimosso è rimpiazzato da una molecola d'acqua che a sua volta potrà attaccare i legami peptidici dei target delle MMPs (Sternlicht e Werb, 2001).

Un'eccezione è rappresentata dalla MMP-23 che manca del gruppo cisteina e possiede un dominio pro-peptide diverso. La sequenza PRCGVP attorno alla cisteina è chiamata "cysteine switch". Ai due domini (*pre-* e *pro-*) segue un dominio catalitico a livello del quale si legherà lo zinco e nel quale sono presenti ioni calcio, fondamentali per la stabilità e l'attivazione enzimatica (Nagase e Woessner, 1999). Con l'eccezione della MMP-7, MMP-26 e della MMP-23, tutte le MMPs possiedono un dominio *emopexina/vitronectina like*, connesso al dominio catalitico tramite una regione perno (*hinge*) o di legame (*linker*). Quando presente, il dominio *emopexina/vitronectina like* influenza il legame con il TIMP, il legame con altri substrati, l'attivazione di membrana ed alcune attività proteolitiche. La regione perno, infine, variando in lunghezza e composizione a seconda dei casi, influenza la specificità di substrato.

Le gelatinasi A e B (rispettivamente MMP-2 e MMP-9) sono MMPs caratterizzate dall'inserzione di tre ripetizioni *cysteine-rich* testacoda all'interno del loro dominio catalitico.

Queste inserzioni assomigliano alle ripetizioni di fibronectina di tipo II e sono necessarie per legare e scindere collagene ed elastina (Sternlicht e Werb, 2001). La MMP-9, dopo la regione perno, presenta, infine, un'inserzione *collagen-like* tipo IV la cui funzione non è stata ancora totalmente chiarita, ma sembrerebbe essere utile nell'ampliamento del legame di substrato della MMP.

La struttura di dominio delle MMPs è schematizzata nella Figura 6.

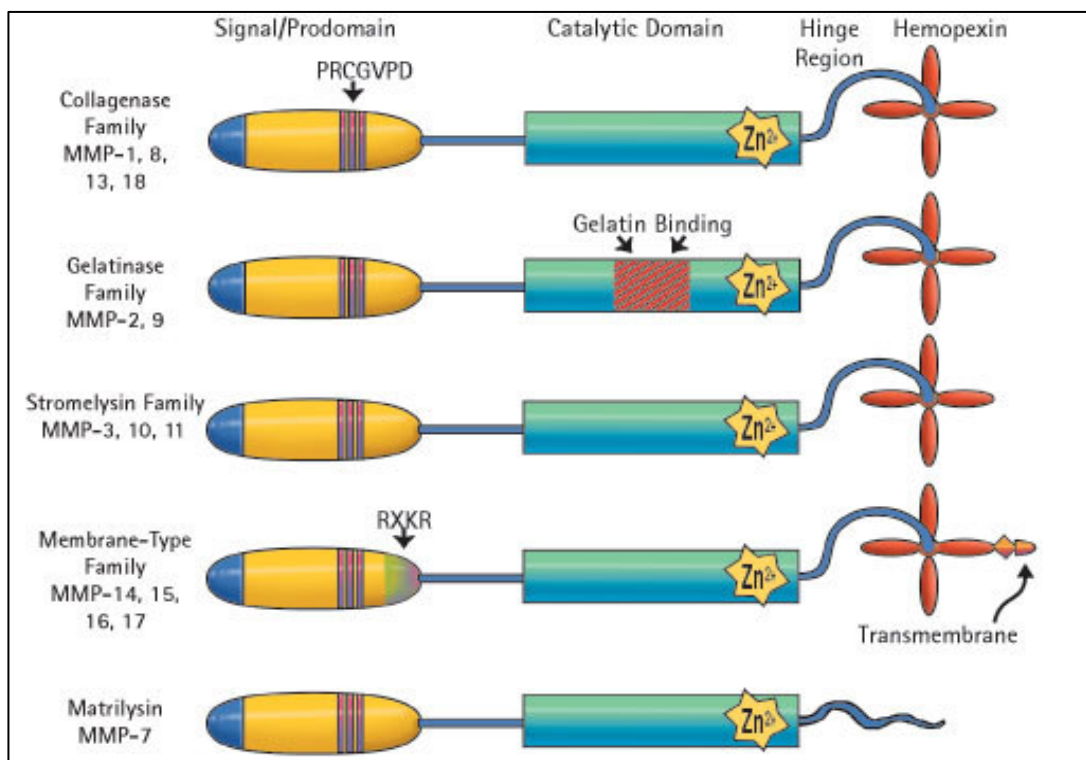


Figura 6: Struttura di dominio delle MMPs

3.1.2 REGOLAZIONE DELL'ATTIVITA' DELLE MMPs

La regolazione dell'attività metalloproteasica è un meccanismo complesso, controllato sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale. Le MMPs, sono inoltre regolate a livello proteico da diversi attivatori ed inibitori (citochine, per esempio) e la loro attività è strettamente correlata alla localizzazione che possiedono sulla superficie cellulare (Sternlicht e Werb, 2001).

3.1.2.1 REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLE MMPs

Dal momento che le specificità di substrato tendono a sovrapporsi, la funzione biologica delle singole MMPs è ampiamente dettata dai loro pattern differenziali d'espressione. Spesso il ruolo caratteristico di una MMP è indicato da differenze temporali, spaziali e di inducibilità. La maggior parte delle MMPs è strettamente regolata a livello trascrizionale, con la rilevante eccezione della MMP-2, controllata ed espressa essenzialmente attraverso un unico meccanismo di attivazione enzimatica e da alcuni gradi di stabilizzazione post-trascrizionali dell'mRNA (Sternlicht e Werb, 2001).

L'espressione genica delle MMPs è controllata da diversi fattori stimolatori e soppressori. Essa può subire *up-* o *down- regulation* ad opera degli esteri del forbolo, di proteine dell'ECM, secondariamente a stress cellulari, a variazioni della forma cellulare ed alle interazioni cellula-matrice e cellula-cellula. L'espressione delle MMPs è inoltre regolata da numerose citochine e fattori di crescita fra cui interleuchine (IL), interferoni, Fattore di Crescita Epiteliale (EGF - Epithelil Growth Factor), VEGF, TNF- α e - β (Tumor Necrosis Factor- α e - β), Induttore

Extracellulare delle MMPs (Extracellular Matrix β Metalloproteinase Inducer) e TGF- β (Trasforming growth factor- β).

A livello post-trascrizionale le MMPs possono essere regolate da vari meccanismi. Le copie di mRNA che codificano per le MMPs 1 e 3 sono stabilizzate dall'EGF, mentre le copie della MMPs-13 sono stabilizzate dal PDGF e dai glicocorticoidi e destabilizzate dal TGF- β .

Le MMPs sono inoltre controllate anche a livello secretorio: MMP-8 e MMP-9 sono sintetizzate nel midollo dai granulociti, immagazzinate nei granuli dei neutrofilo circolanti ed infine rilasciate secondariamente all'attivazione di queste cellule da parte dei mediatori dell'infiammazione (Sternlicht e Werb, 2001).

3.1.3 ATTIVAZIONE DELLE MMPs LATENTI

L'attivazione in vivo delle Pro-MMPs (attuata attraverso la rottura delle interazioni *Cys-Zn²⁺: cystein switch*) è resa possibile da proteinasi tissutali, plasmatiche o batteriche. Il sistema uPA/plasmina, per esempio, possiede un importante ruolo nell'attivazione di diverse pro-MMPs e nello specifico nell'attivazione della gelatinasi B.

L'attivazione extracellulare della maggior parte delle pro-MMPs avviene ad opera di altre MMPs o di serina-proteasi che possono scindere i legami peptidici all'interno dei pro-dominii metalloproteinasici. Diversamente, l'attivazione delle MT-MMPs avviene durante il trasporto verso la superficie della cellula o direttamente sulla superficie della membrana cellulare, attraverso variazioni conformazionali non proteolitiche o grazie a molecole quali serina proteasi furina-like (a livello intracellulare) o plasmina (a livello di superficie cellulare) (Sternlicht e Werb, 2001).

3.2 INIBITORI ENDOGENI DELLE MMPs

I **TIMPs** (Tissue Inhibitors MetalloProteinase) sono i più importanti regolatori endogeni delle metalloproteinasi (Nagase e Woessner, 1999). Essi rappresentano una famiglia di almeno quattro proteine dai 20 ai 29 kDa (TIMP-1,-2,-3 E -4) in grado di inibire reversibilmente le MMPs in un rapporto stechiometrico di 1:1, attraverso l'interazione del loro dominio N-terminale con il sito catalitico della MMP. I TIMPs operano con specifici meccanismi inibitori, contro specifiche MMPs. Inoltre I 4 TIMPs sono espressi in tessuti differenti, secondo l'influsso temporaneo delle MMPs. Il TIMP-3 è localizzato nell'ECM, mentre il TIMP-4 si trova essenzialmente a livello delle cellule endoteliali. Indipendentemente dalle loro proprietà inibitorie, i TIMPs esercitano inoltre molte e controverse attività quali la promozione della crescita cellulare o l'induzione dei meccanismi apoptotici, o, ancora, la soppressione dei segnali mitogeni. Infine, in alcuni casi, in relazione alla loro concentrazione, questi inibitori sono in grado di promuovere anche l'attivazione delle stesse MMPs (TIMP-2 e gelatinasi A) (Sternlicht e Werb, 2001).

Oltre ai TIMPs, che agiscono localmente a livello tissutale, esistono altri importanti inibitori endogeni delle MMPs.

La **α 2-macroglobulina**, abbondantemente presente nel plasma, rappresenta il più importante inibitore endogeno circolante delle MMPs. Diversamente dai TIMPs, inoltre, essendo i complessi α 2-macroglobulina/MMPs rimossi tramite endocitosi, questo inibitore possiede un ruolo fondamentale nella *clearence irreversibile* delle MMPs.

Recentemente, inoltre, il **RECK**, una proteina *cystein-rich* normalmente ancorata alla membrana cellulare, è stato studiato quale inibitore endogeno delle MMPs e la sua down regulation correlata alla progressione tumorale (Takagi et al, 2005).

3.3 I SUBSTRATI DELLE MMPs

Metalloproteinasi diverse possono presentare una certa sovrapposibilità di substrato. Per quel che riguarda le Gelatinasi A e B per esempio, entrambe sono responsabili della degradazione del collagene della membrana basale e della gelatina, con una maggior specificità della Gelatinasi A per fibronectina e laminina ed una maggior attività della Gelatinasi B nei confronti di collagene di tipo IV (componente chiave della membrana basale dell'endotelio) e V. (Sternlicht e Werb, 2001)

Oltre a degradare le componenti della MB e della ECM, le MMPs esercitano un'azione proteolitica nei confronti di proteine pericellulari, di superficie e circolanti. Agendo sulla matrice extracellulare le MMPs possono indurre la liberazione, l'attivazione o l'inattivazione di molecole bioattive normalmente depositate all'interno dell'ECM, o favorirne i meccanismi di segnalazione (*cell-signalling*) responsabili dell'omeostasi dell'ambiente extracellulare (Overall et Kleifeld, 2006).

Importanti sono le funzioni emostatiche di questi enzimi: le MMPs degradano serina-proteinasi, (come il plasminogeno e l'uPA), inibitori della serina proteasi, l' α 1-antichimotripsina, l'antitrombina e il PAI-2. Virtualmente tutte le MMPs hanno un'azione fibrinolitica e le MMPs 12, 13 e 14 sono in grado di inattivare il fattore XII (fattore di Hagemann) (Sternlicht e Werb, 2001).

Alcune MMPs infine, sono coinvolte nei meccanismi di attivazione piastrinica e nella aggregazione di queste ultime a cellule metastatiche. Questo meccanismo MMPs-mediato rappresenta uno degli importanti espedienti attraverso i quali le cellule neoplastiche eludono la sorveglianza del sistema immunitario dell'ospite e vincono le forze del flusso ematico che fisiologicamente impedirebbero loro di aderire alla parete vasale una volta allontanatesi dal tumore primario (Sang-Oh Yoon, 2003).

CAPITOLO QUATTRO

NEOANGIOGENESI E CLINICA ONCOLOGICA

4.1. INTRODUZIONE

Un processo neoplastico si realizza attraverso la proliferazione di cellule “trasformate” che sfuggono ai normali meccanismi di controllo della crescita e della differenziazione cellulare dell’ospite (Nicolson, 1979).

Nonostante le cellule neoplastiche presentino caratteristiche proprie, per molti aspetti sono simili alle loro controparti normali. Una di queste analogie è rappresentata dalla necessità di un adeguato apporto di ossigeno e nutrienti e dal bisogno di allontanare i cataboliti prodotti. Le cellule ed i tessuti sani possono soddisfare i loro bisogni metabolici grazie ad un sistema vasale che si sviluppa tramite vasculogenesi ed angiogenesi. I tessuti neoplastici, come precedentemente accennato, possono crescere attorno a vasi pre-esistenti o sviluppare un proprio network vasale attraverso un processo che mima l’angiogenesi fisiologica. Sebbene la loro funzionalità sia mantenuta, i vasi che si sviluppano attraverso questi meccanismi sono strutturalmente anormali e caratterizzati da forme tortuose, fenestrature e pareti sottili costituite da un mosaico di cellule endoteliali e neoplastiche e scarsa presenza di periciti (Papetti ed Herman, 2002).

Tali peculiarità rendono il sistema vasale neoplastico un importante ed innovativo target terapeutico. Le cellule endoteliali sono maggiormente aggredibili dai farmaci rispetto al tessuto neoplastico ed un singolo agente anti-angiogenico può essere utilizzato per molteplici tipologie di tumori. All’interno del tessuto tumorale infatti, le cellule endoteliali, sebbene stimulate da meccanismi di crescita aberranti, non

sono trasformate in senso neoplastico e questo rende meno probabile lo sviluppo di variazioni fenotipiche e di farmaco-resistenza.

Il processo di angiogenesi neoplastica è notoriamente il risultato della rottura dell'equilibrio fisiologico fra fattori pro- ed anti-angiogenici.

Lo stimolo pro-angiogenico può derivare dalle cellule neoplastiche, da cellule infiammatorie, dalla matrice extracellulare o dalle stesse cellule endoteliali. Tutte queste componenti interagiscono fra loro attraverso complessi e ridondanti meccanismi ad oggi noti solo in parte.

Sulla base delle conoscenze attuali, il VEGF e le gelatinasi A e B costituiscono tre dei più potenti fattori coinvolti nell'angiogenesi neoplastica (Laack et al, 2005) e come tali sono considerati importanti target terapeutici.

Ad oggi, numerose sono le sperimentazioni in corso con il fine di individuare un'efficace terapia antiangiogenica da utilizzare a sostegno delle classiche radio- e chemio-terapia. Tutto questo si sta realizzando, non solo nel contesto dei tumori solidi, ma anche in quello, sinora più oscuro, delle neoplasie ematopoietiche (Giles, 2001) con particolare riguardo alla medicina veterinaria ed ai modelli neoplastici animali.

4.2 NEOANGIOGENESI E TUMORI SOLIDI

4.2.1. CONSIDERAZIONI RETROSPETTIVE RELATIVE AL RUOLO DIAGNOSTICO E PROGNOSTICO DEL VEGF NEI TUMORI SOLIDI

L'angiogenesi tumorale, così come quella fisiologica, appare strettamente regolata e dipendente da complessi fattori in equilibrio fra loro. Il VEGF rappresenta uno dei più potenti e specifici fattori pro-angiogenici attualmente riconosciuti. Studi d'ibridazione in situ hanno evidenziato *up-regulation* dell'RNAm del VEGF in numerose neoplasie umane: carcinomi polmonari, mammari, gastrointestinali, renali,

vescicali ed ovarici, neoplasie intracraniche, glioblastomi ed emangioblastomi (Papetti ed Herman, 2002).

Takahashi e collaboratori hanno dimostrato che in corso di carcinoma del colon nell'uomo, si realizza una sovraespressione di VEGF e di VEGFR-2 sia a carico delle cellule neoplastiche, sia delle cellule endoteliali contigue (Takahashi et al., 1995). Questi autori inoltre, hanno individuato una correlazione fra crescita del letto vasale tumorale ed aumento dell'espressione di VEGF.

Diverse ricerche sostengono l'esistenza di una stretta associazione fra densità vasale intratumorale ed esito infausto in pazienti con cancro al seno (Papetti ed Herman, 2002).

Il nesso fra aumentata espressione del VEGF e sua **rilevanza prognostica** in corso di neoplasie è stato descritto in diverse patologie e da numerosi autori, ricordiamo lavori sul carcinoma polmonare (Volm et al., 1996), carcinoma polmonare a piccole cellule (Laack et al., 2005), carcinoma dello stomaco (Maeda et al., 1996), carcinoma renale (Brown et al., 1993), carcinoma uterino (Guidi et al., 1996).

Oltre all'interesse suscitato dal VEGF nell'ambito dei tumori del tessuto epiteliale, il ruolo di questo fattore di crescita è stato analizzato anche nelle neoplasie mesenchimali. A questo proposito rilevanza particolare hanno ottenuto gli studi sul sarcoma di Kaposi (Brown et al., 1996; Cornali et al., 1996), sull'emangiopericitoma (Hatva et al., 1996), sul glioma maligno (Takano et al., 1996). In un gruppo di cento pazienti affetti da sarcoma, Linder e collaboratori (1998), hanno dimostrato la presenza di livelli di VEGF circolante significativamente alti rispetto al gruppo di controllo (Kuhnen, 2000). Chevalier e collaboratori sostengono che in corso di neoplasia prostatica il VEGF possieda un duplice ruolo: promozione dell'angiogenesi e (vista l'elevata concentrazione di VEGF nelle cellule neuroendocrine prostatiche, e l'aumento di queste ultime in associazione alle forme più avanzate di neoplasia) stimolazione delle cellule tumorali stesse. (Chevalier, 2002). L'espressione del VEGF è stata inoltre ampiamente correlata alla presenza di metastasi. VEGF e

VEGF-C sono stati utilizzati come marker di coinvolgimento linfonodale in corso di “Non-Small Cell Lung Cancer” (Tamura et al., 2004).

Nel cane, Graham e colleghi, hanno dimostrato che la densità vasale mammaria è maggiore nei soggetti con neoplasia mammaria e metastasi, rispetto a quelli presentanti solo il tumore primario ed ai soggetti di controllo (Graham et al., 1999).

Ancora, l'importanza del VEGF nell'angiogenesi tumorale è stata dimostrata attraverso l'utilizzo, in vitro ed in vivo, di molecole ad azione inibitoria. La somministrazione intra-peritoneale di anticorpi anti-VEGF in topi portatori di sarcoma o glioblastoma, ha condotto ad una significativa diminuzione della densità vasale e della crescita tumorale. Nelle cavie, le cellule staminali embrionali private del gene del VEGF perdono, rispetto a cellule staminali controllo, parte della loro capacità di sviluppare teratocarcinoma (Papetti ed Herman, 2002).

In modelli biologici sul topo, la terapia con DC101 (Anticorpo anti VEGFR-2) ha indotto l'inibizione della crescita delle metastasi epatiche in corso di carcinoma colon-rettale. Bruns e collaboratori hanno dimostrato che l'utilizzo di quest'anticorpo, oltre ad inibire il meccanismo angiogenico, si rende responsabile della morte delle cellule endoteliali presenti nella lesione tumorale. Questo risultato testimonia la capacità del VEGF di promuovere, attraverso l'attivazione del VEGFR-2, sia lo sviluppo, sia la sopravvivenza delle cellule endoteliali nelle metastasi epatiche del carcinoma del colon (Bruns et al, 2000).

Considerazioni particolari meritano infine le neoplasie vascolari. Ad oggi numerosi studi hanno cercato di chiarire se, ed in che misura, l'espressione e l'attività biologica del VEGF possano essere coinvolte nell'eziologia delle neoplasie vascolari. Brown e collaboratori hanno dimostrato un aumento dell'espressione di RNAm del VEGF e del VEGFR-2, nelle neoplasie vascolari in vivo (Kuhnem, 2000). Zietz e collaboratori hanno cercato di chiarire il ruolo del proto-oncogene MDM-2 e del gene oncosoppressore P53 nell'ambito dell'angiosarcoma umano. Il loro studio ha evidenziato la presenza di mutazioni a carico di almeno

uno dei due geni nella maggior parte delle neoplasie valutate ed una possibile correlazione fra queste mutazioni e l'aumento dell'espressione del VEGF osservato in circa l'80% dei casi (Zietz et al., 2000). Oltre a P53 e MDM-2, anche i geni Ras sembrano essere coinvolti nello sviluppo delle neoplasie vascolari. Arbiser e collaboratori hanno studiato il ruolo di H-Ras e quello del VEGF nell'induzione del fenotipo maligno dell'angiosarcoma in un modello in vitro di colture cellulari endoteliali. A conferma del potere oncogenico del VEGF, le cellule endoteliali che esprimono VEGF trapiantate nei topi si sono comportate come angiosarcomi a crescita lenta (Arbiser et al., 2000). Le cellule geneticamente modificate con H-Ras invece, hanno indotto nei topi lesioni angiosarcomatose ad accrescimento rapido. Inoltre il trattamento con molecole in grado di inibire la fosforilazione di PI3K (molecola normalmente indotta dall'attivazione del recettore tirosin-chinasico del VEGF) disattiva solo parzialmente il fenotipo maligno e permette d'ipotizzare che Ras possieda diverse vie per indurre la trasformazione maligna delle cellule endoteliali (Arbiser et al., 1997).

Nel cane, Clifford e collaboratori, confrontando le concentrazioni plasmatiche del VEGF di diciassette soggetti sani con quelle di sedici cani affetti da emangiosarcoma, hanno rilevato una significativa differenza fra le concentrazioni plasmatiche di VEGF nelle due popolazioni. Nei cani affetti da emangiosarcoma non è stato tuttavia possibile individuare una correlazione fra concentrazione e progressione della neoplasia. Occorre infine rilevare che, nello stesso studio, le concentrazioni plasmatiche di VEGF sono risultate molto più basse rispetto a quelle riscontrate in altre neoplasie umane (Clifford et al., 2001).

Ancora Clifford ha valutato l'efficacia della terapia antiangiogenica in corso di emangiosarcoma canino in uno studio retrospettivo. Nel suo lavoro l'autore ha sottolineato che sostanze inibenti i meccanismi angiogenici, quali la talidomide, l'interferone e gli inibitori

delle MMPs, sembrano rappresentare un'innovativa e vantaggiosa opzione terapeutica per i cani affetti da questa patologia (Clifford, 2000).

4.2.2. CONSIDERAZIONI RETROSPETTIVE RELATIVE AL RUOLO DIAGNOSTICO E PROGNOSTICO DELLE GELATINASI (METALLOPROTEINASI-2 e -9) NEI TUMORI SOLIDI

La capacità di invadere i tessuti dell'ospite per stabilire dei foci distanti dalla lesione primaria è la caratteristica predominante delle cellule metastatiche. Il rilascio di cellule neoplastiche in partenza da un tumore è il risultato di una profonda degradazione dell'architettura tessutale (Munsi, Stach, 2006). Questa degradazione si realizza attraverso alterazioni del contatto che normalmente esiste fra cellule contigue e fra cellula e matrice extracellulare (ECM), attraverso riarrangiamento del citoscheletro ed amplificazione dei meccanismi proteolitici cellulari. Questi fenomeni e molti altri, sono regolati da un ampio spettro di proteinasi extracellulari, ed in particolare MMPs, prodotte da cellule neoplastiche, da cellule infiammatorie e da fibroblasti presenti nel tessuto peri-tumorale (Nagase et al., 2006).

Per quel che concerne la clinica oncologica sarebbe tuttavia limitativo considerare le MMPs, e fra loro le Gelatinasi, esclusivamente legate a fenomeni di degradazione e rimodellamento tessutale (Hamacher et al 2004), anche se questo è stato a lungo considerato il loro ruolo principale nei meccanismi evolutivi dei tumori solidi.

Nell'ambito neoplastico, in medicina umana, l'elevata espressione delle gelatinasi è stata infatti inizialmente correlata alla capacità di diverse neoplasie epiteliali di invadere i tessuti circostanti. Si possono citare a questo riguardo il lavoro di Ohashi e collaboratori (2000) inerente l'incremento di MMP-9 in corso di carcinoma esofageo, il lavoro di Kuraharae e colleghi (1999) che ha correlato positivamente carcinoma a cellule squamose della bocca e sovra-espressione di

entrambe le gelatinasi e lo studio sul carcinoma della vescica e MMP-2 di Kanayama e collaboratori (1998). Ancora, fra le neoplasie epiteliali si ricorda il carcinoma papillare della tiroide, nel quale alte concentrazioni di MMP-2 e MMP-9 sono state significativamente correlate alla capacità del tumore di metastatizzare a livello linfonodale (Sang-Oh Yoon, 2003). Più recentemente, Gress e collaboratori hanno evidenziato incremento delle concentrazioni di MMPs in corso di neoplasia pancreaticata ed Iwata e collaboratori hanno sottolineato la significativa presenza di queste proteinasi e dei loro inibitori in corso di carcinoma del seno (Laack et al, 2005).

In ambito neurologico infine, elevate concentrazioni di gelatinasi sono state evidenziate nel liquido cefalorachidiano in corso di astrocitoma maligno, metastasi cerebrali e meningiti carcinomatose (Friedberg et al., 1998).

Come precedentemente accennato, nuovi studi hanno evidenziato la capacità delle MMPs di promuovere la crescita tumorale anche attraverso il clivaggio o la bio-attivazione di substrati *non di matrice* (fattori di crescita latenti, ***molecole pro ed anti-angiogeniche***, recettori cellulari, molecole d'adesione). Sono questi substrati alternativi, MMPs-mediati, ad indurre nelle cellule dell'ospite le risposte necessarie a consentire la crescita neoplastica (Sang-Oh Yoon, 2003).

Per chiarire il ruolo delle gelatinasi nell'ambito dei meccanismi propriamente angiogenici, sono stati condotti numerosi studi in vitro ed in vivo. Bergers e colleghi hanno evidenziato come, in topi transgenici, durante i meccanismi carcinogenici delle isole pancreatiche uno switch angiogenico attivasse la vascolatura quiescente. Nelle lesioni angiogenetiche è stata evidenziata *up-regulation* di entrambe le gelatinasi. Successivamente, in un esperimento correlato, gli stessi autori hanno dimostrato la capacità della MMP-9 di rendere angiogeniche le isole pancreatiche neoplastiche attraverso il rilascio e l'attivazione di VEGF (Bergers et al., 2000).

Disturbi dell'angiogenesi sono stati evidenziati attraverso *knockout genetico* in topi privati di MMP-2 e MMP-9, mentre, ancora, progressione dell'angiogenesi tumorale è stata evidenziata in modelli neoplastici in cui i topi presentavano iper-espressione di entrambe le gelatinasi (Overall and Kleinfeld, 2006).

Una combinazione di “marker angiogenici prognostici” comprendenti MMP-9 e VEGF, o MMP-9, VEGF e VEGF-C è stata proposta recentemente in Medicina Umana nello studio dei meccanismi metastatici del carcinoma polmonare a piccole cellule (Laack et al., 2005; Tamura et al., 2004).

Infine, studi condotti nel cane hanno messo in luce il ruolo neoangiogenico delle gelatinasi in corso di neoplasia mammaria (Kaway et al., 2006), di tumori oronasali (Nakaichi, et al., 2007) e mastocitoma (Leibman et al., 2000), mentre Turba e collaboratori hanno valutato le concentrazioni delle gelatinasi nel liquido cefalo rachidiano di cani affetti da patologie del sistema nervoso centrale. Nei soggetti studiati è stata evidenziata una maggiore attività di MMP2 e MMP9 in soggetti con lesioni occupanti spazio (di verosimile natura neoplastica) rispetto ai soggetti con diagnosi di epilessia idiopatica (Turba et al., 2007).

4.3 NEOANGIOGENESI E NEOPLASIE EMOPROLIFERATIVE

4.3.1 LE NEOPLASIE EMOPROLIFERATIVE

Le cellule ematopoietiche possono essere coinvolte in due ampi gruppi di malattie neoplastiche, uno di tipo mieloproliferativo, l'altro linfoproliferativo. Il primo gruppo comprende neoplasie delle cellule ematopoietiche progenitrici e delle cellule della serie granulocitaria, monocitaria, eritrocitaria e megacariocitaria. Il secondo gruppo riguarda neoplasie delle cellule della linea linfocitaria e immunoblastico plasmocellulare. Il linfoma (manifestazione linfoproliferativa neoplastica

primaria degli organi linfatici), rappresenta in tutti i mammiferi domestici la neoplasia dei tessuti emopoietici più frequente (Marcato, 1997).

4.3.2. CONSIDERAZIONI RETROSPETTIVE RELATIVE AL RUOLO DIAGNOSTICO E PROGNOSTICO DEL VEGF E DELLE GELATINASI NELLE NEOPLASIE EMOPOIETICHE

4.3.2.1 VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR

La possibile diffusione delle cellule neoplastiche emopoietiche all'interno del midollo osseo e la loro capacità di aver accesso diretto alla circolazione periferica, hanno inizialmente messo in dubbio e reso oscuro il legame esistente fra fattori di crescita vasale e neoplasie mielo/linfoproliferative (List, 2001).

Sebbene la maggior parte degli studi effettuati sull'angiogenesi neoplastica ed in particolare sul ruolo del VEGF, si siano sviluppati nell'ambito dei tumori solidi, l'iniziale sospetto dell'esistenza di un precursore comune fra cellule endoteliali ed emopoietiche in grado di esprimere il VEGFR-2, ha posto le basi per un'approfondita comprensione del meccanismo neoangiogenico in corso di neoplasie emopoietiche.

In particolare, ad oggi, in medicina umana, è stata ampiamente dimostrata l'importanza dei fattori pro-angiogenici nei meccanismi patofisiologici di leucemie linfocitiche e mielocitiche, mieloma multiplo linfoma *non Hodgkin* ed *Hodgkin* (List, 2001).

La densità media dei microvasi (MVD), valutata su sezioni di midollo osseo, attraverso l'utilizzo di anticorpi in grado di legare antigeni vasali quali il fattore VIII, il CD34 e la trombomodulina, risulta notevolmente aumentata in diverse neoplasie emopoietiche. La MVD è apparsa significativamente elevata rispetto a soggetti sani, non solo nell'ambito di neoplasie emopoietiche, ma anche in corso di sindromi mielodisplastiche. Nelle leucemie mieloidi acute inoltre, la diminuzione della MVD è stata correlata positivamente al successo progressivo delle

sedute di chemioterapia. Ancora, valutazioni eseguite sul midollo osseo di soggetti affetti da leucemia linfocitica acuta hanno evidenziato l'aumento della densità vasale midollare, associandolo a complesse e ramificate architetture vasali. Aumenti della MVD sono stati infine evidenziati nel midollo osseo di pazienti colpiti da **leucemie croniche, patologie mieloproliferative e mieloma multiplo** (Giles, 2001).

Oltre alla valutazione della densità microvasale midollare, anche la presenza di VEGF e di altri fattori pro-angiogenici, è stata considerata e studiata come possibile *marker* angiogenico in corso di malattia mielo o linfoproliferativa. Studi eseguiti su linee cellulari ematopoietiche neoplastiche umane hanno dimostrato la presenza dell'RNA messaggero del VEGF, dell'RNA messaggero del Fibroblast Growth Factor β (FGF β) o di entrambi, in tutte le linee valutate. La presenza del VEGFR-1 in circa la metà delle linee cellulari esaminate ha permesso inoltre di dimostrare come il VEGF stimoli le cellule neoplastiche emopoietiche attraverso un meccanismo di tipo autocrino. Oltre a questa modalità, il VEGF sembra in grado di potenziare il processo neoangiogenico anche attraverso l'induzione paracrina di altre citochine e fattori di crescita, per esempio il Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF), Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating factor (GM-CSF) ed Interleukin-6 (IL-6) (List, 2001).

Aguayo e collaboratori hanno svolto un'indagine su 417 soggetti portatori di patologie emolinfoproliferative, evidenziando un aumento dei livelli di VEGF nei soggetti affetti da **leucemia mieloide acuta** e da **sindromi mielodisplastiche**. Questo studio ha permesso d'individuare una proporzionalità diretta fra VEGF e MVD ed inoltre una correlazione fra le concentrazioni sieriche di VEGF e ridotti tempi di sopravvivenza, intervallo libero da malattia, maggior numero di globuli bianchi e maggior presenza di cellule immature. Sempre gli stessi autori hanno valutato la rilevanza clinica del VEGF nell'ambito delle leucemie linfocitiche croniche. In uno studio che coinvolgeva 225 pazienti colpiti da **leucemia linfocitica cronica**, il valore medio intracellulare del VEGF

(valutato nelle cellule neoplastiche presenti nel sangue periferico) è risultato circa sette volte più elevato che nei soggetti controllo (Giles, 2001).

Nel **linfoma non-Hodgking**, elevati livelli di fattori di crescita vasale sono stati associati a prognosi infauste (Salve net al., 1997). Il maggior potere prognostico, tuttavia si è osservato in presenza di un concomitante aumento delle concentrazioni sieriche sia del VEGF, che del FGF- β . Sempre in corso di linfoma *non-Hodgking*, il confronto fra i sieri dei pazienti, prima e dopo la terapia, ha inoltre evidenziato la progressiva diminuzione delle concentrazioni del VEGF, mentre nessun cambiamento significativo si è verificato per gli altri fattori valutati (FGF- β ed hepatocyte growth factor (HGF)). Diversamente nel **linfoma di Hodgking** la variazione fra le concentrazioni pre e post-terapia si è verificata solo per gli altri fattori di crescita, mentre il VEGF si è mantenuto costante. Questi risultati suggeriscono come nell'ambito delle diverse neoplasie emoproliferative, ed in particolare nel linfoma di Hodgking e nel linfoma non-Hodgking, i fattori di crescita vasale possiedano un ruolo distinto e variabile e purtroppo ancora difficilmente comprensibile (Giles, 2001).

Per quanto concerne il **mieloma multiplo (MM)**, diversi studi hanno dimostrato un significativo aumento della densità vasale midollare (DVM) in soggetti affetti. Questo aumento della DVM sembra essere correlato all'espressione, da parte delle cellule endoteliali coinvolte, di importanti proteine angiogeniche quali VEGF e HGF. Il calo delle concentrazioni sieriche durante la chemioterapia di VEGF, HGF, FGF- β e dell'IL-6 in 67 pazienti colpiti da Mieloma Multiplo è stato positivamente correlato all'efficacia della chemioterapia stessa (Iwasaki, 2001). Infine, sempre in soggetti affetti da mieloma multiplo, Schreiber e collaboratori hanno suggerito l'esistenza di un legame diretto fra mutazioni cromosomiche ed angiogenesi. Da un loro studio è infatti emerso come la delezione del cromosoma 13q (associata in genere ad un esito infausto della patologia), sia correlabile ad una maggior densità

vasale midollare ed ad un maggior livello di VEGF (Salven, 2001).

In conclusione, sebbene numerose e recenti pubblicazioni riportino risultati che testimoniano l'effettivo coinvolgimento del meccanismo neoangiogenico, ed in particolare del VEGF, nello sviluppo delle neoplasie emoproliferative, non esistono ancora dati consistenti per poter affermare l'assoluta utilità prognostica della determinazione sierica di VEGF, né in grado di spiegare con chiarezza l'effettivo ruolo di questo fattore di crescita nello sviluppo e nella prognosi delle neoplasie emolinfoproliferative.

4.3.2.2 GELATINASI (MMP-2 -9)

Per quel che riguarda le gelatinasi (MMP-2 e -9) ed il loro ruolo nelle neoplasie emolinfoproliferative, si ripropongono complessità ed ambivalenze precedentemente considerate per il VEGF ed evidenziate, per questi *marker,s* anche nell'ambito dei tumori solidi.

Le maggiori difficoltà nel comprendere il ruolo di queste molecole sembrano nascere proprio in relazione al loro meccanismo angiogenetico. Negli ultimi anni, in seguito al non completo successo terapeutico di molecole inibitrici delle MMPs, si è fatta strada l'ipotesi (oggi confermata) di una loro ambivalenza di ruolo (Overall, Kleinfeld, 2006). Il dualismo delle MMPs nell'ambito angiogenetico si riconduce in parte alla loro capacità di rendere biodisponibili precursori **pro-** ed **anti-angiogenici** (quali VEGF; FGFβ o plasminogeno) ed è ampiamente testimoniato da diversi studi condotti nell'ambito delle neoplasie emolinfoproliferative.

Relativamente alle loro funzioni nel complesso meccanismo delle neoplasie emolinfoproliferative, particolare rilievo è stato dato al ruolo multi-fattoriale (crescita tumorale, angiogenesi, *homing* delle cellule neoplastiche, lesioni osteolitiche) delle gelatinasi in corso di **mieloma**

multiplo (MM). In pazienti affetti da MM cellule stromali midollari secernono elevate concentrazioni di MMP-2.

Entrambe le gelatinasi sono inoltre evidenziabili nelle plasmacellule midollari dei soggetti affetti, in concentrazioni significativamente maggiori rispetto ai soggetti controllo (Malemud, 2006; Van Valckenborgh et al., 2004).

Nel **linfoma non Hodgkin** (NHL) l'espressione della gelatinasi B e dell'inibitore della stessa (TIMP) appaiono significativamente correlate ad una prognosi infausta (Kossakowska et al., 2000; Sakata et al., 2003).

Diversamente, nell'**Hodgkin linfoma**, Kuittinen e collaboratori (2002) hanno valutato l'espressione di entrambe le gelatinasi, correlandole alla vascolarizzazione neoplastica presente, ed alla progressione della patologia. Attraverso uno studio su 67 pazienti gli autori hanno dimostrato come l'intensa espressione di ognuna delle gelatinasi sia associabile a diversi *pattern istologici* ed ad una diversa prognosi, (favorevole per la gelatinasi A, od infausta, nel caso della gelatinasi B) (Kuittinen et al., 2002).

Infine nella **leucemia linfocitica cronica** a cellule B (B-CLL), la MMP-9 sembra possedere un ruolo chiave nell'invasione cellulare e nella migrazione transendoteliale (Ridondo-Muniz et al., 2006).

Restringendo il campo di studio al cane, attualmente, è presente una sola pubblicazione che abbia valutato l'espressione delle MMPs in corso di neoplasia emolinfoproliferativa. Lo studio è stato condotto presso il Dipartimento Clinico dell'Università di Medicina Veterinaria di Bologna e comprende parte dei dati utilizzati in questa tesi sperimentale. Nel lavoro, pubblicato nel 2005, gli autori hanno effettuato una valutazione combinata di VEGF e gelatinasi in un gruppo di 51 cani affetti da linfoma multicentrico, evidenziando una correlazione significativa fra i tre parametri ed il WHO (World Health Organization) **sottostadio b** della patologia e fra il VEGF e l'intervallo libero da malattia nei soggetti sottoposti a chemioterapia (Gentilini et al, 2005).

CAPITOLO CINQUE

CAMPIONAMENTO E MISURAZIONE DEL VEGF EMATICO

5.1. INTRODUZIONE

In considerazione del ruolo determinante dell'angiogenesi per la progressione della patologia neoplastica, non stupisce come negli ultimi decenni, diversi studi abbiano valutato l'importanza diagnostica della determinazione della concentrazione del VEGF circolante. Nonostante in numerosi di questi lavori sia emerso un significato prognostico del VEGF certamente rilevante, la notevole variabilità e disomogeneità dei valori osservati, sia in condizioni fisiologiche che patologiche, ne hanno precluso a lungo l'applicazione clinica routinaria.

Nel corso degli ultimi anni si è compreso che tali discrepanze sono attribuibili ai limiti ed alle caratteristiche delle tecniche analitiche utilizzate ed anche a differenze metodologiche sia nella fase di campionamento, che di processazione dei campioni biologici (Dittadi et al., 2001).

La seguente trattazione è volta a chiarire brevemente la scelta fatta dagli autori riguardo la matrice utilizzata per la valutazione della concentrazione ematica di VEGF in questo lavoro sperimentale.

5.2 RACCOLTA DEL CAMPIONE

Il VEGF ematico ha un'origine multicompartimentale. Nel sangue il VEGF può essere presente in forma solubile oppure legato e trasportato da elementi nucleati circolanti (linfociti, granulociti e monociti) e in misura significativa dalle piastrine. I livelli ematici di VEGF quindi,

rappresentano un pool di diversa origine e la sua concentrazione in vitro risulta fortemente condizionata dal tipo di matrice utilizzata: sangue in toto in diversi anticoagulanti, siero, plasma-EDTA, plasma sodio-citrato, plasma-CTAD (citrato-teofllina-dipyridamolo-adenosina), plasma poor platelet, plasma rich platelet. La modalità ed i tempi di processazione del campione (sieraggio, centrifugazione, refrigerazione) rappresentano ulteriori variabili. Negli studi effettuati sino ad oggi, il VEGF è stato misurato prevalentemente su siero, meno frequentemente su plasma o sangue in toto (Dittadi, 2001).

Come precedentemente accennato, fra i componenti ematici coinvolti nella liberazione del VEGF, globuli bianchi e piastrine sembrano possedere un ruolo fondamentale (Dittadi et al., 2001).

Le concentrazioni sieriche di VEGF sono maggiori nel siero rispetto al plasma in seguito alla liberazione del fattore angiogenico da parte delle piastrine; in soggetti normali la quantità di VEGF rilasciata da queste cellule è di circa 2,8 pg/ml ogni dieci milioni di piastrine (Clifford et al., 2001). Numerosi lavori riportano l'esistenza di una correlazione diretta fra conta piastrinica e VEGF sierico (Zimmermann et al., 2005). Verheul e collaboratori sostengono che le concentrazioni di VEGF sierico riflettano la conta piastrinica piuttosto che la crescita tumorale; Maloney e collaboratori (1998) dimostrano una chiara associazione fra aggregazione piastrinica in vitro e rilascio di VEGF; Gunsilius e collaboratori, ancora, sostengono che le piastrine siano la principale fonte di VEGF nei campioni di siero (Dittadi et al., 2001).

In molti di questi lavori si sostiene che l'origine piastrinica del VEGF circolante ne pregiudichi l'effettiva utilità nella valutazione prognostica in corso di neoplasia. A questo proposito, studi effettuati sulle diverse procedure di campionamento hanno evidenziato come il tempo trascorso fra il prelievo e la separazione del siero dalla componente cellulare, rappresenti un punto critico per la valutazione sierica del VEGF (Dittadi et al., 2001). Diversi sono i dubbi sulla quantità di VEGF piastrinico liberata durante la coagulazione del

campione ed inoltre recentemente, Tezono e colleghi hanno dimostrato come durante questo processo parte del VEGF possa essere trattenuto all'interno del coagulo di fibrina (Temono et al., 2001).

Alcune pubblicazioni sottolineano la maggior accuratezza del VEGF plasmatico rispetto a quello sierico nella discriminazione fra pazienti affetti da neoplasie e soggetti sani. Le piastrine modulano però la concentrazione di VEGF anche nel plasma. E' possibile infatti ottenere diverse concentrazioni di VEGF plasmatico in funzione del grado di attivazione piastrinica presente nel campione. L'attivazione piastrinica nel plasma è condizionato da molteplici fattori ed in particolare dal tipo di anticoagulante utilizzato (Zimmermann et al., 2005).

Banks e collaboratori descrivono e comparano una serie di procedure per la determinazione del VEGF circolante, concludendo che il campione ottimale è rappresentato dal plasma sodio citrato processato entro un'ora dal prelievo. Wynendaele e collaboratori (1999) raccomandano invece l'utilizzo di plasma CTAD correlando questa matrice con la minore espressione di PF4 (Platelet Factor-4, marker antigenico solubile ed indice dell'aggregazione piastrinica). Nel plasma citrato la concentrazione di PF4 risulta significativamente superiore a quella presente nel plasma CTAD e questo ovviamente implica una maggiore liberazione in vitro di VEGF. Nello stesso lavoro, inoltre, gli autori introducono l'utilità diagnostica del platelet poor plasma (Wynendaele et al., 1999; Dittadi et al., 2001).

L'evidenza che nel siero parte del VEGF derivi dall'attivazione piastrinica non spiega tuttavia perché nei soggetti affetti da neoplasie, rispetto ai soggetti sani, a parità di conta piastrinica, vi siano concentrazioni di VEGF significativamente più elevate e perché tali concentrazioni siano correlabili all'estensione della patologia.

Pubblicazioni recenti hanno dimostrato che le piastrine possono aumentare il loro contenuto di VEGF in modo proporzionale alla progressione e crescita del tessuto tumorale. Nelle piastrine e nei loro precursori sono stati identificati l'RNAm del VEGF, il VEGF stesso e

l'RNAm di entrambi i recettori tirosin chinasi, flt-1 ed flk-1; in particolare il VEGF sembra localizzato, unitamente ad altre glicoproteine (per esempio PDGF, PF-4, trombospondina), negli α granuli. E' noto come, in seguito ad attivazione piastrinica, i granuli si muovano verso il centro delle piastrine e si fondano con la superficie del sistema canalicolare, liberando nell'ambiente circostante il loro contenuto. Citochine trombopoietiche, trombopoietina, IL-3 ed IL-6 aumentano la secrezione del VEGF da parte dei megacariociti, inoltre l'IL-6 (secreta anche da cellule neoplastiche) sembra in grado di aumentare l'espressione di VEGF nei precursori piastrinici. Non tutte le proteine presenti negli α granuli sono però sintetizzate solamente ex novo nei megacariociti, questi e le piastrine infatti, sembrano in grado d'incorporare molecole attraverso meccanismi di endocitosi (Dittadi et al., 2001).

In conclusione, ad oggi, la fonte principale di VEGF nel sangue periferico rimane da determinare (Zimmerman et al., 2005); la presenza del VEGF nei diversi componenti ematici può avere diversi significati clinici e biologici e proprio per questo risulta fondamentale la standardizzazione del prelievo (Dittadi et al., 2001), tuttavia l'aumento delle concentrazioni sieriche di VEGF riscontrato nei processi neoplastici sembra altamente correlabile ad un aumento del contenuto di VEGF piastrinico. L'aumento del VEGF nelle piastrine in corso di neoplasia appare riconducibile ad un'amplificazione dell'espressione della proteina nei precursori midollari ed ad un concomitante aumento dell'endocitosi del VEGF in piastrine e megacariociti (Dittadi, 2001). L'osservazione di una ridotta crescita tumorale in cavie trombocitopeniche rispetto a cavie controllo (con conta piastrinica nella norma), rappresenta inoltre una seconda prova a favore del ruolo attivo e fondamentale delle piastrine nella biologia del processo neoplastico (Salgano et al., 2001).

CAPITOLO SEI

PROTEINA C REATTIVA E LATTATO DEIDROGENASI NEL LINFOMA CANINO

6.1 INTRODUZIONE

Secondo pubblicazioni recenti i cani affetti da linfoma sembrano presentare, in relazione al protocollo farmacologico utilizzato, una percentuale di remissione variabile dal 75 al 90% ed un periodo medio di sopravvivenza compreso fra i 6 ed i 15 mesi (Dobson 2004).

Tuttavia, sebbene la maggior parte degli studi clinici effettuati consideri il linfoma multicentrico canino come un'unica entità patologica, fra i soggetti affetti esiste una consistente differenza di risposta al trattamento clinico. Alcuni pazienti evidenziano una veloce e durevole remissione dalla sintomatologia, altri recidivano sviluppando farmaco resistenza, in altri cani ancora la neoplasia rimane stabile o progredisce nonostante la terapia. Questo suggerisce l'esistenza di diversi tipi e sottotipi di linfomi e di diverse e molteplici variabili in grado di influenzare il comportamento biologico del tessuto tumorale, dell'ospite ed in conclusione la risposta alla chemioterapia (Dobson 2004).

Diversi tentativi sono stati condotti sino ad oggi per evidenziare possibili fattori predittivi della risposta alla chemioterapia o della prognosi in cani affetti da linfoma multicentrico (Kiupel et al., 1999; Baskin et al 2000). Diversi gli ambiti della medicina veterinaria in cui questi tentativi e studi sono stati effettuati: clinico, clinico-patologico, anatomo-patologico, molecolare e genetico.

Fattori legati al paziente quali età, genere, razza, peso e stato riproduttivo sono stati valutati ripetutamente, e solo saltuariamente correlati alla prognosi del soggetto (per esempio razza pastore tedesco e

peso superiore ai 18 chili rappresentano variabili correlate a prognosi infausta in uno studio effettuato da Garrett e colleghi nel 2002); diversamente, invece, sembrano esistere costanti correlazioni fra prognosi e sottostadio clinico del paziente (in accordo con il WHO staging system) (Jagielsky et al, 2002), indice mitotico, immunofenotipo ed, in oncologia umana, correlazioni fra prognosi ed altri complessi marker cellulari e molecolari (Dobson 2004).

Proprio in medicina umana, negli ultimi 15 anni l'approccio al linfoma non Hodgkin (NHL) è notoriamente cambiato, grazie al riconoscimento di fattori prognostici indipendenti che hanno condotto alla nascita di un modello ed indice prognostico predittivo: l'International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Index (IPI).

In conclusione, mentre da un punto di vista istologico si sta facendo strada anche in medicina veterinaria una classificazione (sulla traccia della classificazione Kiel utilizzata in medicina umana) in grado di facilitare la comprensione del comportamento neoplastico (Ponce et al., 2004), dal punto di vista clinico, sembra ancora molto lontana la costituzione di un valido indice prognostico atto a sostenere l'oncologo veterinario ed i proprietari nella scelta del trattamento ideale del cane affetto da linfoma (Dobson 2004).

Scopo dei seguenti paragrafi è quello di introdurre brevemente al lettore alcuni fra i promettenti, ma ad oggi contraddittorii, marker prognostici sierici di linfoma canino.

6.2 *PROTEINA C-REATTIVA E LINFOMA CANINO*

Quando in medicina, umana e veterinaria, ci si riferisce alla “risposta di fase acuta” si sottintende una reazione complessa e non specifica che si realizza nell’organismo in seguito ad ogni tipologia di insulto tessutale, sia esso di natura traumatica, infettiva, immunologica, neoplastica od altro (Ceròn et al., 2005).

La risposta di fase acuta è un evento parafisiologico strettamente regolato da citochine pro-infiammatorie e rappresenta una condizione caratterizzata da eventi sistemici quali ipertermia, leucocitosi, alterazioni ormonali e metaboliche, oltre che dalla variazione della concentrazione di alcune proteine plasmatiche (proteine “infiammatorie” di fase acuta, APPS) fra le quali ricordiamo la proteina C-reattiva (CRP) (Cèron et al., 2005).

L’IL-6 è una citochina pleiotropica prodotta da cellule endoteliali, monociti, osteoclasti, fibroblasti e linfociti B e T, e possiede un ruolo fondamentale nei processi infiammatori unitamente ad IL-1 e TNF- α , inducendo la sintesi da parte degli epatociti delle APPs e nello specifico della CRP (Legouffe et al., 1998; Petersen et al., 2004).

Negli ultimi decenni diverse ricerche scientifiche hanno evidenziato l’importanza dell’IL-6 nell’ambito neoplastico. Per quel che riguarda il linfoma non Hodgkin (NHL) la concentrazione plasmatica di questa citochina è stata significativamente correlata a linfomi ad alto grado di malignità ed, in questa popolazione, alla sopravvivenza dei soggetti affetti (Legouffe et al., 1998).

Questo fatto ha portato diversi autori a ricercare la correlazione esistente fra IL-6 e concentrazioni sieriche di proteina C-reattiva in diverse tipologie di tumori solidi (Carcinoma Renale: Blay e colleghi, 1992) e malattie emolinfoproliferative (MM: Bataille e colleghi, 1992) (Legouffe et al., 1998). In medicina umana, diversi studi hanno proclamato l’utilità della CRP quale prezioso e fruibile marker prognostico in corso di NHL. Nell’ambito di questa patologia, la concentrazione sierica di CRP è stata

correlata significativamente non solo all' espressione di IL-6, ma anche ad altri importanti marker prognostici, quali concentrazione di LDH e sottostadio clinico della malattia (Legouffe et al., 1998). Ancora, Byen e colleghi (1999) hanno correlato positivamente la minor concentrazione circolante di CRP in pazienti affetti da Hodgkin Linfoma (HL) e NHL ad una migliore risposta alla terapia farmacologica (Legouffe et al., 1998).

In medicina veterinaria le proteine di fase acuta rappresentano una realtà appena più che recente (essenzialmente Europea), ed in totale evoluzione. Rare le pubblicazioni che ad oggi hanno sondato una possibile correlazione fra concentrazione ematica delle proteine di fase acuta e neoplasie.

Nei tre lavori ad oggi consultabili relativi all'argomento CRP-linfoma canino (Tecles et al, 2005; Mischke et al, 2006; Merlo et al, 2007), la concentrazione di questa proteina sembra significativamente aumentata nei cani portatori della patologia rispetto agli animali controllo. Inoltre, nei soggetti affetti da linfoma multicentrico valutati in corso di chemioterapia la concentrazione plasmatica di CRP pre-trattamento sembra essere significativamente più elevata rispetto alla stessa dopo la fase di induzione chemioterapica (Merlo et al., 2007).

I dati emersi da questi studi risultano ancora estremamente eterogenei ed a causa del ristretto numero di soggetti valutati, rimangono molti gli interrogativi riguardo il consapevole utilizzo di questo marker nella valutazione e nel monitoraggio del cane affetto da linfoma multicentrico.

6.3 LATTATO DEIDROGENASI (LDH) E LINFOMA CANINO

In oncologia umana l'aumento delle concentrazioni sieriche di LDH è comunemente correlato alla crescita tumorale ed all'aggressività del processo neoplastico in atto. Maggiori concentrazioni di LDH sono associate a prognosi infauste in diverse neoplasie quali melanoma,

adenocarcinoma del polmone, carcinoma colon-rettale, MM e Leucemia Linfocitica Acuta (ALL) (Bouafia et al., 2004). Nell'ambito delle neoplasie emolinfoproliferative, la concentrazione sierica totale di LDH risulta correlata positivamente a fenotipi cellulari immaturi e di conseguenza a meccanismi di resistenza farmacologica e maggior aggressività tumorale (Swan et al., 1989). Per quel che concerne il NHL, la concentrazione sierica di LDH costituisce uno dei parametri dell'International Prognostic Index (Bouafia et al., 2004).

In medicina umana, nonostante la scoperta di nuovi marker, l'LDH continua a rappresentare argomento di approfondimento e studio, e negli ultimi anni l'attenzione dei ricercatori si è focalizzata sulle diverse isoforme di questo enzima. L'espressione dei vari isoenzimi e nello specifico l'aumento dell'isoforma LDH3 sembrano parametri statisticamente correlabili con il tempo di sopravvivenza dei pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin indipendentemente dalla concentrazione sierica totale di LDH (Bouafia et al., 2004).

In medicina veterinaria l'incremento della concentrazione di LDH è stato studiato in cani affetti da forme leucemiche (Leifer and Matus, 1986) ed in gatti con diagnosi di disordini linfoproliferativi (Bracco et al., 1992). Nel linfoma canino i dati attualmente presenti in letteratura appaiono non perfettamente concordanti: inizialmente Bezzecchi e colleghi (1979) hanno ipotizzato che nel cane, un incremento di LDH possa essere correlabile alla patologia neoplastica, successivamente Greenlee e colleghi (1990) non hanno individuate alcuna correlazione fra elevate concentrazioni di questo enzima e stadio clinico o tempo di sopravvivenza, ed infine Abate, Zanatta e collaboratori (1997 e 2003) hanno evidenziato in un campione di cani affetti da linfoma un aumento delle isoforme 2 e 3 dell'enzima. I medesimi autori hanno inoltre tentato di valutare l'utilità del monitoraggio clinico dell'LDH nei cani durante il trattamento chemioterapico. In quest'ultimo studio una differenza significativa fra il gruppo dei soggetti affetti e quelli controllo si è potuta evidenziare solo nelle isoforme -2 e -3 e non nella concentrazione sierica

totale di LDH, tuttavia sembra interessante constatare come l'incremento della concentrazione sierica di LDH-2 e -3 abbia un'importanza significativa non solo nei pazienti valutati all'ammissione, ma anche nel gruppo dei soggetti analizzati durante la recidiva della patologia (Zanatta et al., 2003). Alla luce di questi risultati e del ruolo fondamentale dell'LDH in oncologia umana risulta evidente come questo enzima, una volta contestualizzato chiaramente, possa costituire un semplice ed economico marker clinico patologico anche per il paziente veterinario.

CAPITOLO SETTE

MATERIALI E METODI

7.1 INTRODUZIONE

Considerato l'interessante spunto offerto dal VEGF nell'ambito del linfoma canino ed il suo ruolo ancora contenzioso quale indicatore prognostico in oncologia veterinaria, in questo studio sperimentale si è voluta approfondire l'importanza predittiva di questo fattore di crescita in cani affetti da linfoma non Hodgking afferenti al Dipartimento Clinico della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bologna. Il lavoro è stato condotto in parte retrospettivamente, in parte prospettivamente, utilizzando campioni di siero e plasma citrato dei pazienti seguiti presso il servizio di oncologia della Facoltà nell'arco degli ultimi sei anni. Parte dei risultati ottenuti in questo studio sono stati utilizzati per la stesura di un articolo pubblicato dagli Autori nel 2005 (Gentilini et al., 2005) (Appendice 1). Lo studio preliminare sul quale il seguente lavoro è stato sviluppato è descritto nella tesi di laurea del candidato (Agnoli, 2003). Parte dei risultati ottenuti precedentemente nei due lavori, ma non ripetuti in questa sperimentazione, saranno discussi in seguito.

Le concentrazioni sieriche di VEGF dei pazienti che hanno partecipato alla ricerca sono state studiate unitamente ad altri possibili fattori prognostici: attività delle gelatinasi, emoglobina (Hb), Lattato Deidrogenasi (LDH), Proteina C Reattiva (CRP). Lo studio è stato articolato su tre diversi livelli. Nel corso della prima parte di questo lavoro sperimentale i marker sopra elencati sono stati valutati e confrontati nella popolazione "linfoma" e in un campione controllo. Secondariamente, gli stessi fattori sono stati correlati, nell'ambito della popolazione affetta, al sottostadio clinico della patologia presente all'ammissione. Infine, limitatamente ai pazienti sottoposti a trattamento

chemioterapico, le concentrazioni di questi parametri sono state correlate all'intervallo libero da malattia.

7.2 CONTRIBUTO CASISTICO E DESCRIZIONE DEL CAMPIONE

In questo lavoro sono state valutate le concentrazioni sieriche di VEGF di settantatre cani affetti da linfoma non Hodgking condotti a visita presso il Dipartimento Clinico Veterinario dalla primavera del 2000 sino alla primavera del 2006. Dei 73 soggetti, 32 erano femmine (di cui 7 sterilizzate) e 41 maschi (di cui 2 castrati). Classificando i cani in base alla razza di appartenenza 17 erano pastori tedeschi, 15 meticci, 7 boxer, 5 dobermann, 4 labrador, 3 setter inglesi, 2 setter irlandesi, 2 west highland white terrier e 2 pastori maremmani; completavano il campione 1 alano, 1 terranova, 1 bovaro del bernese, 1 pastore belga, 1 lupo cecoslovacco, 1 rottweiler, 1 american staffordshire terrier, 1 samoiedo, 1 chow chow, 1 border collie, 1 epagneul breton, 1 segugio italiano, 1cocker spaniel, 1 schnauzer nano, 1 bull terrier, 1 shi-tzu. L'età dei soggetti era compresa fra i 2 ed i 18 anni circa, con un'età media di 8 anni e 2 mesi. Sedici soggetti sani, scelti fra i cani donatori della banca del sangue del Dipartimento Clinico Veterinario sono stati utilizzati come gruppo controllo.

Dei 73 cani inclusi nello studio 56 erano affetti da linfoma multicentrico, 15 da linfoma extra nodale (linfoma intestinale, linfoma cutaneo, linfoma mediastinico), 2 soggetti erano affetti da linfoma MALT.

Fra gli animali affetti da linfoma compresi nello studio è stato possibile individuare diversi sottogruppi in relazione allo stadio clinico ed al sottostadio evidenziati nel paziente al momento dell'arrivo. La stadiazione clinica dei 73 soggetti è stata effettuata utilizzando lo *Staging*

System per il linfosarcoma WHO (World Health Organization). In base a questa classificazione il linfoma è suddivisibile in 5 stadi:

- I. Coinvolgimento di un solo linfonodo o del tessuto linfoide di un solo organo;
- II. Coinvolgimento di più linfonodi di una determinata area, limitatamente a questa;
- III. Coinvolgimento linfonodale generalizzato;
- IV. Coinvolgimento di fegato e/o milza, con o senza coinvolgimento linfonodale (stadio III);
- V. Manifestazioni della neoplasia nel sangue periferico con coinvolgimento del midollo osseo e/o coinvolgimento di altri organi non linfoidi (indipendentemente dalla presenza degli altri stadi).

Ogni stadio è a sua volta suddivisibile nei sottostadi **b** ed **a** in relazione alla presenza o meno di un coinvolgimento sistemico e di manifestazioni cliniche della malattia.

Dei 73 cani affetti da linfoma compresi in questo studio, 39 rientravano nello stadio IV, 24 rientravano nello stadio V (9 linfoma multicentrico V stadio e 15 linfoma extranodale), solamente 10 cani presentavano uno stadio III della malattia. La correlazione stadio clinico della patologia e concentrazioni di VEGF è stata sviluppata nella parte preliminare di questo progetto (Agnoli, 2003).

Per quanto riguarda il sottostadio, 30 soggetti non presentavano manifestazioni cliniche della malattia appartenendo di conseguenza al sottostadio “**a**”, mentre 43 cani presentavano all’ammissione una sintomatologia variabile in gravità e manifestazioni (ipertermia, disoressia ed anoressia, coinvolgimento gastroenterico ed altro) e sono stati inseriti nel sottostadio “**b**”.

Per la diagnosi di linfoma e per la stadiazione clinica di ogni soggetto sono stati eseguiti diversi approfondimenti diagnostici, condizionati dalle esigenze del paziente e dalla disponibilità economica dei proprietari. In tutti i soggetti la diagnosi di linfoma è stata ottenuta mediante esame citologico. Il prelievo del midollo osseo è stato eseguito solo nei soggetti che presentavano anomalie morfologiche leucocitarie all'osservazione dello striscio ematico o citopenie periferiche. Radiografia del torace, ecografia addominale e misurazione ecografica dei linfonodi sono state eseguite nella maggior parte dei soggetti. Nel corso dello studio il gruppo di partenza è stato suddiviso in ulteriori sotto-gruppi sulla base del decorso clinico e delle "matrici all'ammissione" disponibili per ulteriori valutazioni.

In 35 soggetti di 73 è stato possibile valutare l'attività plasmatica delle MMP-2 e -9. In 61 soggetti di 73 è stata valutata la concentrazione di Hg all'ammissione ed in 55 soggetti di 73 è stata valutata la concentrazione sierica all'ammissione di LDH e proteina C-reattiva. Preliminarmente gli stessi Autori hanno valutato la correlazione esistente fra VEGF e concentrazione piastrinica, i risultati saranno disussi successivamente (Agnoli, 2003; Gentilini et al., 2005).

Nell'ambito dei cani affetti da linfoma afferenti al Servizio di Oncologia 33 sono stati sottoposti a trattamento chemioterapico. In questo sottogruppo è stata quindi valutata la risposta alla chemioterapia (classificandola in risposta completa, risposta parziale, stabilizzazione e progressione della patologia). In questo sotto-gruppo è stato possibile calcolare il *Disease Free Interval* (DFI o intervallo libero da malattia).

Il DFI è considerato come il numero di giorni compresi fra la remissione completa e la successiva recidiva o morte, se riconducibile alla patologia neoplastica. Per i soggetti in cui la morte è sopravvenuta per cause non legate alla presenza della patologia il DFI è stato comunque calcolato e studiato, ma il dato è stato considerato, a fini statistici, "censored".

La distribuzione delle concentrazioni di VEGF fra i soggetti sottoposti o meno a chemioterapia ed il suo andamento durante la chemioterapia stessa è stato studiato dagli Autori nelle pubblicazioni antecedenti (Agnoli, 2003; Gentilini et al., 2005).

Ogni campione di siero, plasma citrato o sangue k₃EDTA è stato ottenuto mediante prelievo dalla vena cefalica dell'avambraccio, dalla vena safena mediale dell'arto posteriore o dalla vena giugulare. Il sangue così prelevato è stato raccolto in provette contenenti un gel separatore o l'opportuno anticoagulante. Per quel che concerne il siero, ogni provetta è stata sierata per 30 minuti circa in termostato alla temperatura di 37° e poi centrifugata per 10 minuti a 3000 rpm, in una centrifuga refrigerata. Il plasma dal quale l'attività delle MMPs è stata ricavata è stato a sua volta ottenuto centrifugando il campione, entro 30 minuti dal prelievo, per 10 minuti a 3000 rpm nella medesima centrifuga.

I campioni di siero e di plasma citrato ottenuti sono stati stoccati in diverse aliquote e conservati ad un temperatura di -20°. Le aliquote stoccate sono state scongelate a temperatura ambiente per l'esecuzione delle analisi.

7.3. PRINCIPALI METODICHE ANALITICHE UTILIZZATE

7.3.1 ESAME EMOCROMOCITOMETRICO: VALUTAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE EMOGLOBINICA E DELLA STIMA PIASTRINICA.

L'esame è stato eseguito su campioni di sangue intero prelevato dalla vena cefalica dell'avambraccio, dalla vena safena mediale o dalla vena giugulare e posto all'interno di provette con anticoagulante (k₃EDTA). L'analisi quantitativa dei campioni è stata effettuata con

l'analizzatore ematologico *Hematology Self Cell Counter* modello *Baker System 9120⁺ ax* o con l'analizzatore *Abbott Diagnostics Cell Dyne 3500R SL*. La stima piastrinica, la valutazione morfologica, la formula leucocitaria, e la valutazione citomorfologica degli eritrociti, sono state eseguite su strisci ematici a fresco, asciugati e colorati con *May-Grünwald Giemsa* (Merk®) o con *MGG-Quick Stain* (Bio-Optica), secondo il protocollo in uso nel laboratorio di patologia clinica del Dipartimento Clinico (SEPACVET).

7.3.2 ESAME CITOLOGICO

L'esame citologico è stato eseguito su campioni cellulari ottenuti attraverso l'aspirazione con ago sottile. Le sedi del prelievo citologico (linfonodo cervicale superficiale, linfonodo retromandibolare, linfonodo prescapolare o linfonodo popliteo) sono state adeguatamente tricotomizzate e disinfettate. Il materiale prelevato è stato strisciato su vetrini SuperFrost. I vetrini sono stati asciugati e colorati con *May-Grunwald Giemsa* (Merk®), secondo le procedure per la colorazione citologica in uso presso il SEPACVET. Il linfoma è stato classificato secondo la classificazione citologica Fleury (1994).

7.3.3 TECNICHE IMMUNOENZIMATICHE: ELISA PER LA VALUTAZIONE DEL VEGF CIRCOLANTE.

Un kit ELISA è stato utilizzato per la determinazione quantitativa di VEGF sul siero. Nello specifico è stato impiegato il *Quantikine Human VEGF Immunoassay* della *R&D SYSTEM®*, un kit per la determinazione di VEGF su siero, plasma, e surnatante di culture cellulari umane. La curva di sensibilità di questo test è compresa fra 15,6 e 2000 pg e la dose minima determinabile corrisponde a 9,0 pg/ml. Questo kit, specifico per le isoforme 165 e 121 di VEGF umano, non presenta cross-reattività con i recettori solubili di VEGF, né con altre

citochine. Precedentemente alla valutazione dei sieri dei 73 soggetti patologici, altri kit sono stati utilizzati per la determinazione delle concentrazioni di VEGF in soggetti sani (Human VEGF Colorimetric ELISA kit, PIERCE ENDOGEN®).

Le determinazioni sono state effettuate in doppio, al fine di valutare la ripetibilità del kit. Una volta eseguito il test, sono state misurate le assorbanze tramite spettrofotometro e quindi calcolate le concentrazioni.

7.3.4 ZIMOGRAFIA SU GEL PER LA DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' DELLE GELATINASI (MMP-2 e MMP-9) CANINE

L'attività plasmatica delle gelatinasi è stata misurata utilizzando un gel di policrilamide al 10 % di tris-glicina contenente lo 0,1% di gelatina (10% Novex® Zymogram Gels, Invitrogen, UK).

I campioni di plasma sono stati diluiti 1:5 in acqua distillata e successivamente un volume pari a 5 µl di campione diluito è stato mescolato con un identico volume di buffer (Novex® Tris-Glycine SDS sample Buffer 2x, Invitrogen, UK) ed inserito all'interno dei pozzetti ricavati nel gel. L'elettroforesi dei campioni è stata effettuata ad un voltaggio costante di 125V per un totale di 120 minuti. Nella stessa corsa è stato inserito, oltre ai campioni di plasma da analizzare, l'apposto marker (marker molecolare, SeeBlue Plus2® Pre-Stained Standard , Invitrogen, UK). Successivamente all'esecuzione dell'elettroforesi i gel sono stati lavati per 30 minuti con l'apposito Buffer (Novex® Zimogram Buffer, Invitrogen, UK), mantenuti a temperatura ambiente per 30 minuti nel Developing Buffer (Novex® Developing Buffer, Invitrogen, UK) ed infine incubati con un'ulteriore aliquota dello stesso buffer, a 37°C per un totale di 22-24 ore. Le bande di attività gelatinolitica sono state ottenute incubando per 6-8 ore i gel con l'apposito colorante (Simply Blue Safe Stain, Invitrogen, UK). Le bande gelatinolitiche corrispondenti alle MMP-2 e 9 canine sono state identificate sulla base del loro peso molecolare, approssimativamente 68 e 92 kDa, come precedentemente descritto da Leibman e Bergman (Leibman et al. 2000; Bergman et al 2002). Le immagini dei gel sono state infine catturate attraverso un sistema informatico (Geldoc 1000, Bio-Rad) e le bande gelatinolitiche sono state misurate attraverso l'utilizzo di un software di analisi densitometrica (Quantità one, Byo-Rad) ed espresse in unità convenzionali per essere confrontate fra loro.

7.3.5 PROTEINA C REATTIVA (CRP)

Per valutare la concentrazione di Proteina C Reattiva sierica si è utilizzato un metodo immunoturbidimetrico (Olympus System Reagent C-REACTIVE PROTEIN OSR 6147).

Principio del metodo: in seguito alla miscelazione del campione con la soluzione tampone R1 e la soluzione antisiero R2, la Proteina C Reattiva presente reagisce in modo specifico con anticorpi anti-CRP dando origine ad aggregati insolubili. L'assorbanza di questi aggregati è proporzionale alla concentrazione di CRP nel campione.

Reagente R1	Tampone Tris (Idrossimetil) aminometano (pH 7,5) 80 mmol/l	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Reagente R2	Sodio cloruro 125 mmol/l Polietilenglicole 6000 1,5 % w/v Anticorpo Anti-CRP umana da capra Conservante (sodio azide)	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Multicalibratore	Siero Proteine 1 OLYMPUS Cat.No. ODR3021	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Controllo	controllo Olympus per Immunoturbidimetria Cat.-No ODC0014, ODC0015 e ODC0016	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg

Tabella 1. Reagenti, Controllo di Qualità e Calibrazioni per CRP.

Linearità: il metodo risulta lineare per concentrazioni comprese nell'intervallo di 5-200 mg/l.

Suscettività di interferenze:

- Bilirubina: nessuna interferenza significativa fino a 40 mg/dl bilirubina aggiunta;
- Emolisi: concentrazioni di emolisato aggiunto di 500 mg/dl portano ad un'interferenza significativa del 10%;
- Lipidi: concentrazioni di lipidi aggiunti di 1000 mg/dl portano ad un'interferenza significativa del 20%.

7.3.6 LATTATO DEIDROGENASI (LDH)

La determinazione della concentrazione sierica di LDH è stata effettuata attraverso l'utilizzo di un metodo UV cinetico (Olympus System Reagent LDH OSR 6126).

Principio del metodo: l'LDH catalizza la riduzione del piruvato in lattato con PH neutro. Questa reazione avviene in combinazione con l'ossidazione di NADH in NAD⁺. La riduzione di NADH viene misurata a 340 nm ed è direttamente proporzionale all'attività enzimatica del campione.

Linearità: il metodo risulta lineare per concentrazioni di attività enzimatica comprese nell'intervallo di 50-3000 UI.

Suscettibilità di interferenze:

- Bilirubina: interferenza inferiore al 3% fino a 40 mg/dl bilirubina aggiunta;
- Emolisi: opportuno evitare l'utilizzo di siero o plasma emolisati. I globuli rossi possiedono attività di LDH di 150 volte superiore a quella del siero;

- Lipidi: interferenza inferiore al 5% per concentrazione di lipidi aggiunti di 1000 mg/dl.

Reagente R1	Bis -Tris-Propano	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Reagente R2	Nadh, Pyruvato	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Multicalibratore	Siero Proteine 2 OLYMPUS Cat.No. 66300	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Controllo	Controllo Olympus ODC003, ODC004	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg

Tabella 2. Reagenti, Controllo di Qualità e Calibrazioni per LDH.

4.4 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica di questo lavoro è stata elaborata utilizzando due Software di supporto statistico (*MedCalc* e *Statistica 4.5, Statsoft, Inc.1993*). I dati ottenuti, di tipo non parametrico, sono stati valutati con dei test a ranghi.

In particolare è stato utilizzato il test di U Mann-Whitney per confrontare fra loro i sottogruppi presi in considerazione: soggetti affetti da linfoma verso campione controllo e distribuzione dei parametri nei due sottostadi. Il Cox's F-Test è stato utilizzato per lo studio della correlazione fra concentrazione dei marker prognostici e DFI.

La differenza fra le popolazioni è stata considerata significativa per valori di **p** inferiori a **0.05**.

CAPITOLO OTTO

RISULTATI

8.1 INTRODUZIONE

Nei paragrafi successivi saranno descritte le correlazioni evidenziate nell'ambito del campione prescelto in relazione alle concentrazioni dei parametri analizzati. L'eterogeneità della popolazione (e delle matrici collezionate all'ammissione) ha fatto sì che fosse opportuno suddividere la popolazione in sottogruppi e sviluppare uno studio statistico articolato su diversi livelli.

8.2 DISTRIBUZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI VEGF NELLA POPOLAZIONE STUDIATA

Come precedentemente accennato il campione è stato suddiviso in due categorie: soggetti sani e cani affetti da linfoma. La distribuzione di VEGF della popolazione è stata valutata sui sieri raccolti all'ammissione di tutti i pazienti. La concentrazione di VEGF nel gruppo "linfoma" è risultata compresa fra un valore non determinabile, considerato pari a 0 pg/ml, ed un valore di 502 pg/ml. La concentrazione di VEGF fra i soggetti sani è risultata compresa fra un valore non determinabile considerato pari a 0 pg/ml e un valore di 23,28 pg/ml. La mediana e la media del gruppo "linfoma" sono rispettivamente risultate pari a 25,30 e 45,60 pg/ml contro 0,0 e 4,54 pg/ml, mediana e media del gruppo controllo (Figura 7). La distribuzione fra le due popolazioni, analizzata tramite il Test U di Mann-Whitney è risultata statisticamente differente ($p = 0.000067$).

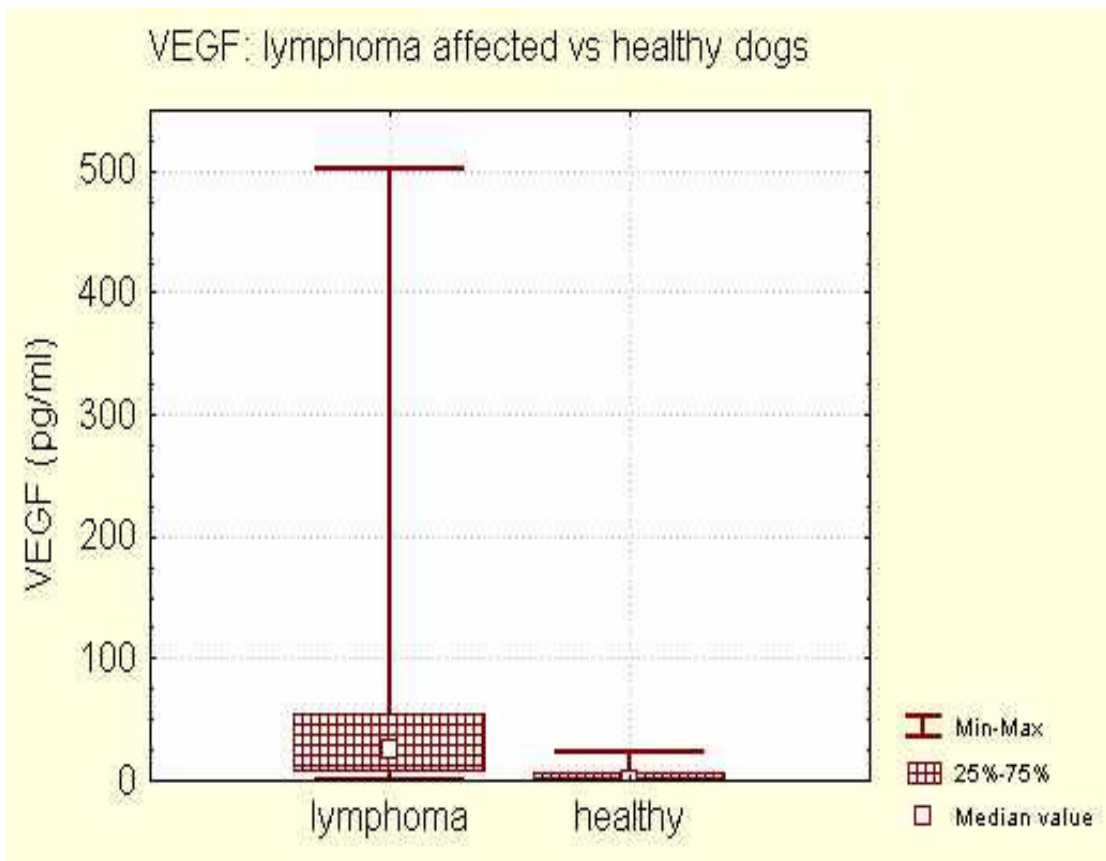


Figura 7. Distribuzione del campione suddiviso nei due gruppi di riferimento. La concentrazione di VEGF si riferisce al campione di siero prelevato all'ammissione.

8.3. DISTRIBUZIONE DELL'ATTIVITA' GELATINOLITICA NELLA POPOLAZIONE STUDIATA

La distribuzione dell'attività delle MMPs della popolazione è stata valutata sui campioni di plasma citrato collezionati all'ammissione. Come precedentemente accennato solo in 35 soggetti è stato possibile collezionare e conservare il campione di plasma citrato per l'analisi.

8.3.1 MMP-2

La concentrazione di MMP-2 nel gruppo "linfoma" è risultata compresa fra 2,96 e 17,94 unità arbitrarie (UA) (esprese dagli Autori al solo fine di confrontare l'attività della proteinasi nel campione). La concentrazione di MMP-2 nel gruppo controllo è risultata compresa fra 4,2 e 12,85 UA. Mediana e media di entrambi i gruppi sono schematizzate nella tabella seguente (tabella 5). La distribuzione fra le due popolazioni, analizzata tramite il Test U di Mann-Whitney è risultata non significativamente differente ($p = 0.067641$) (Figura 8).

8.3.2 MMP-9

La concentrazione di MMP-9 nel gruppo "linfoma" è risultata compresa fra 0,68 e 7,46 UA. La concentrazione di MMP-9 nel gruppo controllo è risultata compresa fra 0,84 e 5,87 UA. Mediana e media di entrambi i gruppi sono schematizzate nella tabella seguente (Tabella 5). La distribuzione fra le due popolazioni, analizzata tramite il Test U di Mann-Whitney è risultata significativamente differente ($p = 0.000259$) (Figura 9).

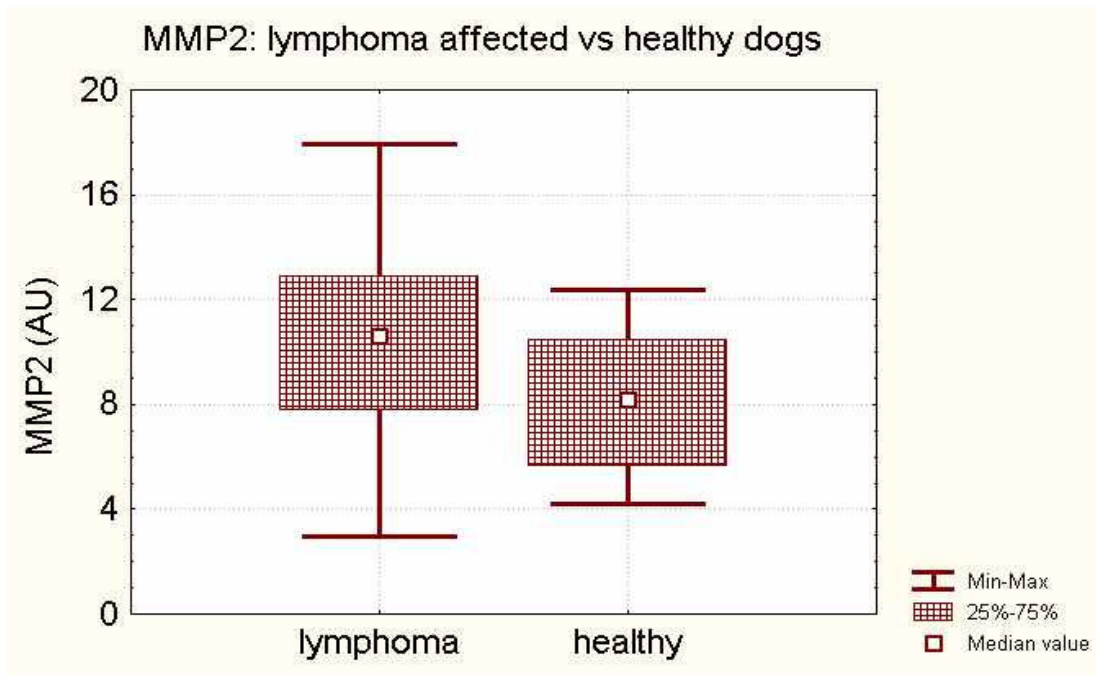


Figura 8: Distribuzione delle concentrazioni di MMP-2 nella popolazione studiata. Sottogruppi: “linfoma all’ammissione” vs “soggetti sani”.

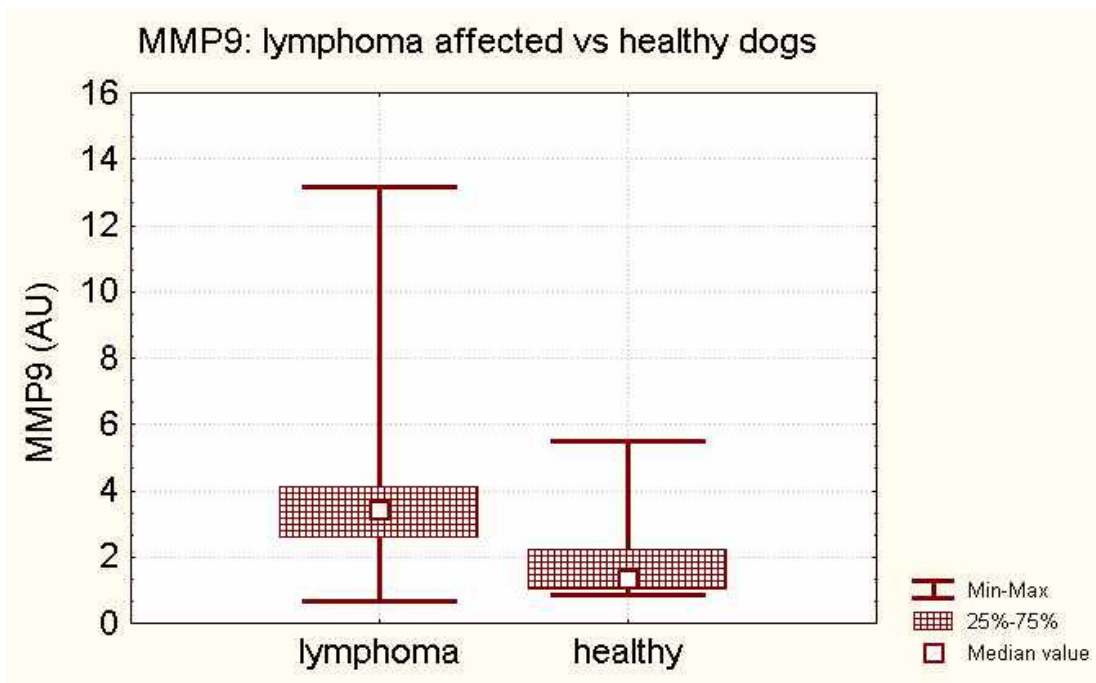


Figura 9. Distribuzione (presentazione Boxplot) delle concentrazioni di MMP-9 nella popolazione studiata: sottogruppi “linfoma” all’ammissione e “soggetti sani”.

Tabella 5. Mediana e media dell'attività delle MMP-2 e -9 (esprese in Unità Arbitrarie, AU) nei due gruppi di studio.

	MMP-2 (AU) Mediana	MMP-2(AU) Media	MMP9(AU) Mediana	MMP-9(AU) Media
Healty	8,17	8,38	1,32	1,84
Lymphoma	10,60	10,42	3,42	3,77

8.4 DISTRIBUZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI EMOGLOBINA NELLA POPOLAZIONE STUDIATA

La distribuzione della concentrazione di emoglobina nella popolazione campione è stata valutata attraverso l'esecuzione dell'esame emocromocitometrico su campioni di sangue raccolto in K₃-EDTA da 61 soggetti all'ammissione. I valori ottenuti sono stati confrontati con il range di riferimento in uso presso il SEPAC-VET: (12-18 gr %) (Figura 10).

Nel gruppo dei cani affetti da linfoma la concentrazione emoglobinica totale è risultata compresa fra 4,6 e 18,3 gr %, con mediana e media rispettivamente pari a 13,9 e 13,55 gr %.

8.5 DISTRIBUZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI PROTEINA C REATTIVA NELLA POPOLAZIONE IN ESAME

La distribuzione della concentrazione di CRP reattiva nella popolazione campione è stata valutata sui campioni di siero all'ammissione di 55 soggetti. I valori ottenuti sono stati confrontati con il range di riferimento in uso presso il SEPAC-VET : (0,0 -0,5 mg/dl) (Figura 12).

Nel gruppo dei cani affetti da linfoma la concentrazione di CRP è risultata compresa fra 0 e 25,5 gr/dl con mediana e media rispettivamente di 1,92 e 3,77 gr/dl.

8.6 DISTRIBUZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI LDH NELLA POPOLAZIONE IN ESAME

La distribuzione della concentrazione di LDH nella popolazione campione è stata valutata sui campioni di siero all'ammissione di 55 soggetti. I valori ottenuti sono stati confrontati con il range di riferimento in uso presso il SEPAC-VET : (30-130 UI/L) (Figura 13).

Nel gruppo dei cani affetti da linfoma la concentrazione di LDH è risultata compresa fra 33 e 2990 UI/L con mediana e media rispettivamente di 203 e 340 UI/L.

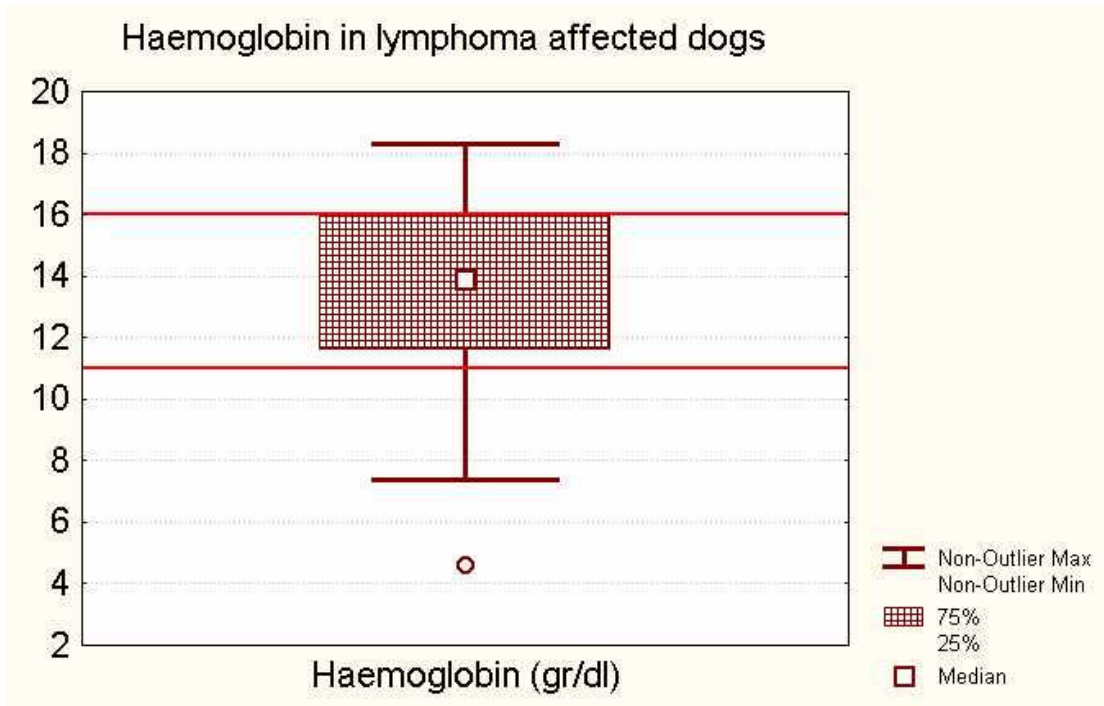


Figura 10. Distribuzione delle concentrazioni di emoglobina nella popolazione studiata.

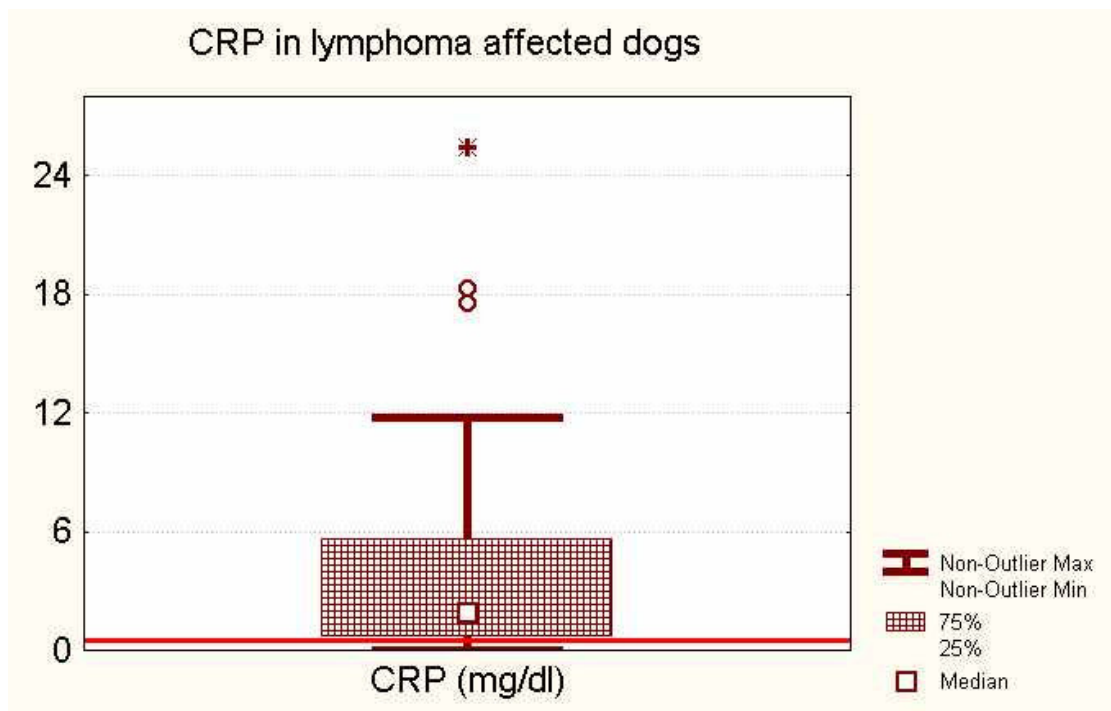


Figura 11. Distribuzione delle concentrazioni di emoglobina nella popolazione studiata (55 soggetti affetti da linfoma)

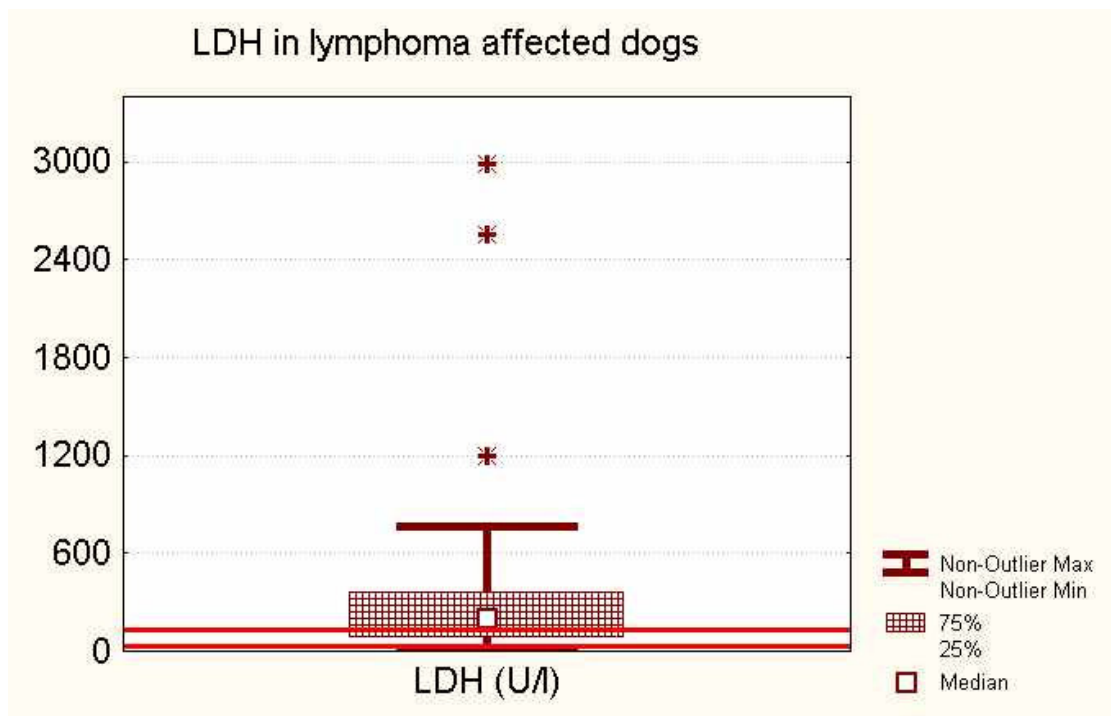


Figura 12. Distribuzione delle concentrazioni di emoglobina nella popolazione studiata (55 soggetti affetti da linfoma).

8.7 CORRELAZIONE FRA PARAMETRI VALUTATI E SOTTOSTADIO CLINICO DELLA PATOLOGIA

Il gruppo studiato precedentemente (73 soggetti affetti da linfoma multicentrico) è stato suddiviso in due sottogruppi in relazione al sottostadio clinico della patologia evidenziato nei pazienti durante la prima visita. Il lavoro sperimentale è proseguito correlando le concentrazioni dei parametri in esame ai diversi sottogruppi di appartenenza.

8.7.1 LIVELLI SIERICI DI VEGF IN SOGGETTI AFFETTI DA LINFOMA: CONFRONTO TRA SOTTOSTADI

Tramite il test U-Mann-whitney è stato possibile evidenziare una differenza al limite della significatività statistica ($p = 0,053$) tra i 2 sottogruppi ottenuti (figura Media, mediana e range delle popolazioni in esame sono riportati nella tabella numero 6)

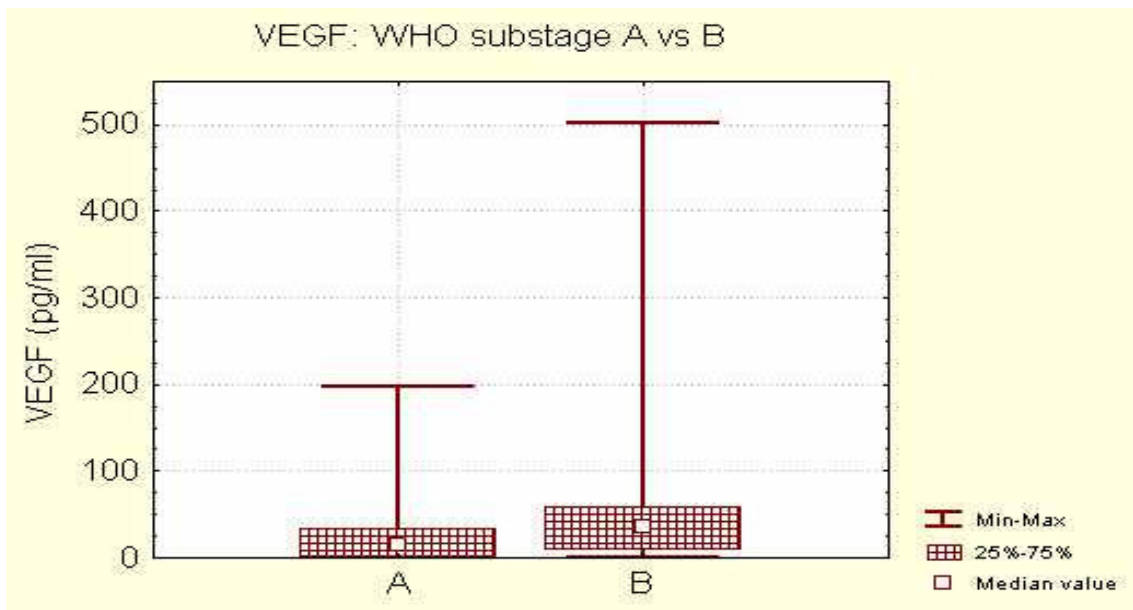


Figura 13.. Le concentrazioni di VEGF nei soggetti affetti sono state suddivise in due sottogruppi (“a” e “b”) in relazione al sottostadio presentato dal soggetto in esame all’ammisione.

8.7.2 ATTIVITA' DELLE GELATINASI IN SOGGETTI AFFETTI DA LINFOMA: CONFRONTO FRA SOTTOSTADI

8.7.2.1 MMP-2

Fra i 2 sottogruppi ottenuti non si è evidenziata alcuna differenza significativa (Test U di Mann-Whitney, $p = 0,59$) (Figura 14). Media, mediana e range delle popolazioni in esame sono riportati nella Tabella 6.

8.7.2.2 MMP-9

Fra i 2 sottogruppi ottenuti non si è evidenziata differenza significativa (Test U di Mann-Whitney, $p = 0,079$) (Figura 15). Media, mediana e range delle popolazioni in esame sono riportati nella Tabella 6.

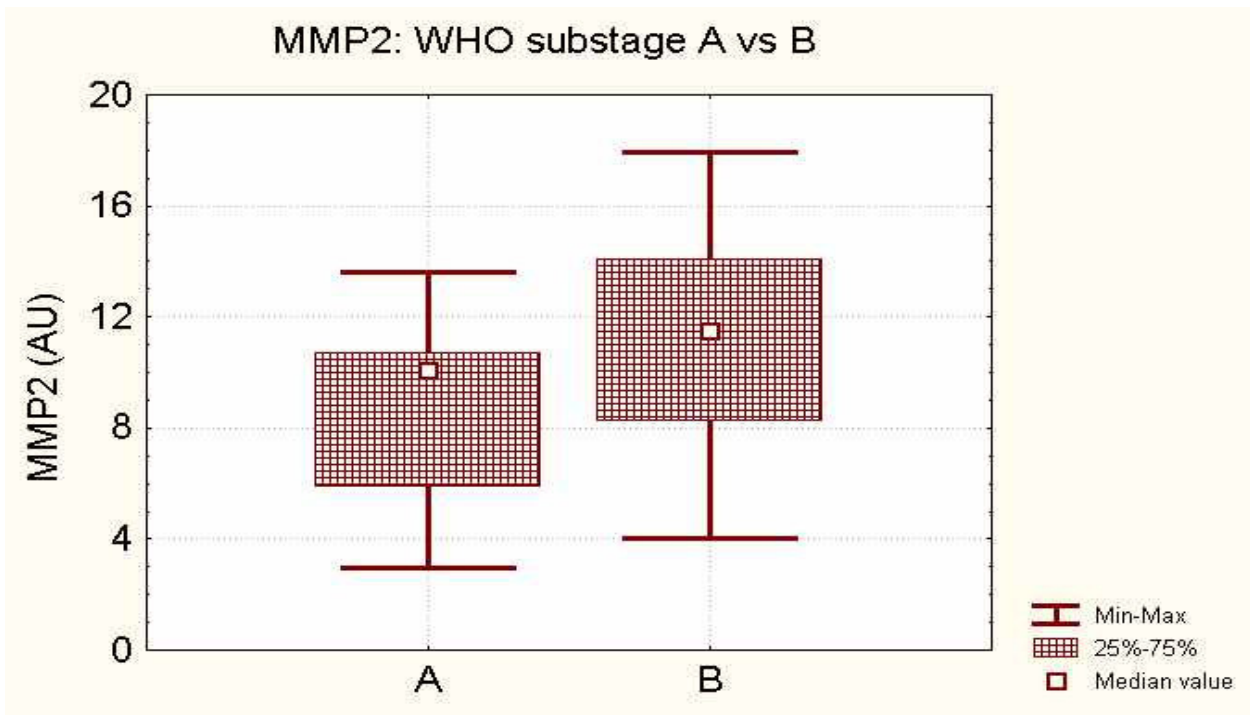


Figura 14. Distribuzione dell'attività della MMP-2 nel gruppo linfoma. L'attività della MMP-2 nei soggetti affetti è stata suddivisa in due sottogruppi ("a" e "b") in relazione al sottostadio all'ammissione.

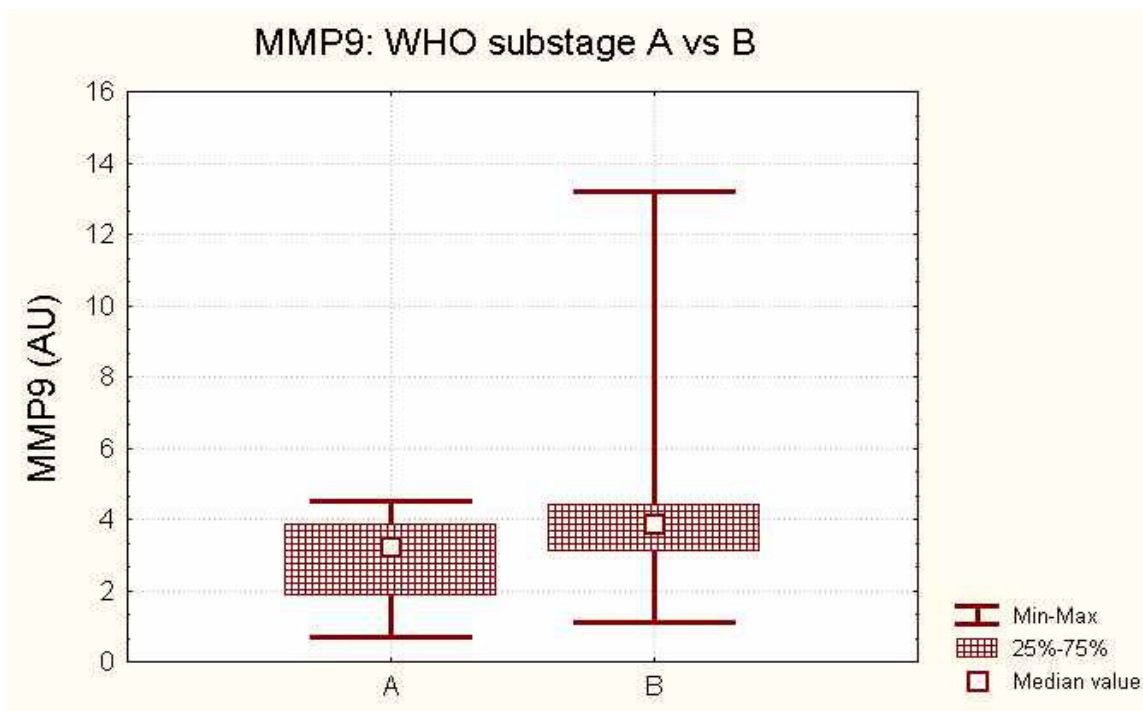


Figura 15. Distribuzione dell'attività della MMP-9 nel gruppo linfoma. In questo studio l'attività di MMP-9 nei soggetti affetti da linfoma è stata suddivisa in due sottogruppi ("a" e "b") in relazione al sottostadio presentato all'ammissione.

8.7.3 CONCENTRAZIONE DI EMOGLOBINA IN SOGGETTI AFFETTI DA LINFOMA: CONFRONTO FRA SOTTOSTADI

Fra i 2 sottogruppi ottenuti si è evidenziata una differenza significativa (Test U di Mann-Whitney, $p = 0,010$) (Figura 16). Media, mediana e range delle popolazioni in esame sono riportati nella Tabella 6.

8.7.4 CONCENTRAZIONE DI PROTEINA C REATTIVA IN SOGGETTI AFFETTI DA LINFOMA: CONFRONTO FRA SOTTOSTADI

Fra i 2 sottogruppi ottenuti non si è evidenziata differenza significativa (Test U di Mann-Whitney, $p = 0,082$) (Figura 17). Media, mediana e range delle popolazioni in esame sono riportati nella Tabella 6.

8.7.5 CONCENTRAZIONE DI LDH IN SOGGETTI AFFETTI DA LINFOMA: CONFRONTO FRA SOTTOSTADI

Fra i 2 sottogruppi ottenuti si è evidenziata una differenza significativa (Test U di Mann-Whitney, $p = 0,044$) (Figura 18). Media, mediana e range delle popolazioni in esame sono riportati nella Tabella 6.

Tabella 6.

Mediana, range, media e deviazione standard dei parametri presi in esame nel corso di questo lavoro sperimentale suddivisi in base al sottostadio del paziente.

Test	sottostadio WHO	Mediana	Range	Media	SD	U-Mann-whitney p=
VEGF	30	15,120	0,0-196,38	33,240	52,77669	0.053
	43	35,753	0,0-501,96	54,302	82,57433	
MMP-9	14	3,21	0,68-4,5	2,91	1,240098	0.0799
	21	3,85	1,09-13,17	4,34	2,544846	
MMP-2	14	10,08	2,96-13,59	9,07	3,026372	0.59
	21	11,49	4,01-17,94	11,31	3,887096	
CRP	27	1,37	0,0-25,46	2,93	5,010469	0.082
	28	4,02	0,0-18,31	4,58	4,83695	
LDH	27	168	33-485	191	135,6841	0.044
	28	257	42-2990	483	697,5351	
HB	27	14,7	10,1-18,3	14,77407	2,136243	0.010
	34	12,55	4,6-18,2	12,57941	3,359724	

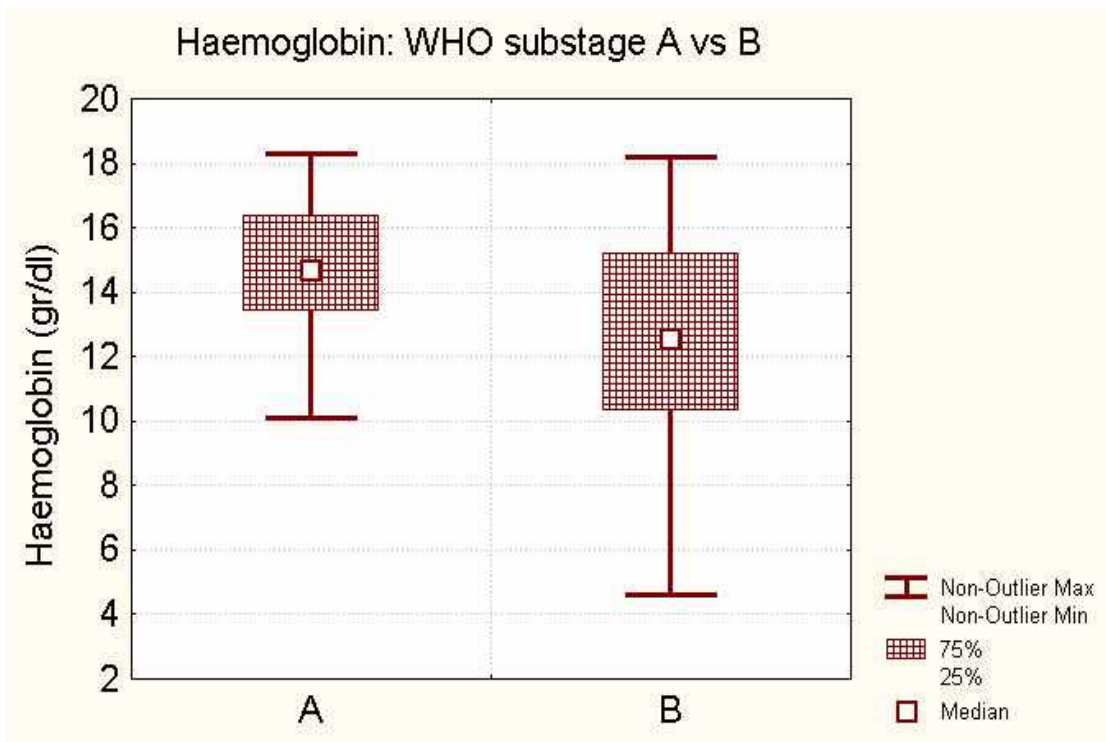


Figura 16. Concentrazione di emoglobina nei soggetti affetti da linfoma suddivisa in due sottogruppi in relazione al sottostadio presentato dal paziente all'ammissione. $P=0,010$.

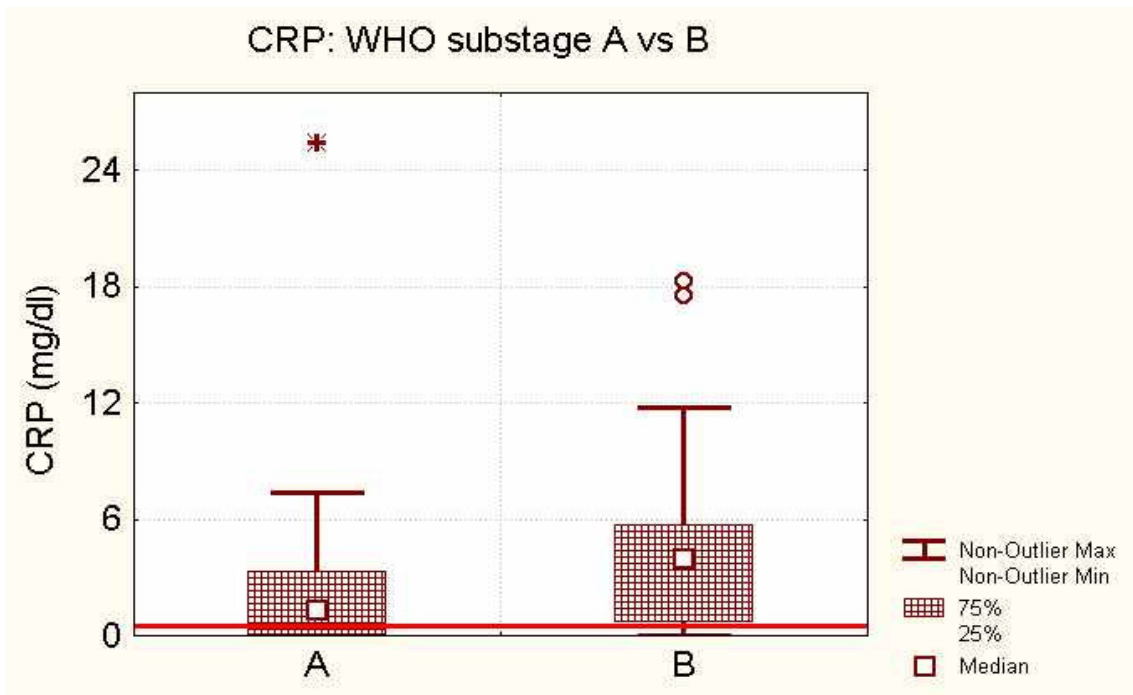


Figura 17. Concentrazione di CRP nei soggetti affetti da linfoma, suddivisa in due sottogruppi in relazione al sottostadio presentato dal paziente all'ammissione. $P=0,082$.

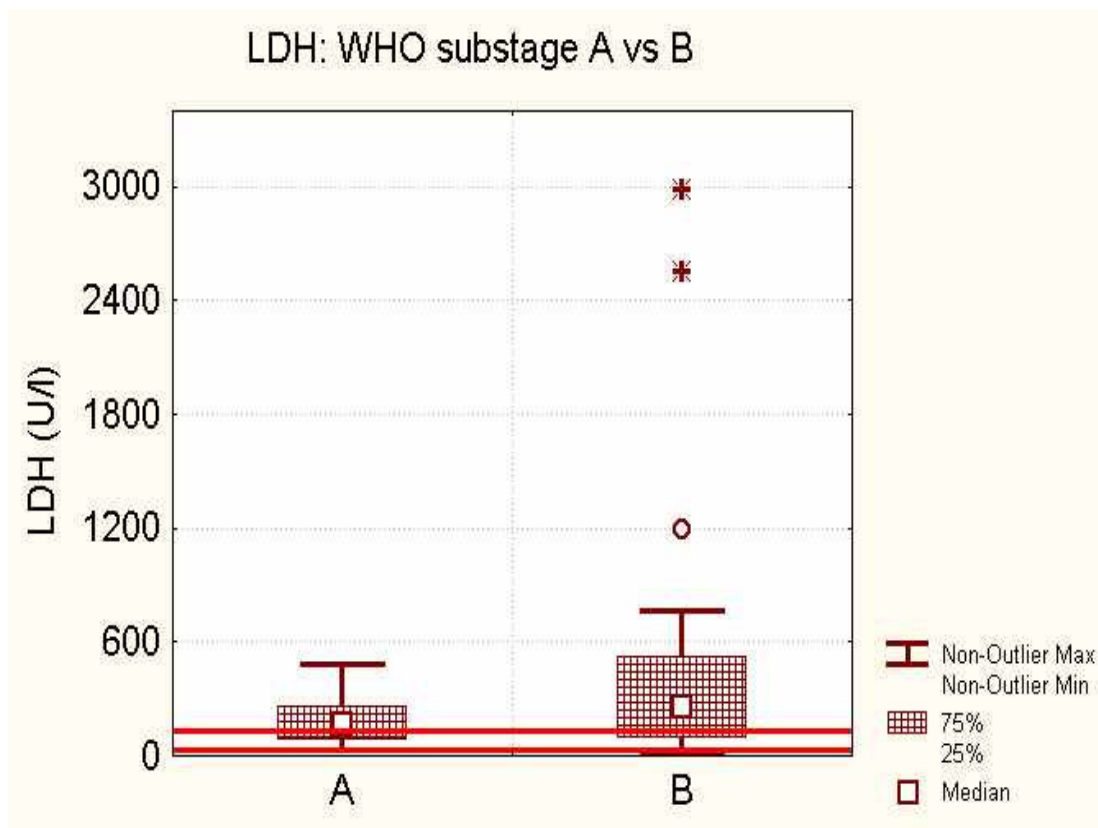


Figura 18. Distribuzione della concentrazione di LDH nel gruppo linfoma. La concentrazione di LDH nei soggetti affetti è stata suddivisa in due sottogruppi (“a” e “b”) in relazione al sottostadio presentato dal paziente all’ammissione. $P=0,044$.

8.8 CORRELAZIONE FRA PARAMETRI VALUTATI E INTERVALLO LIBERO DA MALATTIA (DFI)

Nella parte conclusiva di questa sperimentazione i parametri studiati precedentemente sono stati correlati al periodo libero da malattia (DFI, *Disease Free Interval*) valutato nei soggetti sottoposti a trattamento chemioterapico (33 cani dei 73 di partenza).

I dati sono stati analizzati attraverso regressione di Cox.

I pazienti ed il loro DFI sono stati stratificati sulla base della concentrazione del parametro studiato.

8.8.1 LIVELLI SIERICI DI VEGF E DISEASE FREE INTERVAL

Il DFI di 33 soggetti sottoposti a chemioterapia è stato stratificato sulla base della concentrazione di VEGF presente nei rispettivi pazienti all'ammissione. Il campione studiato è stato suddiviso secondariamente alla concentrazione di VEGF (soggetti con concentrazioni comprese nel 25 esimo percentile maggiore della popolazione e soggetti con concentrazioni comprese nel 25 esimo percentile inferiore) ed il DFI comparato alla percentuale di soggetti in remissione completa (CR) (Figura 19). Nelle popolazioni evidenziate è stata rilevata una differenza statisticamente significativa ($P = 0,035$).

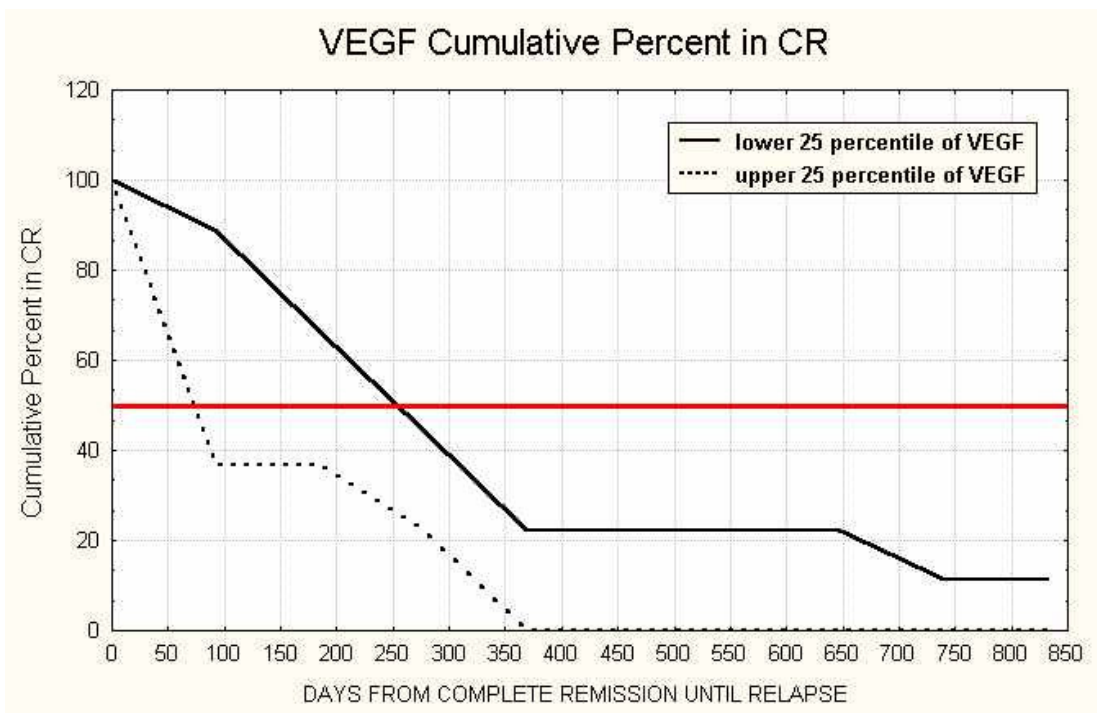


Figura 19. Percentuale cumulativa di soggetti in remissione completa in relazione a giorni di DFI, in sottogruppi stratificati sulla base della concentrazione sierica di VEGF ($P = 0.035$).

La popolazione totale (33 cani affetti da linfoma sottoposti a chemioterapia) è stata inoltre studiata attraverso Test Chi-quadrato. Graficamente è possibile osservare l'andamento ottenuto.

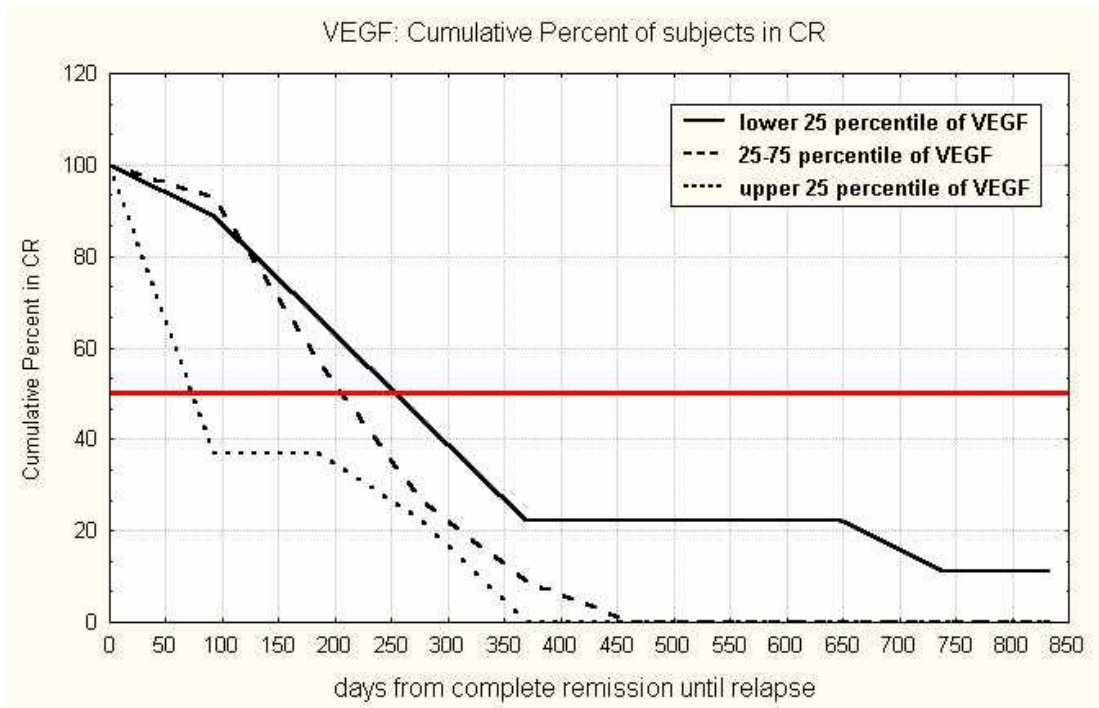
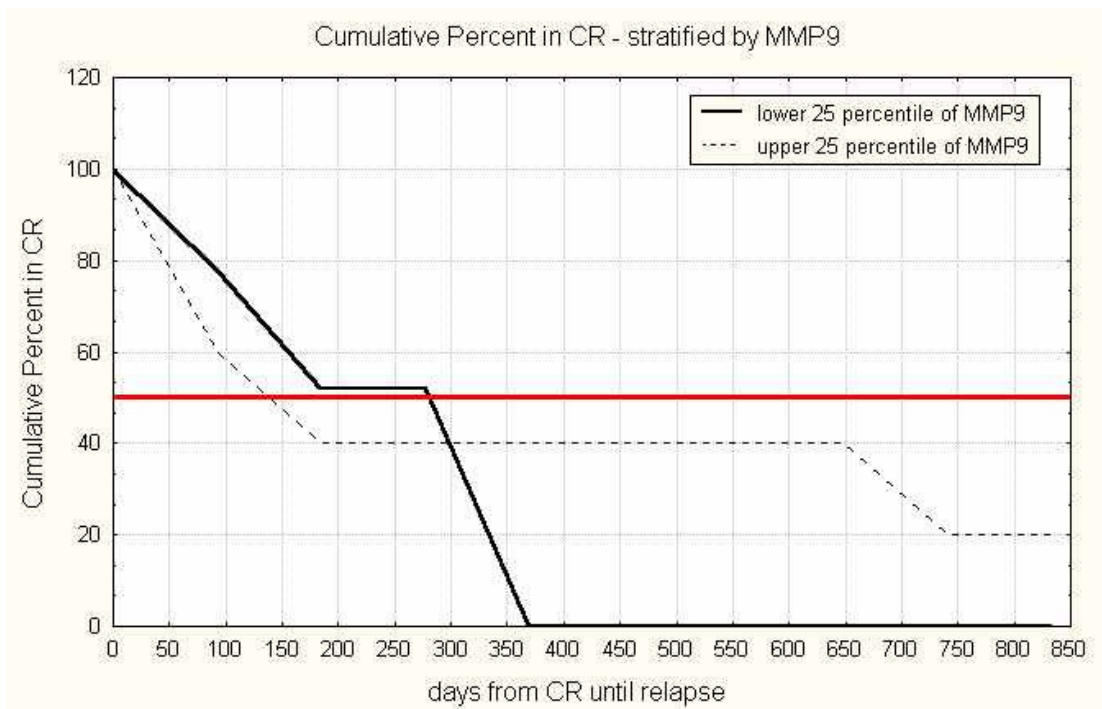


Figura 20. Percentuale cumulativa di soggetti in remissione completa in relazione a giorni di DFI, in sottogruppi stratificati sulla base della concentrazione sierica di VEGF ($P= 0.198$).

8.8.2 GELATINASI ED INTERVALLO LIBERO DA MALATTIA

In dieci soggetti sottoposti a chemioterapia è stato possibile analizzare la concentrazione dell'attività plasmatica delle MMP-2 e -9. In nessuno dei due studi statistici effettuati (Regressione di Cox per la valutazione della correlazione DFI e, rispettivamente, MMP-2 e MMP-9) è stata evidenziata una differenza significativa della distribuzione delle popolazioni (Figura 21).

Figura 21. Percentuale cumulativa di soggetti in remissione completa in relazione a



giorni di DFI, in sottogruppi stratificati sulla base dell'attività plasmatica di MMP-9 ($P = 0.270$).

8.8.3 EMOGLOBINA, PROTEINA C REATTIVA, LDH ED INTERVALLO LIBERO DA MALATTIA.

Dei 33 soggetti sottoposti a chemioterapia e classificati in base al DFI, in 17 è stato possibile valutare la concentrazione ematica di emoglobina all'ammissione ed in 14 è stato possibile ottenere le concentrazioni sieriche di CRP e LDH. Emoglobina, CRP ed LDH sono stati statisticamente comparati alla lunghezza, in giorni, del DFI attraverso regressione di Cox. I risultati di questi studi sono risultati non significativi dal punto di vista statistico. (Hb: $p = 0,453$; CRP: $p = 0,13$; LDH: $p = 0,113$). (Figura 22, Figura 23)

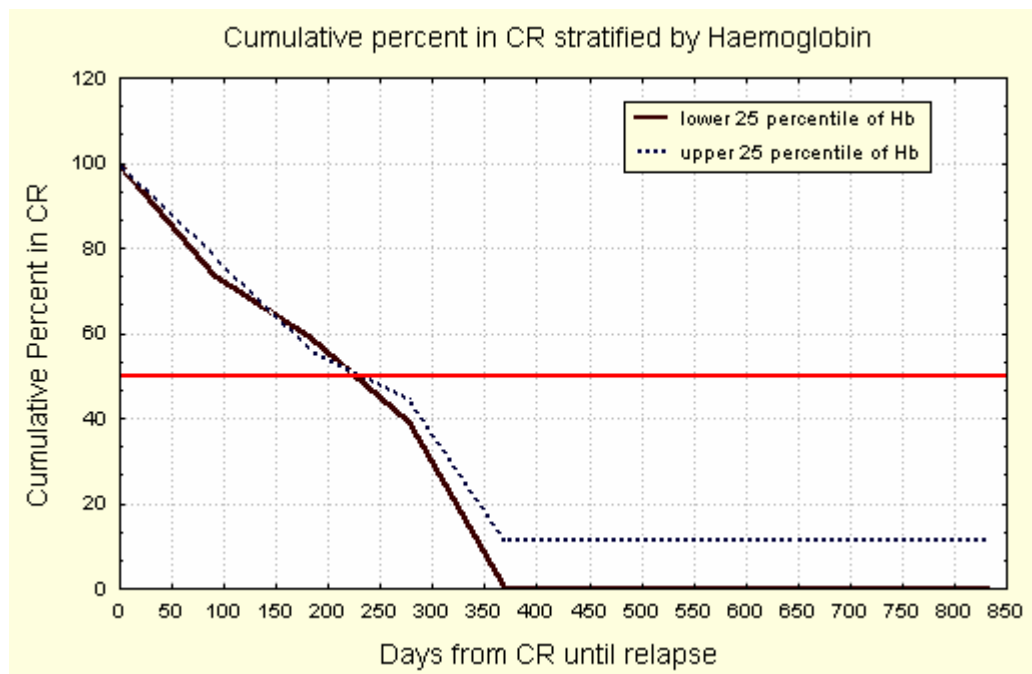


Figura 22. Stratificazione della popolazione campione sulla base della concentrazione ematica di Hb. Correlazione fra DFI e percentuale cumulativa di soggetti in remissione completa.

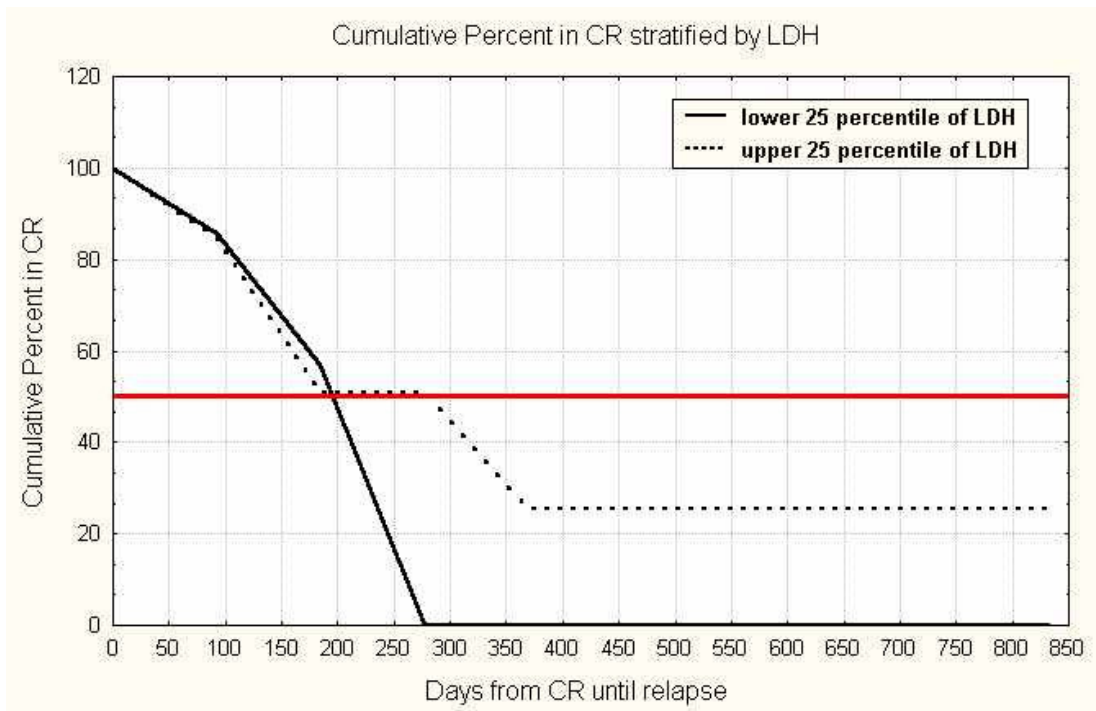


Figura 23. Stratificazione della popolazione campione sulla base della concentrazione ematica di LDH. Correlazione fra DFI e percentuale cumulativa di soggetti in remissione completa.

8.8.4 SOTTOSTADIO ED INTERVALLO LIBERO DA MALATTIA

Il sottostadio dei 33 pazienti sottoposti a chemioterapia è stato correlato attraverso Regressione di Cox al DFI. In questo studio statistico le due popolazioni (sottostadio “a” e sottostadio “b”) sono risultate significativamente differenti ($p=0,026$).

CAPITOLO NOVE

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

9.1 *PREMESSA*

Con il presente lavoro si sono volute verificare, nella specie canina, alcune delle ipotesi avanzate in Medicina Umana relative al ruolo di innovativi marker prognostici nell'ambito delle neoplasie linfoproliferative. Nello specifico, considerata la scarsità delle acquisizioni e la confusione esistente in ambito veterinario riguardo l'importanza prognostica di fattori pro-angiogenici in corso di linfoma non Hodgking, in questo studio sperimentale è stata condotta una valutazione delle concentrazioni sieriche di VEGF e dell'attività plasmatica di MMP 2 e 9 in un campione di cani affetti da tale neoplasia. Inoltre con la finalità di indagare l'andamento della risposta di fase acuta in corso di linfoma, è stata valutata nella medesima popolazione la concentrazione sierica di CRP. Alla valutazione dei fattori angiogenici (VEGF, MMP2 e 9) e della concentrazione sierica di CRP in cani affetti da LNH, sono state aggiunte valutazioni su marker prognostici considerati ad oggi classici, quali la concentrazione sierica di LDH e la concentrazione di Hb ematica.

In questa sperimentazione i parametri sopraelencati sono stati comparati con il sottostadio clinico presentato dai pazienti al momento dell'ammissione ed in ultima analisi, nei pazienti sottoposti a chemioterapia, con l'intervallo libero da malattia (DFI). Differentemente da quanto accade in Medicina Umana, la sopravvivenza nei nostri pazienti risulta infatti un parametro fortemente influenzabile da diversi fattori, primo fra questi l'opzione dell'eutanasia, scelta in cui molti proprietari ricadono per questioni di natura economica o considerazioni

etiche. Per questo motivo il DFI è parso agli autori un end point oggettivo per la valutazione del benessere dell'animale sottoposto a chemioterapia.

Con l'esclusione delle tecniche zimografiche per la valutazione delle MMPs, i parametri inclusi in questo studio sono stati scelti con la finalità di individuare dei marker prognostici fruibili da affiancare alle considerazioni cliniche a disposizione dell'oncologo veterinario.

Lo studio dei singoli parametri effettuato in questa sperimentazione rappresenta la premessa per un'analisi multifunzionale atta a stabilire la funzionalità della combinazione dei parametri prescelti e la costituzione di un indice prognostico simile all'International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Index utilizzato in Medicina Umana.

9.2 *VEGF*

Come già accennato, questo studio si basa sui dati ottenuti dalla valutazione delle concentrazioni sieriche di VEGF in 89 soggetti. Di questi 16 erano animali sani, 73 i cani affetti da linfoma. La differenza fra le due popolazioni è risultata chiaramente significativa, testimoniando l'effettivo coinvolgimento di meccanismi angiogenetici in corso di linfoma canino.

La mancanza di un confronto diretto con un campione più numeroso di "soggetti sani" potrebbe essere considerata il primo limite di questo studio; tuttavia, la scelta di ampliare il numero di soggetti patologici riducendo i campioni di controllo è stata supportata dalla presenza di dati bibliografici che testimoniano come negli individui sani le concentrazioni di VEGF risultino normalmente non determinabili (Clifford et al, 2001). Questo dato si accorda con il risultato ottenuto dai sieri dei 16 soggetti sani le cui concentrazioni sieriche sono risultate tendenzialmente non determinabili.

Le considerazioni principali di questo lavoro sono state tratte dall'analisi delle concentrazioni di VEGF determinate nei "soggetti affetti da linfoma". In questa popolazione, le concentrazioni sieriche di VEGF sono state confrontate con il sottostadio evidenziato nei pazienti all'ammissione. Questo confronto è risultato statisticamente significativo: in cani appartenenti al sottostadio **b** (con evidenti manifestazioni cliniche della malattia) sono state evidenziate concentrazioni sieriche di VEGF più elevate rispetto ai soggetti del sottostadio **a**. Questa considerazione appare in linea con l'interpretazione della correlazione positiva evidenziata tra concentrazioni sieriche di **VEGF** e gravità delle condizioni cliniche dei soggetti, espresse tramite **sottostadio**. Lo stesso sottostadio, come riportato da diverse fonti bibliografiche (Mac Ewen e Young, 1996; Vail, 2000), è considerato un importante fattore prognostico, fortemente associato all'andamento clinico ed alla risposta terapeutica del linfoma canino. Contrariamente al sottostadio, nello studio preliminare effettuato dal candidato lo stadio clinico WHO presenta solo un debole valore prognostico. Nei 31 cani considerati, le concentrazioni di VEGF ottenute rispecchiano i diversi stadi clinici (aumento del VEGF negli stadi più avanzati), tuttavia, all'interno dei diversi gruppi non presentano differenze statisticamente significative. Correlando infine le concentrazioni di VEGF con l'intervallo libero da malattia è stato possibile evidenziare una differenza significativa fra il venticinquesimo percentile superiore e quello inferiore.

Sulla base di tali considerazioni il VEGF sembra possedere un **valore prognostico** di rilievo, testimoniando il coinvolgimento dei meccanismi angiogenetici in corso di linfoma multicentrico. Questo aspetto presenta una notevole importanza, specialmente se si considerano i diversi tipi e sottotipi di linfomi e le diverse e molteplici variabili in grado di influenzare il comportamento biologico del tessuto tumorale nell'ambito di quella che erroneamente è spesso considerata in Medicina Veterinaria come un'unica entità patologica.

9.3 MMP2 E 9

In questo lavoro sperimentale la popolazione precedentemente studiata (Gentilini et al, 2005) è stata ampliata ed i soggetti inclusi nello studio preliminare, 23 cani affetti da linfoma multicentrico sono stati portati a 33. Nello studio statistico effettuato i valori dell'attività della MMP2 non presentano alcuna significatività.

Per quel che riguarda la MMP9 è possibile invece evidenziare una differenza significativa fra i soggetti affetti da linfoma ed il campione controllo ed inoltre nell'ambito dei due sottostadi clinici valutati (sottostadio a: concentrazioni di MMP9 statisticamente inferiori alla popolazione raggruppata nel sottostadio b).

Tuttavia sulla base di questi risultati non è possibile considerare la MMP9 un marker prognostico di linfoma canino in quanto la correlazione con il DFI non appare statisticamente significativa.

Per quanto riguarda la mancata corrispondenza fra MMP 9 e DFI, questo reperto sembra ricalcare alcune delle nuove prospettive attualmente sviluppate in medicina umana. La delusione delle aspettative legate alla terapia anti-metalloproteinasi, ha infatti introdotto il concetto di un possibile effetto difensivo delle metalloproteinasi di matrice all'interno del meccanismo patogenetico neoplastico che sembra riconducibile in parte alla loro capacità di rendere biodisponibili precursori **pro-** ed **anti-angiogenici** (quali VEGF; FGFβ o plasminogeno) (Overall, Kleinfeld, 2006).

Secondo gli autori questa biunivocità di ruolo potrebbe essere alla base della non corrispondenza fra DFI e concentrazioni di MMP-9; osservando il grafico numero 21, si può infatti notare come nel 40% circa dei pazienti che presentano una concentrazione di MMP 9 compresa nel 25 esimo percentile superiore, il DFI sia prolungato rispetto a tutti i pazienti compresi nel 25 esimo percentile inferiore. Questa ovviamente rimane una considerazione fortemente limitata dal ristretto numero di

soggetti compresi nell'analisi, ma pone le basi per ulteriori approfondimenti nell'ambito del controverso ruolo delle MMPs in corso di linfoma nella specie canina.

9.4 CRP

In medicina veterinaria le proteine di fase acuta rappresentano una realtà appena più che recente ed in totale evoluzione. La scelta di valutare la proteina c reattiva in corso di linfoma multicentrico nel cane si è sviluppata a partire da diverse considerazioni. Fra queste il frequente coinvolgimento della risposta infiammatoria in corso di neoplasia ed il suo ruolo apparentemente prognostico negativo in diverse tipologie di tumori solidi rappresentano un interrogativo fondamentale. Bisogna inoltre ricordare la necessità di individuare un marker precoce di stato infiammatorio, maggiormente sensibile rispetto alla risposta leucocitaria e maggiormente indicato per pazienti, quali quelli sottoposti a chemioterapia, in cui un possibile coinvolgimento midollare può alterare la produzione dei globuli bianchi. Nelle pubblicazioni ad oggi consultabili relative all'argomento CRP-linfoma canino (Tecles et al, 2005; Mischke et al, 2006; Merlo et al, 2007), la concentrazione di questa proteina sembra significativamente aumentata nei cani portatori della patologia rispetto agli animali controllo. Lo stesso risultato si evidenzia nella presente sperimentazione. Quando comparata al diverso sottostadio, la concentrazione di CRP non appare tuttavia statisticamente differente, ma solo tendenzialmente differente ($p = 0,08$). Questo effetto può essere spiegato con la scarsa specificità di questo marker, e probabilmente con l'impossibilità di escludere nei soggetti affetti da linfoma multicentrico la presenza di una risposta infiammatoria dipendente o meno dalla neoplasia (per esempio osservazione di elevate concentrazioni di CRP in soggetti affetti da linfoma intestinale, riconducibili probabilmente all'entità del danno tessutale e del processo flogistico intra-addominale o incremento della concentrazione in soggetti affetti da patologie cutanee infettive).

In conclusione i dati emersi da questo studio risultano purtroppo estremamente eterogenei ed a causa del ristretto numero di soggetti valutati, rimangono ancora molti gli interrogativi riguardo il consapevole utilizzo di questo marker nella valutazione e nel monitoraggio del cane affetto da linfoma multicentrico.

9.5 LDH ED Hb

Entrambi questi marker sono ad oggi riconosciuti quali marker prognostici di linfoma multicentrico in medicina umana e veterinaria. Nella sperimentazione effettuata le concentrazioni di Hb ed LDH ottenute risultano statisticamente differenti in relazione al sottostadio presente, ma nessuno di questi due parametri sembra presentare un'influenza significativa sul DFI. Osservando tuttavia la concentrazione emoglobinica nei nostri pazienti è possibile notare come non siano presenti all'ammissione numerosi pazienti anemici e come, nei pochi in cui la riduzione di Hb risulti presente (concentrazioni emoglobiniche inferiori a 12) solo il 50% di questi (un totale di 8 cani su 16) sia stato sottoposto a chemioterapia e di conseguenza inserito nella correlazione con l'intervallo libero da malattia.

Per quel che concerne l'LDH è invece importante ricordare come i dati attualmente presenti in letteratura veterinaria appaiano non perfettamente concordanti e studi recenti sembrano concentrarsi maggiormente sul valore prognostico delle singole isoforme anziché della concentrazione sierica totale di LDH.

9.6 CONCLUSIONI

Scopo di questo studio era quello di effettuare una valutazione ad ampio raggio di diversi parametri clinico patologici utilizzabili in corso di linfoma multicentrico nel cane e di evidenziarne la possibile rilevanza prognostica. I marker prescelti dagli Autori interpretavano, oltre che

diversi meccanismi patogenetici, diversi aspetti e livelli dell'interazione neoplasia –ospite.

Importante limite di questo studio risulta, come frequentemente in questo tipo di sperimentazioni, l'assetto retrospettivo, la mancanza o la difficoltà nella standardizzazione della raccolta e conservazione delle matrici utilizzabili e la progressiva riduzione della popolazione campione nei diversi livelli di analisi statistica. Nella valutazione prognostica dei marker studiati, inoltre, la correlazione con il DFI è ovviamente limitata dall'esecuzione del trattamento chemioterapico e di conseguenza comporta l'esclusione di una parte rilevante della popolazione di partenza. Nell'oncologia veterinaria infatti, lo studio effettuato sulla sopravvivenza, a differenza di quanto accade in Medicina Umana, è condotto su una popolazione non casuale essendo essa il risultato di una prima selezione, trattamento chemioterapico verso eutanasia, influenzata prevalentemente dalle condizioni cliniche del paziente all'ammissione (sottostadio). Nonostante queste considerazioni e le limitazioni emerse, è importante sottolineare come nell'eterogeneità della popolazione studiata il VEGF rappresenti nel cane, come nell'uomo, un marker prognostico per il linfoma multicentrico. Una valutazione più approfondita delle concentrazioni sieriche di VEGF in corso di chemioterapia, attraverso prelievi seriali, nel corso di una nuova ricerca, potrebbe rafforzare la nostra convinzione che tale fattore possa costituire un marker precoce dell'andamento della malattia. Se ciò trovasse conferma, il VEGF potrebbe essere inserito, a pieno titolo, in un protocollo diagnostico e di monitoraggio nell'ambito della clinica e della terapia oncologica. In particolar modo, l'evidenziazione di un eventuale aumento delle concentrazioni sieriche di VEGF in corso di recidiva, supporterebbe la convinzione, condivisa anche dagli autori del presente lavoro, che una terapia di tipo anti-angiogenico possa costituire un efficace ausilio ai moderni trattamenti chemioterapici e radioterapici.

BIBLIOGRAFIA

Arbiser J.L., Moses M.A., Fernandez C.A., Ghiso N., Cao Y., Klauber N., Frank D., Brownlee M., Flynn E., Parangy S., Byers H.R., Folkman J.

“Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways.”

Proc.Natl.Acad.Science. USA, Vol **94**: 861-866, February 1997.

Arbiser J.L., Larsson H., Claesson-Welsh L., Bai X., LaMontagne K., Weiss S.W.

“Overexpression of VEGF₁₂₁ in Immortalized Endothelial Cells Causes Conversion to Slowly Growing Angiosarcoma and High Level Expression of the VEGF Receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in Vivo”.

American Journal of Pathology, Vol **156**, No.4:1469-1475, 2000.

Baskin C., Couto G., Wittum T.E.

“Factors Influencing First Remission and Survival in 145 Dogs With Lymphoma: A Retrospective Study”.

JOURNAL of the American Animal Hospital Association, Vol 36: 404-410, 2000.

Bergers G., Brekken R., McMahon G., Vu T.H., Itoh T., Tamaki K., Tanzawa K. Thorpe P., Itohara S., Hanah D.

“Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis”.

Nat Cell Biol, Vol **2** (10): 737-44, Oct 2000.

Bouafia F., Draï J., Bienvenu J., Thieblemont C., Salles G., Coiffier B.

“Profiles and prognostic values of serum LDH isoenzymes in patients with haematopoietic malignancies”.

Bull Cancer, Vol 91(7-8): 229-40, 2004.

Bruns C.J., Liu W., Davis D.W., Shaheen R.M., McConkey DJ., Wilson M.R. “Vascular Endothelial Growth Factor is an in Vivo Survival Factor for Tumor Endothelium in a Murine Model of Colorectal Carcinoma Liver Metastases”.

Cancer, Vol **89**, n.3: 488-499, 2000.

Ceròn J.J., Eckersall P.D., Martinez-Subiela S.

“Acute phase protein in dogs and cats: current knowledge and future perspectives”.

Veterinary Clinical Pathology, Vol **34**, n. 2: 85-99, 2005.

Chevalier S., Defoy I., Lacoste J., Hamel L., Guy L., Bègin L.R., Aprikian A.G. “Vascular endothelial growth factor and signaling in the prostate: more than angiogenesis”. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol **189**: 169-179, 2002.

Clifford C.A., Hughes D., Beal W., Mackin A.J., Henry C.J., Shofer F.S., Sorenmo K.U.

“Plasma Vacular Endothelial Growth Factor Concentrations in Healty Dogs and Dogs with Hemangiosarcoma”. *J Vet Intern Med*, Vol **15**: 131-135, 2001.

Cotran R.S., Kumar V., Collins T.

Robbins Pathologic Basis of Disease. *W.B. Saunders Company*, Sixth Edition 1999.

Dittandi R., Meo S., Fabris F., Gasparini G., Contri D. Medici M., Gion M.

“Validation of blood collection procedures for the determination of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) in different blood compartments”.

Internal Journal Biology Markers, Vol **16**: 87-96, Apr-Jun 2001.

Drake CJ.

“Embrionic and Adult Vasculogenesis”.

Birth Defects Res. Part. C. Embryo Today, Vol **69**(1): 73-82, February 2003.

Ferrara N., Carver-Moor K., Chen H., Dowd M.,Lu L.

“Heterozygous embryonic lethality induced by target inactivation of the VEGF gene”.

NATURE **380**: 439-442. 1996.

Ferrara N., Davis-Smyth T.

“The biology of vascular endothelial growth factor”.

Endocrine Reviews, Vol **18**, (1): 4-24, February 1997.

Ferrara N.

“Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis”.

American Journal Physiol. Cell Phisiol, **280**: C1358-C1366, 2001.

Ferrara N.

“VEGF and the quest for tumor angiogenesis factors”.

Nature Reviews / Cancer Vol **2**: 795-803,October 2002.

Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J.

“The biology of VEGF and its receptors”.

Nature Medicine, Vol. **9**,(6): 669-676, June 2003.

Folkman J., Shing Y.

“Angiogenesis”. *The Journal of Biological Chemistry* , Vol **267**, No.16: 10931-10934, June 1992.

Garrett L.D., Thamm D.H., Chun R., Dudley R., Vail D.M.

“Evaluation of a 6-Month Chemotherapy Protocol with No Maintenance Therapy for Dogs with Lymphoma”.

J Vet Intern Med, Vol **16** (6):704-709, Dec. 2002.

Gentilini F., Calzolari C., Turba M.E., Agnoli C., Fava D., Forni M., Famigli Bergamini P.

“Prognostic Value of Serum Vascular endothelial growth Factor (VEGF) and plasma activity of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and) in lymphoma-affected dogs”.

Leukemia Reserch, Vol 29: 1263-1269, 2005.

Giavazzi R., Sennino B., Coltrini D., Garofano A., Dossi R., Ronca R., Molinari Tosatti M.P., Presta M.

“Distinct Role of Fibroblast Growth Factor-2 and Vascular Endothelial Growth Factor on Tumor Growth and Angiogenesis”.

American Journal of Pathology, Vol. **162**, No. 6: 1913-1926, June 2003.

Graham J.C., Myers R.K.

“The prognostic Significance of Angiogenesis in Canine Mammary Tumors”.

J Vet Intern Med, Vol **13**: 416-418, 1999.

Guo P., Xu L., Pan S., Brekken R., Yang ST. Whitaker G., Nagane M.

“Vascular endothelial growth factor isoforms display distinct activities in promoting tumor angiogenesis at different anatomic sites”.

Cancer Res, Vol. **61** (23): 8569-8577, December 2001.

Gupta M.K., Qin R.

“Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis”
World Journal of Gastroenterology, Vol. **9**(6): 1144-1155, 2003.

Jelkmann W.

“Pitfalls in the Measurement of Circulating Vascular Endothelial Growth Factor”.

Clinical Chemistry, Vol **47**: 617-623, 2001.

Josko J., Gwozdz B., Jedrzejowska-Szypulka H., Hendryk S.

“Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its effect on angiogenesis”.

Med Sci Monit, Vol **6**(5): 1047- 1052, 2000.

Kiupel M., Teske E., Bostock D.

“Prognostic Factors for Treated Canine Malignant Lymphoma”.

Vet Pathol. **34** (4): 296-300, 1998.

Kuhnen C., Lehnhardt M., Tolnay E., Muehlberger T., Vogt P.M.

“Patterns of expression and secretion of vascular endothelial growth factor in malignant soft- tissue tumors”. *Journal Cancer Res Clin Oncol*, Vol 126: **219-225**, 2000.

Jagielski D., Lechowski D., Hoffmann-Jagielska M., Winiarczyk S.

“A Retrospective Study of the Incidence and Prognostic Factors of Multicentric Lymphoma in Dogs (1998–2000)”

Journal of Veterinary Medicine Series A, Vol **49** Issue 8: 419 – 424, Oct. 2002

Laack E., Scheffler A., Burkholder I., Boeters I., Andritzky B., Schuch G., Görn M., Vohwinkel G., Edler L., Fiedler W., Hossfeld D.K.

“Pretreatment vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) serum levels in patients with metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC)”. *Lung Cancer*, 50: 51-58, 2005.

Lammert E., Gu G., McLaughlin M., Brekken R., Brown D.

**“Role of VEGF-A in Vascularization of Pancreatic Islets”.
Current Biology, Vol.13: 1070-1074, June 2003.**

Leibman N.F., Lana S.E., Hansen A., Power E., Fettman M.J., Withrow S.

**“Identification of Matrix Metalloproteinases in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors”.
Journal Vet. Intern Medicine, Vol 14: 583-586, 2000.**

Legouffe E., Rodriguez C., Picot C., Richard B., Klein B., Rossi J.F., Commes. T.

“C-reactive protein serum level is a valuable and simple prognostic marker in non Hodgkin's lymphoma”. *Leukemia & Lymphoma*, Vol 31 (3-4): 351-357, Oct. 1998.

Levy A.P., Levy N.S., Goldberg M.A.

**“Post-transcriptional Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by Hipoxia”.
The journal of Biological Chemistry, Vol. 271 No.5 Issue of february 2: 2746-2753, 1996.**

Lewin B.: In Lewin B., In: „Genes VII“.

Oxford Univesity, New York, 2000.

Liekens S., De Clercq E., Neyts J.

“Angiogenesis: regulators and clinical applications”.
Biochemical Pharmacology, Vol. **61**: 253-270, 2001.

List A.F.

“Vascular Endothelial Growth factor Signaling Pathway as an Emerging Target in Hematologic Malignancies”. *The Oncologist*, Vol (**6**) (suppl.5): 24-31, 2001.

Malemud C.J.

“Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease, an overview”.
Frontier in Bioscience, 11: 1696-1701, 2006.

Maloney J.P., Silliman C.C., Ambruso D.R., Wang J., Tudor R.M.

“In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation”.
American Journal Physiol., Vol **275**: H1054-H1061, 1998.

Merlo A., Gagliano Rezende B.C., Franchini M.L., Simones D.M., Ricci-Lucas S.R.

“Serum C-Reactive Protein Concentration in Dogs with multicentric Lymphoma undergoing Chemotherapy”. *JAVMA*, Vol **230**, n. 4: 522-526, feb. 2007.

Mischke R., Waterston M., Eckersall P.D.

“Changes in C-reactive protein and haptoglobin in dogs with lymphatic neoplasia”.
The Veterinary Journal, Vol **8**, Aug.2006.

Nakaichi M., Yunuki T., Okuda M., Une S., Taura Y.,

“Activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in canine oronasal tumors”

Res Vet Sci., Vol **82** (2) :271-9, Apr 2007.

Nielsen H.J., Werther K., Mynster T. and Brunner N.

“Soluble vascular endothelial growth factor in various blood transfusion components”. *Transfusion*, Vol **39**, October 1999.

Overall C.M, Kleifeld O.

“Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy”. *Nature Reviews Cancer*, Vol 6, 227-230, March 2006.

Papetti M., Herman I.M.

“Mechanism of normal and tumor-derived angiogenesis”. *American Journal Physiol. Cell Physiol.* Vol **282**: C947-C970, May, 2002.

Petersen H.H., Nilesen J.P. Heegaard P.M.

“Applications of acute phase respons protein in veterinary clinical chemistry”.

Veterinary Research, **35**: 163-187, 2004.

Ponce F., Magnol J.P.,Ledieu D., Marchald T., Turinelli V., Chalvet-Monfray K., Fournel-Fleury C.

“Prognostic significance of morphological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy”

The Veterinary Journal, **167**: 158–166, 2004.

Redondo-Muniz J., Escobar Diaz E., Samaniego R.,Terol M.J., Garcia Pardo A.

“*MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration*”. *Blood*. Vol 108 (9): 3143-51, Nov 2006.

Robinson C.J., Stringer S.E.

“The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors”.

Journal of Cell Science, Vol **114**: 853-865, Mar 2001.

Sakata K., Satoh M., Someya M., Asanuma H., Nagacura H., Oouchi A., Himi T.

“Expression of Matrix Metaloproteinase 9 is a Prognostic Factor in Patient with Non-Hodgkin Lymphoma”. *Cancer* Vol **100**: 356-365, Jan 2004.

Salgado R., Benoy I., Bogers J., Weytjens R., Vermeulen P., Dirix L., Van Marck E.

“Platelets and vascular endothelial growth factor (VEGF): A morphological and functional study”. *Angiogenesis*, Vol **4**: 37-43, 2001.

Salven P., Teerenhovi L., Joensuu H.

“A High Pretreatment Serum Vascular Endothelial Growth Factor Concentration Is Associated With Poor Outcome in Non Hodgkin’s Lymphoma”. *Blood*, Vol **90** (8- October 15): 3167-3172, 1997

Salven P.

“Angiogenesis in Lymphoproliferative Disorders”. *Acta Haematologica*, Vol **106**: 184-189, 2001.

Scheidegger P., Weiglhofer W., Suarez S., Kaser-Hotz B., Steiner R., Ballmer-Hofer K., Jaussi R.

“Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and its Receptor in Tumor-Bearing Dogs”.

Biol.Chem., Vol **380**: 1449-1454, December 1999

Shweiki D., Neeman M., Itin A., Keshet E.

“Induction of VEGF expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: Implications for tumor angiogenesis”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol **92**: 768-772, January 1995.

Spyridopoulos I., Luedemann C., Chen D., Kearney M., Chen D., Murohara T., Principe N., Isner J.M., Losordo D.W.

“Divergence of Angiogenic and Vascular Permeability Signaling by VEGF”.
Arterioscler Tromb Vasc Biol., Vol **22**: 901-906, 2002.

Swan F., Velasquez W.J., Tucker S., Redman J.R., Rodriguez M.A., McLaughlin, Hagemester P.F. and Cabanillas F.

“A New Serologic Staging System for Large-Cell Lymphomas Based on Initial O2-Microglobulin and Lactate Dehydrogenase Levels”.
Journal of Clinical Oncology, Vol **7**, No 10: 1518 pp 1518-1527, Oct. 1989.

Taichman N.S., Young S., Cruchley A.T., Taylor P., Paleolog R.

“Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor”. *Journal of Leukocyte Biology*, Vol **62**: 397-399, September 1997

Takagi S., Kato Y., Asano K., Oshaki T., Bosnakovsky D., Hoshino Y., Okumura M., Fujinaga T.

“Matrix Metalloproteinase Inhibitor RECK Expression in Canine Tumors”.
J. Vet. Med. Sci., **67** (8): 761-767, 2005.

Tamura M., Oda M., Matsumoto I., Tsunezuca Y., Kawakami K., Watanabe G.

“The combination assay with circulating vascular endothelial growth factor (VEGF)-C, matrix metalloproteinase-9, and VEGF for diagnosing lymph node metastasis in patients with non-small cell lung cancer”.

Annals of Surgical Oncology, **11** (10): 928-933, 2004.

Tecles F., Spiranelli E., Bonfanti U., Ceròn J.J., Paltrinieri S.

“Preliminary Studies of Serum Acute Phase Protein Concentrations in Hematologic and Neoplastic Diseases of the Dog”.

J. Veterinary Internal Medicine, **19**: 865-870, 2005.

Tezono K, Sarker KP, Kikuchi H, Nasu M, Kitajima I, Maruyama

“Bioactivity of the vascular endothelial growth factor trapped in fibrin clots: production of IL-6 and IL-8 in monocytes by fibrin clots”.

Haemostasis, **31**: 71–9, 2001.

Turba M.E, Forni M., Gandini G., Gentilini F.

“Recruited leukocytes and local synthesis account for increased matrix metalloproteinase-9 activity in cerebrospinal fluid of dogs with central nervous system neoplasm”. *J Neurooncol*; Vol **81** (2):123-129, Jan 2007.

Van Valckenborgh E., Croucher P.I., De Raeve H., Carron C., De Leenheer E., Blacher S., Devy L., Noel A., De Bruyne E, Asosingh K., Van Riet N., Van Camp B., Vanderkerken K.

“Multifunctional Role of Matrix Metalloproteinases in Multiple Myeloma A Study in the 5T2MM Mouse Model”. *American Journal of Pathology*; Vol 165 (3): 869-878, Sept 2004.

Wong AK., Alfert M., Castrillon DH., Shen Q., Holash J., Yancopoulos G.

“Excessive tumor-elaborated VEGF and its neutralization define a lethal paraneoplastic syndrome”. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* Vol **19**;98(13): 7481-7486, Jun 2001.

Wynendaele W., Derua R., Hoylaerts M.F., Pawinski A., Waelkens E., De Bruijn E.A., Paeridaens R.

“Vascular endothelial growth factor measured in platelet poor plasma allows optimal separation between cancer patients and volunteers: A key study an angiogenic marker in vivo?” *Annals of Oncology*, Vol **10**: 965-971, 1999.

Yoon S.O., Park S.J., Yun C.H., Chung A.S.

“Roles of Matrix Metalloproteinases in Tumor Metastasis and Angiogenesis”.

J. of Biochemistry and Molecular Biology, Vol **36** No. 1: 128-137, Jan 2003.

Zanatta R., Abate O., D’Angelo A., Miniscalco B. Mannelli A.

“Diagnostic and Prognostic Value of Serum Lactate Dehydrogenase (LDH) and LDH Isoenzymes in Canine Lymphoma”.

Veterinary Research Communications, Vol **27** (Suppl. 1): 449–452, 2003.

Zietz C., Rossle M., Haas C., Sendelhofert A., Hirschmann A.

“MDM-2 Oncoprotein Overexpression , p53 Gene Mutation, and VEGF Up-regulation in Angiosarcomas”. *American Journal of Pathology*, Vol **153**, No.5: 1425-1432, 1998.

Zimmerman R.,Koenig J., Zingsem J.,Weisbach V., Strasser E., Ringwald J. and Eckstein R.

“Effect of Specimen Anticoagulation on the Measurement of Circulating Platelet-Derived Growth Factors”.

Clinical Chemistry, Vol **51** (12): 2365-2369, 2005.