

Università degli Studi di Milano
Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche

Curriculum di Medicina Molecolare delle Reazioni Immuni ed
Infiammatorie

Ciclo XXIV
Anno Accademico 2010/2011

Dottorando: Elena COLOMBO

**PROGENITORI ENDOTELIALI
CIRCOLANTI: CARATTERIZZAZIONE
IN SOGGETTI CON SARCOMA DI
KAPOSI CLASSICO ED EFFETTI
DELL'INFEZIONE *IN VITRO* DA HHV-8**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Mario Clerici

Tutore: Prof. Della Bella Silvia

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

SCUOLA DI DOTTORATO
Medicina Molecolare

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche

Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare
Curriculum: Medicina Molecolare delle Reazioni Immuni e Infiammatorie

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

Progenitori Endoteliali Circolanti: Caratterizzazione in Soggetti con Sarcoma di
Kaposi Classico ed Effetti dell'Infezione *in Vitro* da HHV-8

Settore MED/04 - Patologia Generale

COLOMBO Elena
Matricola R08111

TUTORE: Dott.ssa DELLA BELLA Silvia

COORDINATORE DEL DOTTORATO: Prof. CLERICI Mario

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

SOMMARIO

Introduzione

Il Sarcoma di Kaposi (KS) è una malattia angioproliferativa associata all'infezione dal virus erpetico umano 8 (HHV-8). Le *spindle cells* sono le cellule caratteristiche delle lesioni sarcomatose e sono cellule di origine endoteliale. Abbiamo precedentemente dimostrato che i progenitori endoteliali (late-EPCs) coltivati ex vivo da soggetti con KS classico (cKS) sono HHV-8 infetti e supportano la replicazione litica virale. In questo studio abbiamo valutato se le late-EPCs isolate da soggetti con cKS mostrano caratteristiche differenti rispetto alle late EPCs isolate da soggetti sani considerando l'efficienza di isolamento, l'espansione ex vivo e le caratteristiche biologiche. Inoltre abbiamo infettato in vitro le late-EPC isolate da soggetti sani per valutare se le late-EPCs sono infettabili e se supportano la replicazione virale. Abbiamo inoltre analizzato gli effetti dell'infezione su multipli aspetti della biologia delle late-EPCs.

Metodi

Le late-EPC sono state coltivate da cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC) di 69 soggetti con cKS (cKS-late-EPC) e 40 soggetti sani HHV-8 sieronegativi (ctr-late-EPC) appaiati per sesso ed età. Brevemente, i PBMC sono stati seminati in EGM-2 in piastre da 24 pozzetti coattate con collagene o fibronectina e le late-EPCs sono state identificate come piccole colonie. Le colture di ogni soggetto sono state osservate per il tempo di comparsa e il numero di colonie, vitalità cellulare, proliferazione e produzione di citochine. Le ctr-late-EPC sono state infettate in vitro con HHV-8 e gli effetti dell'infezione sono stati valutati analizzando i seguenti parametri: morfologia cellulare, proliferazione, immunofenotipo e capacità angiogenica.

Risultati

Nel nostro studio abbiamo dimostrato che la frequenza di isolamento delle late-EPCs dipende dal substrato utilizzato per la semina dei PBMC. Il tempo medio di comparsa delle colonie di late-EPCs è significativamente basso nelle cKS-late-EPC rispetto alle ctr-late-EPC ($P < 0.001$). Il numero di colonie di late-EPC per 20×10^6 PBMC seminati è significativamente maggiore nei soggetti con cKS rispetto ai soggetti sani ($P < 0.001$). La senescenza compare tardivamente nelle cKS-late-EPC rispetto alle ctr-late-EPC. Inoltre la proliferazione cellulare e la produzione di IL-6 sono maggiori nelle cKS-late-EPC rispetto alle ctr-late-EPC.

L'infezione *in vitro* da HHV-8 induce le ctr-late-EPC ad acquisire una morfologia fusata simile a quella delle *spindle cells* del KS. HHV-8 induce nelle ctr-late-EPC una riduzione della proliferazione e promuove l'attivazione delle late-EPC inducendo l'up-regulation di VCAM-1, ICAM-1, e-selectina. L'infezione da HHV-8 inoltre induce l'up-regulation delle integrine CD49c and $\alpha v \beta 3$.

Conclusioni

In questo studio abbiamo dimostrato che le late-EPCs isolate da soggetti con cKS sono caratterizzate da un'alta espansione e proliferano maggiormente rispetto alle late-EPCs isolate da soggetti sani. Inoltre le late-EPCs supportano l'infezione da HHV-8 e la replicazione virale e acquisiscono caratteristiche morfologiche e funzionali delle *spindle cells* del KS.

Questi nuovi risultati potrebbero essere particolarmente rilevanti per la comprensione della patogenesi del KS, dato che le late-EPC potrebbero rappresentare i precursori putative delle *spindle cells* che localizzandosi in siti permissivi potrebbero proliferare e indurre la formazione di nuove lesioni sarcomatose.

ABSTRACT

Background

Kaposi's sarcoma (KS) is an angioproliferative disorder associated with human herpesvirus-8 (HHV-8) infection. *Spindle cells* are the predominant cell type in the KS lesions and are endothelial in origin. We previously demonstrated that endothelial progenitor cells (EPCs) cultured *ex vivo* from KS classic (cKS) patients as late-EPCs are HHV-8-infected and support viral productive replication. In this study we investigated whether late-EPCs from KS patients showed a different *in vitro* behaviour compared to late-EPCs from healthy controls, in terms of efficiency of *ex vivo* isolation, and biological features. Moreover we infected *in vitro* control late-EPCs to investigate whether late EPCs can be infectable with HHV-8 and whether they support viral replication. We also analyzed the effects of HHV-8 infection on multiple aspects of late-EPCs biology.

Methods

Late-EPC were cultured from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 69 cKS patients (cKS-late-EPC) and 40 sex and age-matched healthy HHV-8 seronegative controls (ctr-late-EPC). Briefly, PBMCs were seeded on collagen-coated or fibronectin-coated plates in EGM-2 and late-EPCs were identified as cobblestone-like colonies. Cultures from all subjects were observed for initial late-EPCs colony appearance and number of colonies, cell viability, cell proliferation and cytokine production. ctr-late-EPC was infected *in vitro* with HHV-8 and the effects of HHV-8 infection on late-EPC biology were investigated by analyzing the following parameters: cell morphology, proliferation, immunophenotype and angiogenesis.

Results

In our study we demonstrated that the frequency of late EPCs isolation depends on substrate used to seed PBMCs. The average time of initial late-EPCs colony appearance was significantly lower in cKS-late-EPC than ctr-late-EPC ($P < 0.001$). The number of late-EPC colonies per 20×10^6 seeded PBMCs was significantly higher in cKS-late-EPC than ctr-late-EPC ($P < 0.001$). Senescence appear later time in cKS-late-EPC than ctr-late-EPC. Moreover, cell proliferation and IL-6 production was higher in cKS patients than healthy controls. This data suggest that the presence of HHV-8 infection in cKS-late-EPC may induce late-EPCs to acquire several feature that resemble *spindle cells*. HHV-8 *in vitro* infection induced ctr-late-EPC to acquire a spindle shape similar to the morphology of KS *spindle cells*. HHV-8 induced ctr-late-EPC to reduce proliferation and promoted the activation of late-EPCs inducing the up-regulation of VCAM-1, ICAM-1, e-selectin. HHV-8-infection also induced the up-regulation of CD49c and $\alpha v \beta 3$ integrins.

Conclusions

In this study we provide evidence that late-EPCs obtained from patients with cKS are characterized by strikingly higher *ex vivo* expansion and proliferation rate than late-EPCs from healthy controls. Moreover, upon HHV-8 *in vitro* infection, EPCs support persistent viral productive replication and acquire morphologic and functional features of KS *spindle cells*.

These novel findings may be particularly relevant to the comprehension of KS pathogenesis, because late-EPCs may represent putative precursors of *spindle cells* that may home to permissive sites and propagate to produce KS lesions.

*“...the only thing required to be good scientists
is the faculty of wonder...”*

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Il Sarcoma di Kaposi	2
1.1.1. Epidemiologia	2
1.1.2. Istopatologia e manifestazioni cliniche	4
1.1.3. Eziopatogenesi	8
1.1.3.1. <i>Virus erpetico umano 8 (HHV-8)</i>	8
1.1.3.2. <i>Disregolazione del sistema immunitario</i>	11
1.1.3.3. <i>Coinvolgimento endoteliale ed ambiente infiammatorio</i>	13
1.2. Le Spindle Cells nel Sarcoma Di Kaposi	16
1.2.1. Origine delle <i>spindle cells</i>	16
1.2.2. Colture in vitro di <i>spindle cells</i> da Sarcoma di Kaposi	18
1.2.3. Modelli ed effetti dell'infezione in vitro di cellule endoteliali mature	19
1.3. Le Cellule Endoteliali Progenitrici	23
1.3.1. Ruolo dei progenitori endoteliali nei processi angiogenetici	25
1.3.2. Coltura dei progenitori endoteliali <i>in vitro</i>	27
1.3.3. I progenitori endoteliali nel Sarcoma di Kaposi	29
2.SCOPO DEL LAVORO	31
3.MATERIALI E METODI	34
3.1. Soggetti in studio	35
3.2. Reagenti e terreni	35
3.3. Colture cellulari	37
3.4. Isolamento e coltura dei progenitori endoteliali	37
3.4.1. Separazione delle cellule mononucleate da sangue venoso periferico	37
3.4.2. Allestimento colture di late-EPCs	38
3.5. Analisi della comparsa delle late-EPCs	39

3.5.1. Conta e analisi morfologica	39
3.5.2. Analisi immunofenotipica	39
3.5.2.1. <i>Analisi citofluorimetrica</i>	39
3.5.2.2. <i>Analisi immunoistochimica</i>	40
3.6. <i>Caratterizzazione delle colture di late-EPCs</i>	41
3.6.1. Senescenza	41
3.6.2. Capacità proliferativa	41
3.6.3. Vitalità cellulare	41
3.7. <i>Caratterizzazione funzionale delle late-EPCs</i>	41
3.7.1. Produzione di citochine	41
3.7.2. Vasculogenesi in vitro	42
3.8. <i>Valutazione della presenza di HHV-8 nelle late-EPCs di soggetti con cKS</i>	42
3.8.1. Immunofluorescenza della proteina LANA	42
3.9. <i>Infezione in vitro delle late-EPCs di soggetti sani</i>	42
3.10. <i>Valutazione dell'infezione in vitro da HHV-8</i>	43
3.10.1. Estrazione del DNA virale	43
3.10.2. Quantificazione del genoma virale mediante PCR	43
3.11 <i>Analisi Statistica</i>	44
4. RISULTATI	45
4.1. <i>Ottimizzazione del metodo di coltura</i>	46
4.2. <i>Confronto tra late-EPCs isolate da soggetti con cKS e soggetti sani</i>	51
4.2.1 Efficienza di isolamento delle colonie di late-EPCs	51
4.2.1.1 <i>Frequenza di soggetti da cui sono state isolate colonie di late-EPCs</i>	51
4.2.1.2. <i>Tempo di comparsa delle colonie di late-EPCs</i>	54
4.2.1.3 <i>Numero di colonie di late-EPCs</i>	57
4.2.2. <i>Espansione in vitro delle late-EPCs</i>	60

4.2.2.1. <i>Senescenza</i>	60
4.2.2.2. <i>Proliferazione</i>	61
4.2.2.3. <i>Vitalità cellulare</i>	62
4.2.3. <i>Produzione di citochine</i>	62
4.3. <i>Quantificazione dell'infezione da HHV-8 nelle late-EPCs dei soggetti con cKS</i>	64
4.3.1. <i>Valutazione dell'espressione della proteina virale di latenza LANA</i>	64
4.4. <i>Infettabilità in vitro delle late-EPCs con HHV-8</i>	66
4.4.1. <i>Valutazione della percentuale di cellule infettate</i>	66
4.4.2. <i>Valutazione della persistenza dell'infezione mediante PCR</i>	67
4.4.3. <i>Effetti dell'infezione in vitro sulla biologia delle late-EPC</i>	70
4.4.3.1. <i>Effetti sulla morfologia</i>	70
4.4.3.2. <i>Effetti sulla vitalità e proliferazione cellulare</i>	70
4.4.3.3. <i>Effetti sullo stato di attivazione</i>	71
4.4.3.4. <i>Angiogenesi in vitro</i>	73
5. DISCUSSIONE	74
6. CONCLUSIONI	83
7. BIBLIOGRAFIA	85

1. INTRODUZIONE

1.1 Il Sarcoma di Kaposi

Il Sarcoma di Kaposi (KS) è una patologia linfoangioproliferativa di origine multifattoriale, caratterizzata da profonde alterazioni a carico del sistema immunitario e da un'intensa proliferazione delle cellule endoteliali [1].

Malattia ad esordio multifocale, il Sarcoma di Kaposi si manifesta attraverso placche e noduli angiomatosi di interesse prevalentemente cutaneo ma con possibile estensione anche ad organi interni.

Nel 1872 Moriz Kaposi descrisse per la prima volta questa malattia [2], che colpiva prevalentemente gli uomini al di sopra della quinta decade di vita, di origine italiana, ebraica o mediterranea e con evoluzione relativamente aggressiva. Oggi si conoscono quattro varianti cliniche di KS: classico (cKS), endemico, iatrogeno, associato ad AIDS.

Nel 1994 è stata dimostrata una forte associazione con il virus erpetico umano 8 (Human Herpes Virus 8, HHV-8), chiamato anche KSHV (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus), appartenente alla famiglia Herpes viridae, che lo rende un agente necessario, ma non sufficiente, per lo sviluppo del tumore [3].

1.1.1 Epidemiologia

Data la stretta associazione tra KS e infezione da HHV-8, l'epidemiologia del KS riflette, in parte, la sieroprevalenza dell'infezione da HHV-8.

Considerando la popolazione generale, l'infezione da HHV-8 ha bassa incidenza, inferiore al 5%, in Asia, nel Nord Europa, in Australia e in America, mentre aumenta nei paesi mediterranei, con valori compresi tra il 4 e il 35%, e nell'Africa sub-sahariana, dove varia tra il 20 e il 70%. [4].

In Africa, dove si osserva la massima prevalenza di HHV-8, si manifesta la variante endemica del KS (detta appunto africana). Nel bacino mediterraneo, altra area ad alta prevalenza di HHV-8, si riscontra la variante classica. Infine in America la variante più frequentemente osservata è quella associata all'AIDS, diffusa soprattutto nella popolazione omosessuale con HIV.

La frequenza del KS associato all'AIDS si sta riducendo nel mondo occidentale per l'efficacia della terapia antiretrovirale HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) nel trattamento dell'infezione da HIV [5]. La maggior diffusione dell'AIDS in Africa, dove la terapia HAART non viene applicata per motivi economici, sta causando invece il progressivo aumento della prevalenza di KS associato all'AIDS in questo continente.

La maggior parte delle infezioni primarie da HHV-8 è asintomatica. Studi clinici ed epidemiologici hanno dimostrato che, negli adulti sani, si instaura generalmente un controllo immunologico dell'infezione virale. Si ritiene che il KS si sviluppi quando il sistema immunitario dell'individuo non è più in grado di contrastare l'infezione, sia per un indebolimento fisiologico (età avanzata), sia a causa di condizioni di immunodepressione patologiche (AIDS) o iatrogene (trapiantati). Recenti studi mostrano un nuovo scenario, nel quale l'insorgenza del KS iatrogeno potrebbe essere legato al tipo di immunosoppressore utilizzato nella terapia post trapianto. Infatti è dimostrato che il cambio di terapia, da ciclosporina a rapamicina, permette

la regressione delle lesioni di KS sviluppate durante l'utilizzo del primo immunosoppressore [6].

La variante classica (cKS) è una patologia rara, dal decorso clinico tendenzialmente favorevole, diffusa nell'area mediterranea, con maggior prevalenza in Italia, Grecia, Turchia e Israele [7]. La variante classica del KS colpisce in maggioranza gli uomini in età avanzata con un rapporto uomo-donna di 10-15:1 [8]. La più alta incidenza del cKS negli uomini suggerisce che il genere possa essere un fattore di rischio per lo sviluppo della patologia [7]. La relazione tra risposta immunitaria ed ormoni steroidei suggerisce che un eccesso di androgeni possa influenzare la proliferazione linfocitaria e la produzione di citochine infiammatorie favorendo la progressione del cKS [9].

L'età dei soggetti rappresenta un fattore fondamentale nell'insorgenza del cKS. Studi di incidenza sulla popolazione Europea e Statunitense hanno riportato che solo il 4-8% dei casi di cKS si evidenziano in soggetti con età inferiore ai 50 anni.

Nonostante la trasmissione di HHV-8 avvenga sia per via sessuale che attraverso la saliva sono stati segnalati solo rari casi di KS famigliari, suggerendo che altri cofattori siano necessari per lo sviluppo della malattia [10; 11; 12].

Rispetto alle altre forme di KS, la forma classica è caratterizzata da un'evoluzione lenta e da un decorso benigno, che raramente richiedono un trattamento chemioterapico. Anche dopo chemioterapia, il DNA di HHV-8 è rilevabile nelle lesioni cutanee, suggerendo la possibilità di recidiva.

La variante classica risulta essere un ottimo modello di tumore virus-associato, dato che, a differenza delle altre forme, non presenta altri fattori interferenti, quali infezioni da parte di altri virus o immunosoppressione iatrogena e pertanto verrà utilizzata in questo studio.

Il KS endemico o africano colpisce uomini con un'età media intorno ai 35 anni e bambini con un'età media di 3 anni [13], con prevalenza maggiore nell'Africa equatoriale (Zaire, Uganda, Tanzania).

Il KS africano si presenta in quattro diverse forme: una è molto simile al classico ma colpisce i soggetti giovani, le altre tre sono molto aggressive e simili alla forma associata ad AIDS nella progressione. Una di queste rimane a livello cutaneo con locale invasione tissutale, mentre le altre si verificano più spesso nei bambini e hanno un decorso molto aggressivo, con coinvolgimento viscerale [8]. Nonostante questa eterogeneità clinica tutte le forme di KS in Africa sono associate all'infezione da HHV-8, che in questo continente ha distribuzione omogenea.

L'età precoce di insorgenza di alcune forme di KS endemico sembrerebbe attribuibile ad una elevata sieroprevalenza di HHV-8 nei bambini, secondaria sia a trasmissione materno-fetale che a trasmissione per via salivare [14; 15].

Il KS associato ad AIDS è la neoplasia più comune tra gli uomini omosessuali e bisessuali con AIDS, dimostrando che l'infezione da HHV-8 avviene prevalentemente per via sessuale e che questa rappresenta la maggior variabile epidemiologica di questa forma di KS.

La malattia è molto aggressiva ed esita in complicazioni mucosali più frequentemente che nelle altre forme [16]. Si presenta comunemente con una forma multifocale ed evolve velocemente sia se compaiono lesioni cutanee sia se c'è disseminazione viscerale.

E' stato ipotizzato che il KS sia più frequente e aggressivo in questi soggetti non solo a causa dell'immunosoppressione causata da HIV, ma anche per possibili effetti promuoventi del retrovirus sull'attività di HHV-8. Infatti, l'uso più frequente di terapie antiretrovirali (HAART) ha portato alla regressione di questo tumore insieme a quella dell'AIDS, mentre la mancanza di una risposta alla terapia è associata con una progressione di questa forma di KS [5].

La forma iatrogena del KS si sviluppa nei soggetti trapiantati, sottoposti ad un intenso trattamento immunosoppressivo, che può essere in grado di riattivare HHV-8 rimasto latente [17]. Infatti, la maggior parte dei soggetti affetti dal KS iatrogeno risultano sieropositivi già prima del trapianto; tuttavia sono stati osservati anche casi di sieroconversione conseguente al trapianto, suggerendo che l'infezione sia possibile anche attraverso organi di donatori infetti [18, 19].

1.1.2. Istopatologia e manifestazioni cliniche

Nello sviluppo del KS sono state descritte tre fasi istopatologiche distinte, che possono sovrapporsi: la fase di macula, di placca e di nodulo.

Nella *fase di macula*, che corrisponde all'esordio della malattia, si osserva una proliferazione di vasi sottili e angolati attraverso il derma, composti da cellule endoteliali piccole e irregolari, accompagnata dalla deposizione di emosiderina e scarso infiltrato infiammatorio ricco in plasmacellule e linfociti [20].

Nella *fase di placca* la natura vascolare della lesione diventa più evidente con la formazione di aree angiomatoidi, circondate da cellule denominate *spindle cells* che si organizzano in fasci, rendendo la lesione palpabile e confluyente. A questo punto il processo coinvolge l'intero derma reticolare e può estendersi anche allo strato sottocutaneo di grasso. Nella lesione si possono trovare anche un infiltrato infiammatorio perivascolare e istiociti con fenotipo sia delle cellule dendritiche dermali che delle cellule T e B, incluse le plasmacellule [20].

Nella *fase nodulare*, i noduli del tumore diventano più consistenti, a causa dell'estesa componente di *spindle cells* che si organizza in foglietti. I vasi hanno una lamina basale frammentata e frequenti discontinuità nello strato endoteliale. Può avvenire anche eritrofagocitosi e necrosi di cellule endoteliali [21, 22].

Le lesioni del KS contengono una gran varietà di tipi cellulari, tra cui cellule dell'endotelio, eritrociti extravasati, infiltrati di cellule infiammatorie e caratteristiche cellule a morfologia fusiforme, definite *spindle cells*, che sono considerate le cellule tumorali della lesione (Figura 1). Queste ultime esprimono sia marcatori della linea endoteliale (CD31, CD62, CD54, UEA-1 lecitina) che della linea monocitaria (CD23, CD13, HLA II) [23]. La biologia delle *spindle cells* è molto controversa e verrà discussa in seguito.

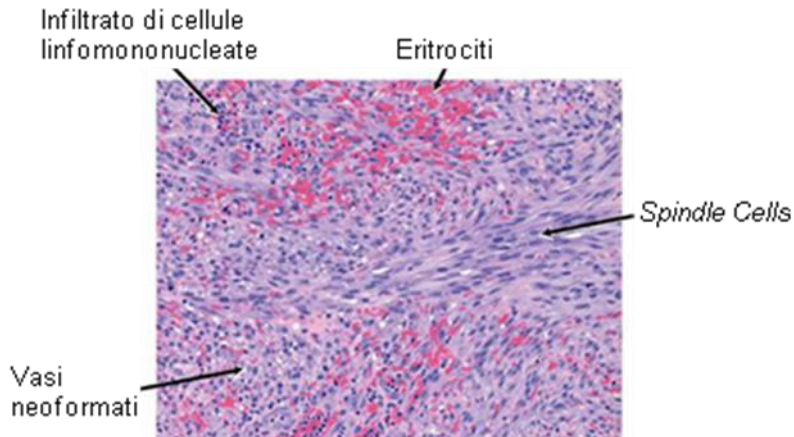


Figura 1: Caratteristica immagine istologica di lesione del Sarcoma di Kaposi (KS) dopo colorazione della biopsia tessutale con ematosillina-eosina.

Dal punto di vista clinico il KS si presenta solitamente con una o più lesioni nodulari o con placche asintomatiche di colore rosso-purpureo localizzate principalmente a livello cutaneo (Figura 2).

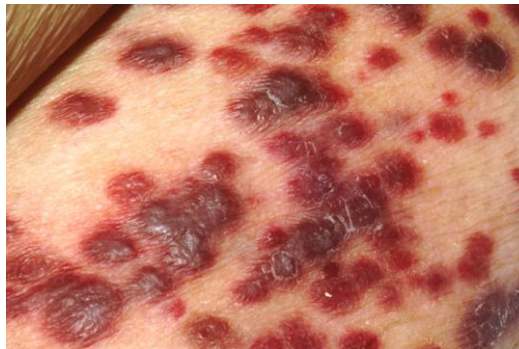


Figura 2: Manifestazione clinica del KS: più lesioni nodulari di colore rosso-purpureo localizzate a livello cutaneo.

Le lesioni sono principalmente confinate in uno o in entrambi gli arti inferiori specialmente a livello delle caviglie e dei piedi, ma non deve essere sottovalutato il coinvolgimento degli organi interni. La stasi venosa e il linfedema presente a livello degli arti inferiori agisce come cofattore nello sviluppo della patologia. Studi in vitro hanno mostrato, infatti, che l'esposizione cronica ad ipossia innesca la riattivazione virale in cellule infettate da HHV-8 [24]. L'ipossia causata dalla stasi ematica potrebbe, quindi, favorire la riattivazione virale in vivo, contribuendo allo sviluppo del KS. Questa variante del KS ha un decorso sostanzialmente indolente con andamento benigno che si protrae per più di 10-15 anni. In questo lasso di tempo, in assenza di trattamento, si assiste alla graduale comparsa di nuove lesioni ed ad una progressiva e lenta espansione del tumore originario. In casi sporadici si evidenzia la comparsa di lesioni a livello del tratto gastro-enterico, dei

linfonodi ed in altri organi. Le lesioni viscerali sono generalmente asintomatiche e, pertanto, vengono solitamente scoperte solo dopo autopsia.

Nel corso degli anni il metodo di classificazione del KS si è evoluto, prendendo in considerazione diversi aspetti clinici e istopatologici della malattia. Nel 1971 Taylor propose una classificazione che prendeva in considerazione solo le varianti classica, iatrogena ed endemica del KS, proponendo un sistema di classificazione in base all'aspetto clinico delle tre forme: nodulare, florido, infiltrativo, linfadenopatico [25].

Nel 1983, con la scoperta della variante associata all'AIDS, Kriegel ampliò i criteri di classificazione, proponendo quattro stadi della malattia, contemplando anche l'ipotesi del coinvolgimento viscerale o sistemico (Tabella 1).

STADIO I	Cutaneo, localmente indolente
STADIO II	Cutaneo, localmente aggressivo, con o senza coinvolgimento linfonodale regionale
STADIO III	Mucocutaneo generalizzato e/o coinvolgimento linfonodale
STADIO IV	Viscerale

Tabella 1: Classificazione di Kriegel del Sarcoma di Kaposi

Questa classificazione però aveva dei limiti, soprattutto per la variante AIDS associata. Per questo nel 1987 Mitsuyasu [26] e nel 1989 Chachowa e Krown [27; 28] introdussero nella loro classificazione il concetto di prognosi in funzione della stadiazione, riferendosi però alla sola variante AIDS associata, la cui frequenza è cresciuta moltissimo negli ultimi anni. Attualmente la classificazione più accreditata è quella proposta da Brambilla et al. [29], completata grazie all'osservazione di parametri clinici nuovi rispetto al passato, quali l'evoluzione e le complicanze, in modo da fornire indicazioni più precise nella decisione terapeutica (Tabella 2).

I criteri di valutazione prendono in considerazione diversi aspetti della patologia: il tipo predominante di lesione, con particolare riferimento all'aspetto istopatologico (nodulare, infiltrativo, florido, generalizzato, con o senza coinvolgimento viscerale) e il decorso clinico (non aggressivo, localmente aggressivo, disseminato aggressivo) ma anche la velocità di evoluzione della patologia (lenta A, veloce B). L'evoluzione si riferisce alla velocità della progressione, dove per rapida evoluzione si intende un aumento del numero totale dei noduli o delle placche o dell'area totale delle placche nei tre mesi precedenti all'osservazione. La presenza di lesioni a livello viscerale (tratto gastro-enterico, cavità orale, linfonodi e polmoni) è un evento piuttosto raro, che si verifica soprattutto negli stadi III e IV ad evoluzione rapida [29]. A questi elementi viene associata la presenza o l'assenza di complicanze (linfedema, linforragia, emorragia, dolore, etc.) che possono manifestarsi in ogni stadio.

Aspetto clinico	Lesioni prevalenti	Comportamento	Evoluzione	Complicanze
I NODULARE	Noduli e/o macule	Non aggressivo	Lenta (A) Veloce (B)	Linfedema Linforragia
II INFILTRATIVO +/- v	Placche infiltrative	Localmente aggressivo	Lenta (A) Veloce (B)	Dolore Ulcerazioni Impotenza
III FLORIDO +/- v	Noduli e placche angiomatose	Localmente aggressivo	Lenta (A) Veloce (B)	funzionale (deambulazione e pressione)
IV GENERALIZZATO +/- v	Noduli e placche angiomatose	Disseminato aggressivo	Lenta (A) Veloce (B)	

Nodulare: singoli elementi nodulari non confluenti e/o macule angiomatose localizzate ad uno o più arti

Infiltrativo: placche infiltrate coinvolgenti una o più parti

Florido: noduli o placche angiomatose coinvolgenti una o più parti

Generalizzato: noduli e placche angiomatose coinvolgenti anche il tronco e/o il volto

v: viscerale [coinvolgimento di mucose e/o visceri]

Veloce: comparsa di nuove lesioni entro 3 mesi dalla precedente osservazione

Tabella 2: Stadiazione del Sarcoma di Kaposi proposta da Brambilla et. al. [29]

Il trattamento del KS dipende dalla tipologia clinica della patologia, dall'estensione del tumore, ma anche dalle condizioni cliniche generali del paziente. Il trattamento va dalla semplice elastocompressione, alla chemioterapia intralesionale fino alla chemioterapia sistemica nei casi più impegnativi sebbene al momento, non esista nessuna terapia capace di eradicare completamente l'infezione da HHV-8. I farmaci anti-herpetici, come il ganciclovir o il cidofovir, sono in grado di inibire la DNA polimerasi virale e risultano efficaci esclusivamente in presenza di virus in attiva replicazione senza alcun effetto sul virus in fase latente. Pertanto la terapia dei soggetti affetti dal KS mira a controllare e limitare l'espansione delle lesioni.

Per lesioni cutanee sporadiche ed isolate viene in genere utilizzata la chemioterapia topica e intralesionale con vincristina [30]. In soggetti con lesioni piccole e superficiali si preferisce l'excisione chirurgica della lesione; in caso di lesioni più estese, invece, vengono utilizzati dei protocolli radioterapici che

prevedono basse dosi di radiazioni (dagli 800 ai 1000 cGy come singola dose o dai 1500 ai 2000 cGy per una settimana) applicate direttamente sulla lesione e sul contorno della stessa [31].

In presenza di lesioni più profonde con interessamento viscerale, si può procedere con protocolli radioterapici più consistenti o con chemioterapia sistemica [31, 32]. Un nuovo trattamento sviluppato recentemente è rappresentato dalla terapia antiangiogenetica. Il pioglitazone idrocloridrico, un biomodulatore, e il rofecoxib combinato con trofosfamide sono stati utilizzati per il trattamento del KS endemico [33].

Tutti questi trattamenti si sono rilevati efficaci nel controllo della patologia, soprattutto per i soggetti affetti dalla forma classica o endemica del KS, mentre la variante iatrogena generalmente regredisce in seguito a riduzione o sospensione della terapia che aveva provocato l'immunosoppressione [34]. Per la forma AIDS associata, invece, la terapia si basa essenzialmente sull'uso della HAART che, controllando l'AIDS, comporta anche una regressione delle lesioni del KS [5].

1.1.3. Eziopatogenesi

Un fattore necessario ma non sufficiente allo sviluppo del KS è rappresentato dall'infezione da HHV-8, come documentato in tutte le varianti cliniche [35]. Altri fattori comuni sono una disregolazione del sistema immunitario e la presenza di un microambiente infiammatorio in grado di sostenere la comparsa delle lesioni. L'interazione tra questi due elementi e l'equilibrio virus-ospite che ne deriva sono determinanti nel condizionare lo sviluppo e l'evoluzione del KS.

1.1.3.1. Virus Erpetico Umano 8 (HHV-8)

Il virus HHV-8 è un herpesvirus, identificato per la prima volta da Chang nel 1994 nei tessuti di soggetti con KS associato ad AIDS [3]. In seguito fu riscontrato anche nelle varianti classica, endemica e iatrogena.

HHV-8, insieme al virus di Epstein-Barr (HHV-4), appartiene alla sottofamiglia gammaherpesvirinae. Analisi di sequenziamento della regione altamente variabile ORF K1 hanno portato all'identificazione di quattro significative sottotipi di virus (A, B, C, D) che sono diversamente distribuiti nel mondo: il sottotipo A e C predominantemente in USA e in Europa mentre il sottotipo B in Africa, il D nelle isole del Pacifico [36]. Non è ancora noto se questi differenti genotipi siano associati a un diverso grado di progressione del KS.

Partendo dall'esterno del virus troviamo un nucleocapside elettron-opaco contenente il DNA genomico, un capsido formato da 162 capsomeri arrangiati in una simmetria icosaedrica, un tegumento di materiale amorfo ed, infine, un envelope costituito da un doppio strato di lipidi di origine cellulare e da diverse glicoproteine virali che protrudono dalla sua superficie (Figura 3 A) [37].

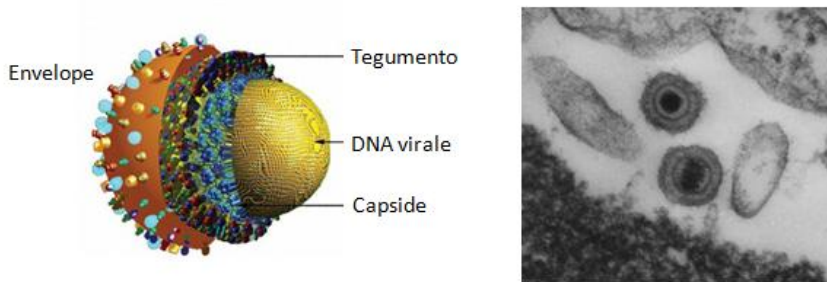


Figura 3: Human Herpes Virus 8: (A) Rappresentazione schematica della particella virale di HHV-8. (B) Immagine al microscopio elettronico di virioni di HHV-8 [37].

Il genoma di HHV-8 è una molecola di DNA lineare a doppio filamento di circa 165-170 kb, che circularizza immediatamente dopo il rilascio dal capsid e si localizza nel nucleo della cellula infettata (Figura 4) [38].

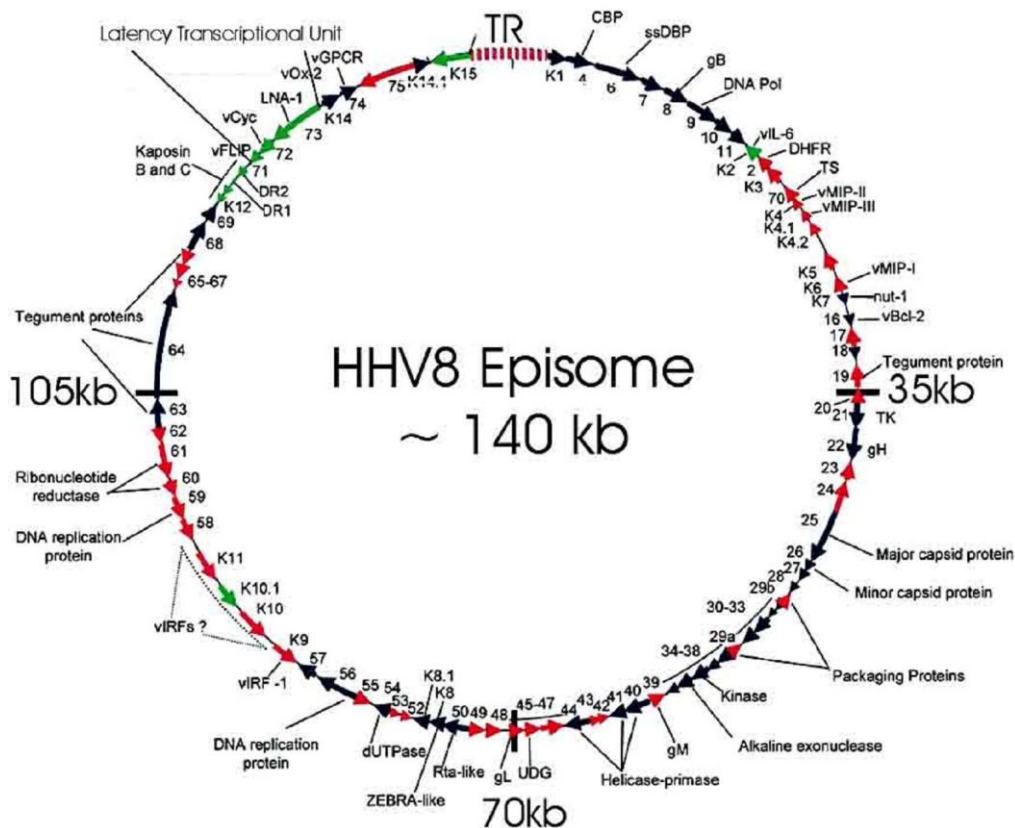


Figura 4: Genoma di HHV-8 mostrato in forma di episoma circolare, come si trova nel nucleo della cellula infettata [38].

Come gli altri herpes virus, HHV-8 è in grado di infettare l'ospite sia in forma litica che in forma latente, con conseguente cambiamento della conformazione del genoma virale (episomale o lineare). Alcuni fattori, come gli UV o l'immunosoppressione, possono indurre il passaggio dall'infezione latente a quella litica. La replicazione avviene con il meccanismo circolare di rolling nel nucleo della cellula ospite e il genoma rimane circolare durante la fase latente, mentre si linearizza nella fase litica [59].

I *geni di latenza* inducono iperplasia e proliferazione delle *spindle-cells* e, spesso, aiutano il virus ad eludere la risposta immune, per esempio down-regolando l'MHC. Tra le proteine di latenza espresse da HHV-8, la proteina *LANA* (latency-associated nuclear antigen), codificata da ORF 73, può agire come regolatore trascrizionale e modificare l'espressione genica del virus e della cellula ospite reclutando numerosi fattori di trascrizione. Questa proteina è in grado di legare il DNA e di mantenere i cromosomi virali in metafase, promuovendo così lo stato di latenza del virus, *LANA* agisce su p53 sia inibendo la sua attività sia reprimendone la trascrizione. *LANA* è stata identificata nelle cellule delle lesioni di soggetti con KS, mentre nelle cellule endoteliali mature, che circondano i vasi sanguigni, non è stata trovata [39, 40].

La proteina di latenza *vCyc* (*viral cyclin*), codificata da ORF 72, omologa alla ciclina D2 cellulare, è in grado di legare CDK6 (cyclin dependent kinase 6), inattivando la proteina Rb e permettendo a E2F di far proseguire il ciclo cellulare verso la fase S. Questo causa disregolazione del ciclo e trasformazione cellulare contribuendo all'insorgenza del KS [41, 42]. Inoltre *vCyc* agisce come una ciclina pleiotropica mediando la fosforilazione di un maggior numero di proteine bersaglio rispetto a quelle che sono fisiologicamente sotto il controllo dell'omologo cellulare [41].

La proteina di latenza *vBcl-2*, omologa della proteina Bcl-2 cellulare, sembra avere attività inibente l'apoptosi [43]. È stato dimostrato che questo effettore viene attivato anche da molti fattori espressi nel KS, come IFN- γ , che upregolando l'espressione del CD40, ne induce un aumento [44].

La proteina di latenza *vFLIP* (*viral FLICE inhibitory protein*) è un potente attivatore delle vie di segnalazione di NF κ B che potrebbe promuovere la crescita delle cellule infettate. Inoltre, possiede funzioni anti-apoptotiche in grado di promuovere la sopravvivenza delle cellule tumorali [45].

I prodotti dei *geni litici*, invece, sembrano importanti per la componente infiammatoria e angiogenica delle lesioni del KS.

La proteina di fase litica *vIL-6* (*viral IL-6*), omologa al prodotto umano, è uno dei fattori responsabili dell'angiogenesi a livello delle lesioni, infatti induce il fattore di crescita vascolare (VEGF) e promuove la proliferazione cellulare [46].

La proteina di fase litica *vGPCR*, omologa al recettore umano dell'interleuchina 8, è in grado di legare chemochine CXC e CC. I segnali trasmessi attraverso il recettore *vGPCR* portano ad una aumentata espressione di VEGF, inducendo angiogenesi attraverso un meccanismo paracrino [47].

Tutti questi meccanismi consentono ad HHV-8 l'espressione di proteine che si oppongono all'arresto del ciclo cellulare, all'apoptosi e all'attivazione dell'immunità

cellulare. Data l'omologia di alcuni di questi geni ad oncogeni cellulari, alcuni potrebbero essere implicati nella tumorigenesi.

HHV-8 è stato trovato nel 95% delle lesioni del KS mediante analisi con PCR, in tutte le varianti esistenti [48], sia in forma latente che in replicazione litica [49, 50]. Per ricercare la presenza di HHV-8 nelle lesioni, è stata utilizzata la tecnica IFA (indirect immunofluorescent-antibody), che prevede la marcatura capillare con anticorpi diretti contro proteine virali espresse durante la latenza, come LANA [50, 51].

I tipi cellulari che risultano essere infettati da HHV-8 sono, innanzitutto, le *spindle cells*, popolazione cellulare eterogenea di origine endoteliale, considerate le cellule caratteristiche della lesione. Nelle *spindle cells* il virus si trova in forma latente [52, 53]. Altri bersagli cellulari sono rappresentati da monociti e macrofagi, infettati prevalentemente in forma litica [52, 54, 55].

La presenza del virus è stata anche dimostrata nei linfociti B e T [56, 57, 58, 60], in relazione anche alle patologie associate ad HHV-8, come il PEL e la malattia di Castleman, le quali originano proprio da cellule B infettate e di conseguenza alterate nel loro differenziamento [61, 62].

E' stata riscontrata la presenza di DNA virale anche nelle cellule CD34⁺ circolanti, separate da cellule mononucleate del sangue periferico [63], inoltre è stato dimostrato che HHV-8 è in grado di infettare cellule CD34⁺, in vitro, con l'espressione concomitante di geni della fase litica e latente. In queste cellule il virus viene mantenuto durante il differenziamento sia *in vitro* che in vivo, dopo l'inoculo delle cellule in topi NOD/SCID [64].

Questi studi suggeriscono che le cellule CD34⁺ potrebbero rappresentare un'ulteriore importante riserva in vivo del virus e portano ad ipotizzare che HHV-8 sia in grado di infettare anche precursori midollari, i quali potrebbero propagare il virus sia alla progenie endoteliale che ematopoietica. Queste ipotesi, però, rimangono da verificare. E' stato dimostrato che il 50% dei soggetti con KS presenta cellule endoteliali circolanti infettate da HHV-8 [65] inoltre studi in vitro hanno dimostrato che nei soggetti con cKs i progenitori endoteliali circolanti (late-EPCs) sono latentemente infettati da HHV-8 e sostengono la replicazione litica virale [188].

1.1.3.2. Disregolazione del sistema immunitario

Il virus HHV-8, come gli altri herpesvirus, mette in atto dei meccanismi per assicurarsi una prolungata protezione dalla risposta immunitaria cellulare.

La latenza rappresenta una strategia passiva di immunoevasione; infatti, solamente pochi geni virali vengono espressi nelle cellule infettate latentemente, riducendo così il numero di antigeni che possono essere presentati al sistema immunitario ed evocare una risposta specifica contro HHV-8 [66]. Tuttavia, l'infezione litica con produzione e rilascio di nuovi virioni è necessaria per la disseminazione del virus nell'ospite, pertanto HHV-8 deve anche evadere attivamente le difese immunitarie dell'ospite. A tale scopo, numerose proteine virali interferiscono direttamente sia con l'immunità innata che con l'instaurarsi dell'immunità adattativa specifica [67].

Nell'ambito delle risposte immunitarie innate, HHV-8 inibisce l'attivazione del sistema del complemento, preposto alla lisi diretta delle cellule infettate e delle

particelle virali o a promuoverne la fagocitosi e l'eliminazione da parte dei macrofagi, grazie alla proteina KCP (KSHV complement-control protein) [68] oppure inibisce l'espressione dei geni dell'IFN α e β e/o interferisce con il loro meccanismo d'azione antivirale, grazie alla proteina del tegumento codificata da orf45.

L'apoptosi delle cellule infettate rappresenta un meccanismo di difesa innato che serve a limitare la replicazione virale e la disseminazione dell'infezione ma è anche il sistema effettore delle risposte immunitarie adattative [66]. HHV-8 codifica tre proteine che interferiscono direttamente con il processo apoptotico. Oltre a vFLIP, le proteine vIAP (ORF K7) e vBcl-2 (ORF 16) favoriscono la sopravvivenza delle cellule infettate da HHV-8 grazie alla loro capacità di bloccare l'apoptosi, l'una inibendo direttamente le caspasi e l'altra modulando negativamente l'attività ed il rilascio di molecole proapoptotiche; in questo modo, viene favorito il completamento del ciclo replicativo virale con rilascio di nuova progenie e disseminazione dell'infezione [69].

Nell'ambito dell'immunità adattativa, la presentazione degli antigeni virali da parte delle proteine del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (HLA-A, B, C) sulla superficie delle cellule infettate ed il successivo riconoscimento da parte dei linfociti T CD8⁺ citotossici è fondamentale per lo sviluppo di un'efficiente risposta immunitaria specifica. HHV-8 codifica due proteine, MIR1 e MIR2, che interferiscono con l'espressione degli HLA di classe I sulla superficie delle cellule infettate, promuovendone l'internalizzazione per endocitosi e la degradazione nei lisosomi, e che, quindi, inibiscono la presentazione degli antigeni virali al sistema immunitario dell'ospite [70]. Inoltre, MIR1 e MIR2 riducono l'espressione anche di altre proteine di superficie, come il CD86 (B7-2) e la molecola d'adesione ICAM-1, che funzionano da segnali di co-stimolazione per le cellule T; la ridotta espressione di queste proteine sulle cellule professionali preposte a presentare l'antigene (APC), cellule dendritiche, macrofagi e cellule B infettate da HHV-8, interferisce ulteriormente con la genesi delle risposte immunitarie adattative specifiche [71]. Le chemochine vMIP-I (ORF K6), vMIP-II (ORF K4) e vMIP-III (ORF K4.1) codificate da HHV-8 attivano recettori prevalentemente distribuiti sulle cellule Th2 CD4⁺ indirizzando così le difese immunitarie dell'ospite verso una risposta di tipo umorale anticorpale a scapito di quella cellulo-mediata citotossica in cui giocano un ruolo chiave le cellule T CD8⁺ e le cellule Th1 CD4⁺ e che è deputata al controllo ed all'eliminazione dell'infezione virale [72, 73]. Inoltre, si è visto che vMIP-II può anche funzionare da antagonista di molteplici chemochine endogene, tipo RANTES o MIP-1 α , su diverse cellule del sistema immunitario (T CD8⁺, Th1 CD4⁺, B, macrofagi, NK) compromettendo quindi le risposte infiammatorie ed immunitarie di tipo Th1. In generale, attraverso la loro attività immunomodulatrice, le chemochine virali creano un microambiente favorevole per la sopravvivenza delle cellule infettate e promuovono così la disseminazione dell'infezione contribuendo indirettamente alla patogenesi virale [74].

Un altro meccanismo con il quale HHV-8 potrebbe sfuggire al controllo immune è l'induzione di alterazioni a carico delle cellule dendritiche (DC). E' stato riscontrata una bassa frequenza nel numero delle DC nel sangue periferico di soggetti con KS classico. Tali alterazioni coinvolgono la sottopopolazione di DC mieloidi, che attraverso la produzione di IL-12, promuovono risposte immunitarie cellulo-mediate

e le DC plasmacitoidi, anch'esse in grado di promuovere risposte cellulose-mediate, attraverso la produzione di IFN- α . Inoltre è stata riscontrata una diminuzione nella produzione di IL-12 e un aumento nella produzione di IL-6 da parte delle DC dei soggetti con cKS [75].

1.1.3.3. Coinvolgimento endoteliale ed ambiente infiammatorio

Lo sviluppo del KS è un processo multistep in cui oltre all'infezione da HHV-8, la deregolazione del sistema immunitario, le citochine infiammatorie e i fattori angiogenetici svolgono un ruolo fondamentale nel mantenimento e nella progressione delle lesioni [56]. Infatti il KS è un tumore vascolare con una forte componente angiogenetica ed infiammatoria e, dal punto di vista istologico, le lesioni derivanti dalle diverse forme di KS, mostrano un quadro simile di neoangiogenesi, presenza di attiva proliferazione delle cellule endoteliali che formano vasi sanguigni anormali (slit-like vassels), con extravasazione di globuli rossi, edema, infiltrazione di cellule linfomononucleate e crescita di *spindle cells*.

L'importanza della componente angiogenetica è sottolineata dal fatto che, come accennato in precedenza, per il trattamento delle lesioni del KS vengono correntemente utilizzate terapie antiangiogenetiche [33].

L'importanza svolta dall'angiogenesi nel KS è dimostrata anche dal potenziale angiogenetico di diversi geni di HHV-8, ad esempio vGPCR e vIL-6.

All'interno delle lesioni del KS sono presenti elevati livelli di fattori di crescita endoteliali come VEGF, basic fibroblast growth factor (bFGF) e FGF-2 che sono necessari per il mantenimento delle lesioni [76]. A ciò si aggiunge che le stesse cellule del KS coltivate in vitro producono un gran varietà di citochine e fattori angiogenetici compresi IL-1, IL-6, IL-8, VEGF e bFGF, che sono in grado di indurre la formazione di lesioni simili a quelle osservate nel KS [77, 78, 79] e di promuovere la migrazione e l'invasione della matrice da parte delle cellule endoteliali [80] infatti lo stesso surnatante ha anche la capacità di indurre angiogenesi in modelli murini [81].

Oltre alla marcata componente angiogenetica, le lesioni del KS sono ricche di cellule infiammatorie. Tra le più rappresentate vi sono i linfociti e i monociti macrofagi. Queste cellule infiltranti sono in grado di produrre diverse citochine infiammatorie (IC) incluse IFN γ , TNF α , IL-1 β , IL-2 e IL-6 che inducono la proliferazione cellulare, con effetto autocrino e paracrino, ed il reclutamento di altre cellule infiammatorie dal circolo che, a loro volta, agiscono aumentando l'infiammazione [77, 78].

La produzione di queste IC comporta l'attivazione dell'endotelio vasale e l'aumento di molecole di adesione (ICAM-1, ELAM-1, V-CAM-1) sulle cellule infiammatorie [82, 83]. L'effetto delle IC sulla crescita del tumore è mediato da un effetto stimolatorio sinergico sulla produzione e sul rilascio di bFGF [84]. Le IC, inoltre, aumentano l'attività angiogenetica e la comparsa delle lesioni tipiche del KS, indicando che sono in grado di mantenere e di aumentare la crescita tumorale e la sua progressione. Le stesse IC attivano le cellule endoteliali ad acquisire le caratteristiche fenotipiche e funzionali delle *spindle cells* [85].

In particolare le citochine angiogenetiche ed infiammatorie coinvolte nella patologia del KS sono:

- IFN- γ che sembra essere la principale citochina coinvolta e agisce in maniera sinergica con l'IL-1 e il TNF. E' in grado di aumentare l'espressione di CD40 sulle *spindle cells* e sulle cellule endoteliali vascolari nelle aree adiacenti al tumore [Pammer et al. 1996]. I segnali mediati da CD40 sono in grado di prevenire l'apoptosi, probabilmente inducendo l'espressione del proto-oncogene bcl-2. Il ruolo di IFN- γ nel KS sarebbe sostenuto anche dal riscontro di una aumentata produzione di IFN- γ da parte dei PBMC di soggetti con KS rispetto a soggetti sani [77].

- bFGF che riveste un ruolo chiave nella formazione delle lesioni, infatti è stata dimostrata la sua capacità di indurre sperimentalmente la comparsa di lesioni simili a quelle del KS [84]. Inoltre è stato dimostrato che questo fattore viene prodotto dalle *spindle cells* ed è in grado di sostenere con effetto autocrino e paracrino la proliferazione di *spindle cells* e cellule endoteliali [84].

- VEGF, un altro fattore angiogenico, che è espresso sia nelle lesioni di soggetti con KS che in *spindle cells* coltivate [86]. Come nel caso di bFGF anche l'espressione di VEGF nelle *spindle cells* viene indotta dalle IC e da altre citochine che si trovano nelle lesioni, quale PDGF- β . VEGF agisce sinergicamente con bFGF nell'induzione della crescita delle cellule endoteliali, nell'angiogenesi e nell'induzione dell'edema.

- PDGF- β un altro potente mitogeno espresso in vivo dalle *spindle cells* in grado di agire sulle stesse con meccanismo autocrino e paracrino [87].

- IL-1 prodotta e rilasciata dalle *spindle cells* viene espressa nelle lesioni del KS. Induce con meccanismo autocrino la crescita delle *spindle cells*. Il suo effetto è mediato dall'interazione con il bFGF, che sembra essere il mediatore finale della crescita delle cellule tumorali. Inoltre l'IL-1 agisce in sinergia con il TNF e con l'IFN- γ nell'indurre l'attivazione delle cellule endoteliali e l'acquisizione del fenotipo delle cellule del KS e nel promuovere il reclutamento leucocitario [79].

- IL-8 una chemochina espressa nelle lesioni del KS dalle *spindle cells* e dalle cellule endoteliali attivate dalle IC. L'IL-8 ha attività chemiotattica per tutte le cellule immunitarie [88].

- IL-6 prodotta dalle cellule infiammatorie, dalle *spindle cells* e dalle cellule endoteliali attivate dalle IC. E' una citochina in grado di promuovere angiogenesi. E' inoltre in grado di promuovere la crescita di cellule tumorali.

A differenza della IL-6 cellulare, la forma virale è in grado di trasdurre il segnale utilizzando solo una delle due subunità formanti il recettore della IL-6 e questo sarebbe alla base delle differenze qualitative e quantitative nella trasduzione del segnale [89, 46]. Dal momento che l'IL-6 è espressa dalla maggior parte delle cellule tumorali infette è stato ipotizzato che ci fosse una proteina virale espressa durante la fase di latenza che fosse responsabile dell'up-regolazione dell'espressione dell'IL-6. La proteina proposta per questo meccanismo è LANA, poiché la sua struttura la rende adatta a funzionare da attivatore trascrizionale o da repressore. E' stato in seguito dimostrato che LANA è effettivamente in grado di

up-regolare l'espressione della IL-6 inducendone la trascrizione del promotore e che l'effetto è mediato da AP1 RE (response elements). Proprio per questa sua funzione LANA può essere considerata come fattore in grado di indurre l'insorgenza e la progressione del KS. Poiché gli elementi AP1 RE sono presenti in numerosi promotori, LANA potrebbe indurre l'espressione non solo di IL-6 ma anche di altri fattori, tra cui VEGF, altre citochine o oncoproteine cellulari, capaci di modulare la crescita cellulare e di indurre pertanto il tumore [89].

Queste osservazioni supportano il concetto che lo stadio precoce del KS sia un processo infiammatorio-angiogenetico reattivo, iniziato dall'infezione con HHV-8 e riattivato in modo ciclico dalle stesse citochine infiammatorie ed angiogenetiche presenti nelle lesioni [90].

Infatti, è stato supposto che la presenza dell'infezione da HHV-8 e l'insieme delle citochine che vengono prodotte dalle cellule dell'infiltrato infiammatorio agiscano in maniera sinergica sulle cellule endoteliali facendo sì che queste assumano la forma spindle e si trasformano nelle *spindle cells* caratteristiche del KS.

1.2. Le *Spindle cells* nel Sarcoma di Kaposi

Le *spindle cells* sono il target dell'infezione da HHV-8 in vivo e sono latentemente infettate nelle lesioni sarcomatose.

Sebbene queste cellule siano considerate le cellule trasformate del KS, differiscono fortemente dalle cellule tumorali convenzionali. Infatti, le *spindle cells* sono spesso oligo o policlonali nelle lesioni del KS [91; 92], mancano dell'instabilità genetica presente in molte cellule tumorali, sono tipicamente diploidi anche nelle lesioni avanzate e, nella maggior parte dei KS, non presentano riarrangiamenti cromosomici caratteristici. Inoltre esse non formano foci, non crescono in soft agar e non formano tumori stabili se inoculate in topi nudi [93].

Le *spindle cells* possono crescere in coltura [94, 90, 95], dove mostrano poche caratteristiche comunemente associate alle cellule trasformate poiché rimangono fortemente dipendenti da fattori di crescita esogeni per la loro sopravvivenza e proliferazione [90].

Quando queste cellule vengono iniettate per via sottocutanea in topi nudi non sono in grado di generare un tumore stabile, ma sopravvivono per un breve intervallo durante il quale, nel tessuto circostante, appaiono nuovi vasi di origine murina. Quando l'innesto di cellule umane viene riassorbito, si assiste ad una contemporanea scomparsa dei vasi di origine murina [96]. Questo suggerisce che le *spindle cells* necessitano, per la loro sopravvivenza e proliferazione, di fattori di crescita derivati dal microambiente [44] descritto in precedenza e che tra il KS e il tumore classico ci siano tante similitudini quante differenze.

Nel KS è stato quindi ipotizzato che all'interno delle lesioni sarcomatose nessun componente sia completamente autonomo ma che, in realtà, siano necessarie interazioni reciproche tra le diverse componenti. Questo modello suppone che le *spindle cells* siano in grado di produrre fattori proinfiammatori e angiogenetici che richiamano e promuovono la sopravvivenza di cellule infiammatorie che, a loro volta, producono citochine in grado di sostenere la sopravvivenza e la crescita delle *spindle cells*.

1.2.1. Origine delle *spindle cells*

La questione sull'origine delle *spindle cells* è materia di animato dibattito e differenti tipi cellulari sono stati presi in considerazione durante la scorsa decade.

Studi di microscopia elettronica hanno rivelato numerose caratteristiche che accomunano le *spindle cells* alle cellule endoteliali. Comunque, alcuni marker specifici delle cellule endoteliali dei vasi sanguinei, come i corpi di Weible-Palade (vescicole contenenti il fattore di Von Willebrand) sono presenti solo in poche *spindle cells* mentre alcune ultrastrutture caratteristiche delle *spindle cells* sono presenti in altri tipi cellulari, quali fibroblasti cellule muscolari, miofibroblasti o periciti. Caratteristiche ultrastrutturali sembrano quindi non sufficienti per determinare precisamente l'origine della linea delle *spindle cells*. Inoltre la capacità delle cellule di esprimere, in vitro, marcatori in base agli stimoli ricevuti dall'ambiente circostante ha reso ancora più difficile capire quale sia la derivazione delle *spindle cells*.

Studi iniziali di immunistochemicali eseguiti sulle *spindle cells* indicarono l'espressione a livelli variabili di markers dell'endotelio (FVIII, CD34, CD31, VE-

caderina, ecc.), di markers di monociti/macrofagi (CD68, PAM-1 ecc.), markers di fibroblasti, di cellule muscolari lisce e marcatori di altre linee cellulari [23].

Gli studi più recenti suggeriscono comunque che le *spindle cells* siano in realtà di origine endoteliale.

Molti ricercatori hanno utilizzato il FVIII, un fattore sintetizzato solo dalle cellule endoteliali, per suggerire la possibile derivazione endoteliale [204]. Successive evidenze vennero fornite attraverso esperimenti di immunocitochimica che mostrano la presenza di marcatori come CD34 e CD31 su campioni di tessuto prelevato da lesioni [205]. Inoltre *spindle cells* derivate da lesioni esprimono un'ampia varietà di marker endoteliali CD34, CD36, CD54, ELAM-1, ULEX-1, CD13, HLA-DR e non presentano marcatori di altre linee come il CD2 e CD19 [99]. Recentemente, quindi, le attenzioni si sono focalizzate sulla possibilità di capire se le stesse *spindle cells* derivino dall'endotelio dei vasi sanguinei o linfatici o siano piuttosto progenitori endoteliali infettati dal virus a trasformarsi nelle cellule caratteristiche della lesione.

Recenti studi hanno dimostrato che HHV-8 è in grado di infettare sia cellule endoteliali linfatiche che cellule endoteliali vascolari in vitro minimizzando le differenze del profilo di espressione genica dei due tipi cellulari [100]. In particolare, è stato riscontrato che, quando HHV-8 infetta cellule endoteliali del microcircolo, sarebbe in grado di guidare la riprogrammazione cellulare inducendo l'espressione di geni, come PROX-1, che hanno un ruolo nello sviluppo linfatico [101]. Inoltre, uno studio riporta che la glicoproteina B associata all'envelop del virione attiva il VEGFR-3 sulle cellule endoteliali del microcircolo [102]. Infine, recenti studi di immunofluorescenza suggeriscono che le *spindle cells* esprimono markers dell'endotelio linfatico sulla loro superficie quali D2-40, LYVE-1 e VEGFR-3 [97, 98].

La tesi che le cellule neoangiogenetiche del tumore siano di origine linfatica devono, però, essere interpretate con cautela. Infatti è stato dimostrato che nelle lesioni del KS, il virus non è residente direttamente nei vasi linfatici, inoltre, la scoperta che il profilo genico delle *spindle cells* è simile sia al profilo di cellule endoteliali linfatiche che a quello di cellule endoteliali vascolari, suggerisce che queste cellule non rappresentano pienamente nessuno di questi due lineage e che questo profilo misto possa essere la conseguenza dell'infezione da HHV-8 [103]. Molti autori hanno quindi suggerito che le *spindle cells* derivino da precursori endoteliali reclutati a livello di lesione e che questi precursori possano acquisire un fenotipo misto linfatico-endoteliale in seguito all'infezione da HHV-8 [103, 104]. Rimangono però ancora aperte numerose questioni: la prima riguarda il tipo di cellule in grado di diffondere HHV-8 nei progenitori endoteliali. Possibili candidati sono i monociti o i linfociti B che potrebbero infettare i progenitori in sede di lesione. Alternativamente potrebbero essere i precursori endoteliali stessi ad essere latentemente infettati e a promuovere la comparsa di lesioni nel KS.

Due considerazioni suggeriscono che in realtà le lesioni del KS possano originare dalla disseminazione di precursori endoteliali precedentemente infettati. La prima considerazione deriva dall'osservazione che le lesioni del KS spesso compaiono durante una infiammazione sistemica localizzandosi precisamente nel sito di una precedente infiammazione locale, come una ferita chirurgica (fenomeno di Koebner) suggerendo che l'ambiente infiammatorio possa provocare la proliferazione di *spindle cells* a partire da precursori circolanti infettati da HHV-8

[105]. La seconda, e più stringente considerazione, deriva dalla dimostrazione che nei trapianti di reni, riceventi HHV-8 negativi prima del trapianto, sviluppano lesioni contenenti cellule neoplastiche del donatore infettate da HHV-8. Questa osservazione indica chiaramente che cellule progenitrici infettate, del donatore senza KS, possono disseminarsi e subire una trasformazione neoplastica nel ricevente immunosoppresso. Sebbene può essere possibile che precursori delle lesioni possano essere cellule endoteliali mature dei reni del donatore, appare molto più probabile che queste originino da progenitori endoteliali circolanti intrappolati all'interno dell'organo trapiantato [106].

1.2.2 Colture in vitro di spindle cells da Sarcoma di Kaposi

In letteratura sono presenti diversi modelli di colture cellulari per le *spindle cells*. *Spindle cells* derivate da sangue periferico possono essere coltivate utilizzando un particolare terreno di coltura identificato da studi precedenti. Infatti, per la crescita in vitro delle *spindle cells* derivate da lesioni di KS associato da AIDS è necessario un terreno condizionale (CM) derivato da cellule T attivate. Questo CM contiene diverse citochine infiammatorie IL-2, IL-6, TNF α , TNF β , GM-CSF, PDGF, TGF β , le stesse in grado di indurre la progressione del KS in vivo [107]. È stato anche riportato che questo terreno è in grado di indurre le cellule endoteliali mature ad acquisire caratteristiche di *spindle cells*. Queste cellule così derivate esprimono i marker endoteliali, sono in grado di produrre fattori angiogenetici e di stimolare l'angiogenesi in vitro [108].

Le *spindle cells* possono essere coltivate a partire da biopsie linfonodali e di epidermide di soggetti con KS. Queste colture coltivate utilizzando terreni condizionali e/o citochine infiammatorie mostrano una componente cellulare molto eterogenea con espressione di markers endoteliali ma con alcune cellule che presentano un fenotipo muscolare liscio o markers mesenchimali [109].

Una particolare caratteristica della biologia delle *spindle cells* in coltura, è che ogni linea derivata dalla lesione del KS mostra, nel tempo, la perdita del genoma di HHV-8 [110; 111], a dispetto del fatto che nelle fasi avanzate del KS, quasi tutte le *spindle cells* sono latentemente infettate. Le cellule proliferanti infette, in coltura, mostrano una marcata instabilità nel fenotipo latente, che, con la progressione delle divisioni mitotiche, porta alla perdita dell'episoma virale [112]. L'incapacità delle *spindle cells* del KS di mantenere il genoma in coltura contraddice le nozioni dei libri di testo sulla latenza dei γ -herpesvirus ma solamente piccole attenzioni sono state rivolte a questo fenomeno. Le cause del perché le linee di *spindle cells* perdano HHV-8 dopo diversi passaggi in vitro sono sconosciute e questa situazione non riflette quanto accade in vivo [113].

In contrasto con queste evidenze è stata dimostrata la persistenza del genoma di HHV-8 in numerose linee cellulari derivate da PELs. Questo indica che ci sono delle circostanze sotto le quali viene raggiunta una latenza stabile in vivo ed *in vitro* e che le condizioni di coltura standard sono compatibili con questo stato, almeno nelle cellule B.

Studi dimostrano che la stabilizzazione della latenza è un processo che evolve attraverso una successione di eventi che, non tutti i tipi cellulari sono in grado di sostenere in maniera efficiente. Le *spindle cells* risultano quindi inefficienti nel mantenimento della latenza poiché non riescono a sostenere questo processo

perdendo l'episoma virale in seguito alla proliferazione. Queste osservazioni supportano che il meccanismo in grado di mantenere la latenza sia in realtà legato alla presenza di un certo grado di replicazione litica del virus nelle cellule infettate. La produzione di virioni potrebbe sostenere la comparsa di *spindle cells* nuovamente infettate diminuendo gli effetti dovuti alla perdita dell'episoma durante il processo replicativo.

1.2.3 Modelli ed effetti dell'infezione in vitro di cellule endoteliali mature

Studi in vitro su HHV-8, condotti utilizzando linee cellulari latentemente infettate di PEL, che supportano la replicazione litica virale successivamente al trattamento con esteri del forbolo e sodio butirato, hanno fornito uno strumento importante per il mappaggio e la caratterizzazione del genoma di questo virus [38]. Lo stato di infezione in vivo di queste linee cellulari preclude però la possibilità di valutare gli effetti dell'infezione virale "de' novo".

Studi molecolari basati sull'utilizzo della PCR, dell'ibridazione in situ e le analisi immunoistochimiche hanno indicato la presenza di HHV-8 in cellule endoteliali atipiche e nelle *spindle cells* delle lesioni nel KS. Le colture di *spindle cells* isolate dalle biopsie di soggetti con KS e mantenute *in vitro* risultano essere nella quasi totalità dei casi latentemente infettate, ma durante il tempo di mantenimento in coltura mostrano la perdita del genoma di HHV-8 [110]. Ciò suggerisce che la maggior parte delle *spindle cells* latentemente infettate in vivo non siano andate incontro ai cambiamenti epigenetici necessari per stabilizzare la latenza [112]. Le colture di *spindle cells* non appaiono quindi adeguate per lo studio della patogenesi del KS.

Le cellule endoteliali sono considerate i precursori delle *spindle cells* e cellule endoteliali HHV-8 infette si ritrovano nelle lesioni precoci del KS prima della formazione dei noduli e nelle fasi della progressione tumorale caratterizzate dall'estensiva proliferazione delle *spindle cells* [114]. Così l'infezione da HHV-8 potrebbe promuovere lo sviluppo delle *spindle-cell* del KS come diretta conseguenza dell'infezione di cellule appartenenti al lineage endoteliale. Inoltre gli stimoli paracrini prodotti dalle cellule HHV-8 infette contribuiscono a creare il microambiente infiammatorio e proangiogenetico che promuove lo sviluppo delle lesioni.

Numerosi modelli endoteliali di infezione *in vitro* con HHV-8 sono presenti in letteratura. Ogni modello ha caratteristiche uniche e separatamente ognuno di questi ha contribuito a fornire informazioni distinte e complementari sul KS. Sono stati condotti numerosi studi nel tentativo di trasmettere l'infezione da HHV-8 alle cellule endoteliali mature *in vitro*. In generale sono due i modelli di trasmissione virale che possono essere utilizzati: contatto diretto cellula infetta-cellula target, chiamata anche trasmissione cellulo-mediata, e la trasmissione cell-free.

Sakurada et.al. hanno sviluppato un modello di infezione in vitro basato sulla trasmissione dell'infezione virale cellulo-mediata. La cocoltura di HUVEC e BCBL-1, linea stabilmente infettata da HHV-8, stimolata con TPA ha determinato l'infezione de novo di cellule endoteliali isolate da cordone (HUVEC) e una

stabilizzazione della latenza che risulta essere presente in più del 30% delle cellule dopo 72 ore fino a raggiungere il 50% dopo 5 giorni e la presenza del genoma virale viene riscontrata nelle cellule infette fino a 30 giorni dopo la rimozione delle BCBL-1 [115]. La modalità di trasmissione cellulo-mediata è stata proposta come responsabile della trasmissione dell'infezione anche in vivo: secondo il modello ipotizzato i linfociti B HHV-8 infetti del sangue periferico giocherebbero un ruolo come possibile reservoir virale in grado di infettare le altre cellule, tra cui le cellule endoteliali.

Sakurada è stato il primo a proporre un modello di infezione cellulo-mediata *in vitro*, infatti la maggior parte dei modelli di infezione *in vitro* riportati in letteratura si basano sulla modalità di trasmissione dell'infezione cell-free [115].

Flore et.al. hanno dimostrato che le HUVEC possono essere infettate con HHV-8 usando particelle virali purificate e che l'infezione determina la proliferazione e la sopravvivenza a lungo termine di queste cellule anche se, dopo coltura a lungo termine, solo nel 5% delle cellule si osserva la persistenza del genoma virale [116]. Le cellule non infettate mantengono la capacità di rispondere al VEGF, suggerendo che la loro sopravvivenza sia dipendente dal VEGF paracrino secreto dalle cellule infettate. Questo modello è interessante alla luce dell'evidenza che i meccanismi di signaling paracrini sono coinvolti nella patogenesi del KS [90] anche se la percentuale di cellule infettate appare essere troppo bassa.

In un ulteriore studio, Ciuffo et.al. hanno utilizzato le cellule endoteliali di microcircolo (DMVEC) che sono state infettate con i virioni rilasciati nel surnatante da tre diverse linee cellulari di PEL stimulate con TPA. L'infezione delle DMVEC con HHV-8 causa l'acquisizione di una morfologia fusata che ricorda quella delle *spindle cells* delle lesioni dei soggetti con KS. Le DMVEC possono essere espanse in coltura solo per poche settimane e non mantengono l'infezione nel tempo. L'infezione e la morfologia spindle possono essere mantenute aggiungendo alla coltura o cellule infettate o il loro surnatante, suggerendo che il mantenimento dell'infezione *in vitro* sia dovuto sia alla proliferazione di *spindle cells* latentemente infettate che alla produzione di progenie virale infettiva che diffonde l'infezione alle cellule adiacenti non infettate.

Inoltre in uno studio condotto da Moses et.al. sono state infettate *in vitro*, con HHV-8, le DMVEC immortalizzate per i geni E6 e E7 del papilloma virus umano esponendo le cellule al surnatante di coltura della linea cellulare BCBL-1 stimolata con TPA. Le DMVEC immortalizzate acquisiscono una morfologia spindle; il virus è presente allo stato di latenza e ciò suggerisce come sia sufficiente l'instaurarsi della latenza per indurre i cambiamenti fenotipici. La replicazione litica potrebbe invece essere necessaria per promuovere l'espansione dell'infezione virale o per re-infettare le cellule latentemente infette che nel tempo tendono a perdere l'episoma virale [117].

Un modello analogo a quello di Moses et. al. è stato utilizzato da Lagunoff et.al. I loro risultati hanno dimostrato che il pathway di default, in seguito ad infezione con HHV-8, è la latenza e che, solo in una piccola quota di cellule infettate (5-10%) si attiva spontaneamente la replicazione litica. La replicazione litica, che determina l'attivazione dell'espressione di tutti i geni virali in maniera temporalmente regolata, il rilascio della progenie virale e la morte della cellula infettata, è stata osservata

attivarsi periodicamente e spontaneamente *in vitro*. In questo modello, che utilizza le DMVEC immortalizzate con un retrovirus esprime la telomerasi umana non si osservano cambiamenti morfologici in seguito all'infezione. L'utilizzo di cellule endoteliali immortalizzate pone dei limiti per lo studio degli effetti dell'infezione sulla crescita e sulla sopravvivenza cellulare.

L'acquisizione di una morfologia spindle, che ricorda quella delle *spindle cells* delle lesioni del KS, è uno degli effetti fenotipici più evidenti causati dall'infezione da HHV-8 sulle cellule endoteliali. È stato osservato che tale cambiamento morfologico è indotto dall'attivazione del fattore di trascrizione NF-kb mediato dall'espressione del gene di latenza vFLIP, mentre l'inibizione di NF-kb è una condizione sufficiente per determinare la mancata acquisizione della morfologia spindle [123, 124]. Quali siano i geni attivati da NF-kb che causano la comparsa di questo fenotipo non è noto ma è stato osservato che l'attivazione di Rac1 e i riarrangiamenti del citoscheletro in risposta agli sforzi da taglio a cui è sottoposto l'endotelio determinano l'attivazione di NF-kb [125]. Inoltre l'attivazione di NF-kb contribuisce a creare il microambiente infiammatorio che contribuisce allo sviluppo delle lesioni nel KS. Infatti nel surnatante delle HUVEC, trasfettate con un vettore retrovirale che codifica per la proteina vFLIP, è stata osservata un'aumentata quantità delle citochine IL-6, IL-8, GRO, RANTES, GCP2 e MIP3, la cui espressione è noto essere regolata da NF-kb [123].

Numerosi studi molecolari sottolineano che l'infezione *in vitro* da HHV-8 modula il programma trascrizionale della cellula anche durante la fase iniziale dell'infezione. I geni modulati dall'infezione virale governano processi cellulari vitali come l'apoptosi, la trascrizione, le difese dell'ospite e l'infiammazione, il rimodellamento della matrice extracellulare, l'angiogenesi e il processamento delle proteine [119]. In particolare nelle cellule HHV-8 infette è stata osservata l'inibizione delle caspasi 3 e 9, l'induzione del VEGF e delle metalloproteasi che sono gli enzimi centrali nella regolazione dell'invasione e dell'angiogenesi. Tali meccanismi vengono messi in atto da HHV-8 per assicurarsi una sopravvivenza prolungata all'interno della cellula ospite. Per stabilire un'infezione produttiva il virus deve essere in grado di bloccare l'apoptosi che viene indotta dal reclutamento di recettori multipli durante il legame e l'entrata del virus nella cellula ospite [120].

L'interazione delle glicoproteine virali con la superficie delle cellule aderenti porta alla formazione di un complesso multi molecolare composto dalle integrine $\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$ e $\alpha v\beta5$ e dal complesso CD98/xCT [121]. La formazione di tale complesso sarebbe necessaria per l'ingresso del virus, per coordinare l'endocitosi, per la fusione dell'envelope virale e per indurre segnali nella cellula ospite come quello delle chinasi delle adesioni focali (FAK), Src, fosfatidil-inositolo 3-chinasi (PI3K), le MAP chinasi MEK ed ERK e NF-kB. L'aumentata risposta proliferativa delle DMVEC infettate *in vitro* con HHV-8 all'SCF esogeno suggerisce che l'infezione con HHV-8 induca l'espressione di c-kit a livelli che permettono di raggiungere un'aumentata responsività all'SCF esogeno [122]. Infatti, l'espressione di c-kit e l'interazione c-kit/SCF sono cruciali per il normale sviluppo delle cellule ematopoietiche e per un ristretto numero di cellule non ematopoietiche, l'aumentata attività del signaling c-kit/SCF è stata associata anche allo sviluppo di numerosi tumori.

Le cellule infettate mostrano anche un'aumentata resistenza all'induzione dell'apoptosi in condizioni di stress cellulare come l'assenza di fattori di crescita e la presenza degli induttori dell'apoptosi etoposide e staurosporina.[126]. L'attivazione del pathway di trasduzione del segnale PI3K/Akt è responsabile dell'acquisizione del vantaggio di sopravvivenza nelle cellule infettate [126, 103]. L'attivazione della chinasi Akt determina la fosforilazione e la conseguente inattivazione di diverse proteine proapoptotiche tra cui Bad e l'attivazione di mTOR. In seguito all'infezione "de' novo" delle cellule endoteliali viene indotta inoltre la secrezione di vari fattori angiogenici tra cui VEGF, bFGF, SDF-1 e l'angiopoietina. Le cellule endoteliali acquisiscono quindi un'aumentata capacità angiogenica che viene evidenziata dall'aumentata capacità di formare tubuli in saggi di angiogenesi *in vitro* [126].

1.3. Le Cellule Endoteliali Progenitrici

La genesi del sistema ematopoietico nell'organismo in fase di sviluppo è un processo complesso e lo sviluppo del sistema vascolare è uno degli eventi più precoci dell'organogenesi [127].

Il primo segno visibile di attività ematopoietica nell'embrione di topo si osserva con la formazione, intorno al giorno 6.5-7 di gestazione, delle "isole sanguigne" (Bood Islands), aggregati cellulari che originano dal mesoderma extraembrionale migrato attraverso la stria primitiva nella regione del futuro sacco vitellino. In questi aggregati è possibile distinguere due tipi cellulari: gli eritroblasti, deputati alla produzione di eritrociti, circondati da uno strato esterno di precursori endoteliali chiamati angioblasti [128].

Questa stretta associazione spaziale e temporale delle filiere ematopoietica ed endoteliale ha portato a formulare l'ipotesi che i due tipi cellulari derivassero da un precursore bipotente comune, l'emangioblasto [129]. A questa osservazione si aggiunsero dati forniti dall'analisi molecolare che permisero di evidenziare un pannello di geni coinvolti nella regolazione della differenziazione cellulare ed espressi da entrambi i tipi di precursori: CD34 [130], flk-1 [131], flt-1 [132], TIE-2 [133], SCL/Tal-1 [134], GATA-2 [135] e PECAM-1 [136]. I vasi sanguigni dell'embrione nascono, quindi, dall'emangioblasto dopo la formazione di un plesso primario di capillari secondo un processo definito vasculogenesi [137]. Successivamente il plesso primario va incontro ad un complesso processo di rimodellamento durante il quale la crescita e la migrazione di cellule ematopoietiche ed endoteliali porta allo sviluppo di un sistema circolatorio funzionale. Questo processo definito angiogenesi inizia durante l'embriogenesi e continua nella vita adulta [138]. Dopo la nascita, l'angiogenesi contribuisce alla crescita dell'organismo fino alla vita adulta durante la quale la maggior parte dei vasi sanguigni rimane quiescente e l'angiogenesi è limitata al tratto riproduttivo femminile (durante il ciclo ovarico e nella placenta durante la gravidanza), ai siti di cicatrizzazione delle ferite [139], condizioni fisiologiche che richiedono un'attiva proliferazione endoteliale.

Essendo le cellule endoteliali mature terminalmente differenziate e con un basso potenziale proliferativo, la loro capacità di sostituire l'endotelio danneggiato è limitata. Quindi, la riparazione dell'endotelio deve essere supportata da altri tipi cellulari. Recenti studi hanno dimostrato che questo processo di neoangiogenesi coinvolge, oltre alla proliferazione di cellule endoteliali vicino al sito di lesione, anche il reclutamento delle stesse in sede di danno. E' stato così supposto che ci siano due fonti per la riendotelizzazione: la migrazione e divisione di cellule endoteliali preesistenti e/o il reclutamento di precursori dalla circolazione [140].

Pelosi et al. [141] identificarono un subset di cellule CD34+/KDR+ (recettore di tipo 2 per il VEGF, nominato anche VEGFR-2, KDR o Flk-1 [140]) dotate di potenziale proliferativo e sebbene estremamente rare queste potevano rappresentare la fonte/riserva di progenitori endoteliali. Queste cellule in grado di differenziare in cellule endoteliali mature vennero definite come Endothelial Progenitor (precursor) Cell (EPCs). Successivi studi vennero effettuati per meglio definire questa popolazione, numerosi marcatori e caratterizzazioni funzionali vennero utilizzate per definire le EPCs.

Tra i marcatori proposti per la caratterizzazione delle EPCs circolanti vennero utilizzati il CD34 e il CD133, oppure CD117 [145], e il KDR [140].

L'antigene CD34 è una glicoproteina transmembrana, la cui funzione è legata ai meccanismi di adesione e localizzazione dei precursori nel midollo osseo. Attualmente esso è di grande interesse per il trapianto di midollo osseo, per il quale vengono utilizzate le cellule CD34+, mobilizzate dal midollo alla periferia con fattori di crescita, quali GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor) e G-CSF (Granulocyte-CSF).

Il CD133 è un polipeptide transmembrana con l'estremità N-terminale extracellulare, espresso sulle staminali emopoietiche, sui progenitori del midollo osseo, del fegato fetale e del sangue periferico. È un marcatore staminale precoce, che viene perso rapidamente durante il processo differenziativo verso cellule endoteliali mature.

L'antigene CD117 (c-kit) è il recettore per il fattore delle cellule staminali (SCF) ed è espresso anche sui progenitori emopoietici e sui mastociti tissutali.

Il VEGFR-2, insieme ai recettori di tipo 1 e 3, appartiene alla famiglia dei recettori tirosin-chinasici e lega il VEGF, fattore di crescita in grado di indurre differenziamento e proliferazione embrionale delle cellule endoteliali e di inibirne l'apoptosi [146].

Inoltre altri autori indicarono le EPCs circolanti come cellule esprimenti una varietà di marcatori tipici della linea endoteliale, come molecole di adesione endotelio-piastrine (PECAM-1 o CD31), VE-caderina, fattore di Von Willebrand (vWF), ossido nitrico sintasi endoteliale (eNOS), e sotto stimolazione e-selectina [147; 148].

Oltre alla caratterizzazione fenotipica venne proposta una caratterizzazione funzionale in grado di identificare questa particolare popolazione cellulare. I progenitori endoteliali sono, infatti, dei progenitori committed (ristretti ad una determinata linea cellulare) che danno origine solo ad una progenie endoteliale e sono capaci di capillogenesi e di riparare i danni nell'endotelio preesistente. Devono quindi essere in grado di espandersi clonalmente, di proliferare per molti passaggi e di resistere agli stress similmente alle cellule staminali [149].

Comunque, studi recenti sostengono che le EPCs vengono meglio definite dalla sola combinazione degli antigeni CD34 e KDR [150], poiché soltanto il numero delle cellule aventi questo fenotipo è legato convincentemente all'evoluzione del quadro clinico di soggetti che presentano alterazioni del sistema cardiovascolare. Utilizzando questa combinazione di marcatori fenotipici, molti autori [151, 152] hanno descritto l'influenza delle condizioni patologiche, di farmaci, e fattori di crescita sul numero delle EPCs in vivo. Per esempio il numero di EPCs circolanti e la loro attività migratoria, è stato riportato essere ridotto in soggetti con fattori di rischio per ischemia cardiaca, come la predisposizione genetica o il fumo [153]. Al contrario è stato osservato un aumento del numero delle EPCs circolanti in presenza di ischemia, di infarto del miocardio [154] ed in presenza di traumi vascolari come by-pass coronarici [155]. Recentemente sono state descritte anche delle variazioni fisiologiche del numero delle EPCs circolanti. Elevati livelli di estrogeni [156] e l'esercizio fisico [157], ad esempio, aumentano il numero di progenitori endoteliali a livello periferico.

Il numero delle EPCs è risultato superiore in soggetti con cancro ed in alcuni casi è correlato con il volume del tumore, è stato quindi proposto che queste cellule potrebbero rappresentare uno strumento prognostico e diagnostico utilizzabile come marker surrogato in studi clinici [158].

1.3.1 Ruolo dei progenitori endoteliali nei processi angiogenetici

In soggetti sani è stato evidenziato che in condizioni basali il turnover endoteliale è di minima entità. In seguito a stress ed insulti di varia natura si assiste alla rigenerazione dell'endotelio vascolare grazie alla proliferazione e migrazione delle cellule endoteliali mature che circondano il sito della lesione. Queste cellule endoteliali mature sono, comunque, cellule differenziate terminalmente con un basso potenziale proliferativo, pertanto la loro capacità di sostituzione dell'endotelio danneggiato è limitata [159]. Oltre al ruolo di rigenerazione e riparo in risposta a stimoli fisiologici, il processo angiogenico svolge un ruolo centrale in numerose patologie caratterizzate da uno sbilanciamento nella risposta proliferativa dell'endotelio. Nei tumori, nell'obesità ed in numerose altre patologie si assiste, ad esempio, ad un'eccessiva risposta angiogenetica. Altre patologie, come l'ischemia cardiaca e la preeclampsia, sono caratterizzate, invece, da angiogenesi insufficiente o da una vera e propria regressione vasale [160].

Il ritrovamento di cellule derivate dal midollo esprimenti marcatori endoteliali in grado di andare a localizzarsi nel tessuto ischemico portò alla possibilità di utilizzare le EPCs per la vasculogenesi terapeutica. L'incremento di vascolarizzazione diventa una soluzione terapeutica soprattutto nel caso dell'ischemia. Infatti l'infusione di cellule isolate dal midollo e coltivate ex vivo, hanno mostrato la capacità di aumentare la densità capillare nei tessuti ischemici [149]. I progenitori endoteliali sono perciò visti come una possibile fonte di cellule per riparare i danni vascolari, poiché sono in grado di incrementare la neovascolarizzazione e la riendotelizzazione.

Per poter utilizzare le EPCs con fini terapeutici è però fondamentale comprendere approfonditamente gli eventi cellulari e molecolari che regolano la vasculogenesi e l'angiogenesi in situazioni patologiche e fisiologiche, caratterizzando il ruolo svolto dalle EPCs in questi contesti [161].

Il ruolo dei progenitori endoteliali midollari nella vasculogenesi è stato ampiamente investigato utilizzando come modello sperimentale il trapianto di midollo osseo effettuato con cellule marcate prima dell'impianto. Vari studi sperimentali dimostrano che le cellule marcate, derivate dal midollo, si localizzano in sedi di ischemia e contribuiscono alla formazione di nuovi vasi [162; 163]. Le EPCs, inoltre, vengono ritrovate nelle arterie ischemiche se infuse nella circolazione di topi sottoposti a danno vascolare, ed in questa sede promuovono la re-endotelizzazione e limitano la formazione di neo-intima [164]. Inoltre l'infusione di questa popolazione cellulare ha effetti ateroprotettivi in modelli murini [165].

L'importanza funzionale delle EPCs nella vascolarizzazione dei tumori è stata investigata da vari gruppi di ricerca. Alcuni ricercatori hanno dimostrato un'importante partecipazione delle EPCs nella formazione dei nuovi vasi [166]. Altri hanno riscontrato, invece un contributo minimo [167] o del tutto assente [168].

Questi risultati contrastanti possono essere spiegati in differenti modi. Innanzitutto va considerato che le diverse tecniche utilizzate per l'individuazione dei progenitori nei siti di neovascolarizzazione possono avere creato qualche confusione [169].

Inoltre, si deve considerare la natura e l'entità dell'insulto. Differenti tipi tumorali hanno, infatti, differenti capacità di mobilitazione delle EPCs [170]. Non bisogna dimenticare, infatti, che diversamente dalla vasculogenesi embrionale, la vasculogenesi adulta dipende da stimoli essenzialmente di carattere infiammatorio. Questo processo citochino-mediato potrebbe essere molto diverso in base al tessuto coinvolto e, nel caso dei tumori, al tipo tumorale e alle sue esigenze di crescita.

Sommando questi dati con le informazioni provenienti dagli studi di correlazione tra numero di EPCs circolanti e situazioni patologiche, si può ragionevolmente affermare che le EPCs sono in grado di riparare e rigenerare i vasi. La progressiva perdita di queste cellule, per scarsa generazione, insufficiente mobilitazione, ridotta emivita o eccessiva richiesta, riduce la capacità di rispondere ad insulti di varia natura, predisponendo l'organismo all'insorgenza di patologie vascolari [171]. Complessivamente i vari studi dimostrano che in condizioni particolari le EPCs sono capaci di contribuire alla neovascolarizzazione fisiologica e patologica e di garantire il mantenimento e la rigenerazione dei vasi esistenti [172]. Il meccanismo biologico attraverso cui le EPCs regolano questa catena di eventi rimane, comunque, da identificare anche se alcuni meccanismi sono stati caratterizzati.

Il primo step nel processo di neovascolarizzazione è rappresentato dalla mobilitazione delle cellule staminali dal midollo determinata dal microambiente chiamato "stem cell niche" formato da fibroblasti, osteoblasti e cellule endoteliali. Le citochine mobilizzatrici ostacolano l'interazione tra le EPCs e lo stroma portando le cellule stesse a lasciare il midollo attraverso una migrazione transendoteliale. Allo stesso modo l'attivazione di proteinasi come elastasi, catepsina G, metalloproteasi (MMPs) clivano le adesioni formate dalle integrine delle EPCs con lo stroma. MMP-9 in aggiunta cliva il ligando di c-Kit sulla membrana (mKitL) inducendo il rilascio della forma solubile (KitL; chiamata anche stem cell factor, SCF) [173]. Fisiologicamente l'ischemia è il segnale predominante per il rilascio delle EPCs dal midollo e dato il ridotto numero delle EPCs circolanti, la chemioattrazione gioca un ruolo fondamentale nel processo di formazione dei nuovi vasi ed è importante per il reclutamento di un numero adeguato di progenitori in sede ischemica o di danno tissutale. I fattori che influenzano questo processo includono chemochine come SDF-1 [174] e mediatori lipidici come la sfingosina-1-fosfato [175]. E' stato dimostrato che SDF-1 media il reclutamento di cellule progenitrici e la sua overespressione aumenta l'homing e l'incorporazione nel sito ischemico [176]. Inoltre i livelli di VEGF sono maggiori durante l'ischemia e quindi in grado di agire come chemioattrattore per le EPCs [143; 151]. Oltre ai geni che vengono upregolati durante l'ischemia anche l'invasione di cellule immunocompetenti nel tessuto ischemico può portare all'aumento dei livelli di varie chemochine come MCP-1 o interleuchine che possono attrarre le EPCs [177].

La tappa successiva nel processo di neovascolarizzazione mediato dalle EPCs prevede l'homing e il differenziamento dei progenitori endoteliali nei siti di angiogenesi fisiologica e tumorale [178]. Il reclutamento e l'incorporazione delle EPCs richiede una sequenza di eventi, quali l'adesione, la transmigrazione e alla fine il differenziamento in cellule endoteliali. Lo step iniziale per l'homing dei progenitori, presenti in circolo, ai tessuti ischemici comprende l'adesione degli stessi alle cellule endoteliali attivate da citochine e dall'ischemia e la transmigrazione attraverso il monolayer endoteliale. L'adesione è principalmente

mediata da integrine, infatti durante questo processo è presente un'overespressione di due tipi di integrine le $\beta 2$ -integrine e le $\alpha 4\beta 1$ -integrine, che sono coinvolte successivamente anche nella transmigrazione [179]. Studi evidenziano che la mancanza di queste integrine causa una diminuzione dell'homing e della capacità di creare nuovi vasi. L'adesione delle EPCs ai vasi nudi coinvolge i recettori per la vitronectina: $\alpha V\beta 3$ -integrina e $\alpha V\beta 5$ -integrina [180] ed in parte anche le $\beta 1$ -integrine che legano la matrice extracellulare [177]. Infine la maturazione delle EPCs in cellule endoteliali è importante per la loro integrazione funzionale nei vasi ma la cascata di attivazione genica che regola questo processo è largamente sconosciuta.

1.3.2. Coltura dei progenitori endoteliali in vitro

Il crescente interesse per le EPCs deriva dal fatto che, queste cellule, oltre ad avere ruolo importante nel processo angiogenetico sono coinvolte in molte patologie caratterizzate da uno sbilanciamento nella risposta proliferativa dell'endotelio. Sebbene la EPCs rappresentino una minore sottopopolazione dei PBMCs si è tentato di isolare queste cellule e di coltivarle in vitro per poterne studiare la biologia e le caratteristiche molecolari.

La prima descrizione dettagliata dell' "Isolation of putative progenitor endothelial cell for angiogenesis" venne pubblicata da Asahara et al. nel 1997. L'autore descriveva l'isolamento di cellule $CD34^+$ dal sangue periferico umano mediante l'utilizzo di sfere magnetiche. Queste cellule coltivate in vitro su uno stato di fibronectina davano origine a cellule con caratteristiche endoteliali [147].

Nonostante le successive controversie nate riguardo al reale fenotipo di queste cellule, questo primo lavoro ha naturalmente cambiato le teorie sulla biologia del sistema vascolare. Successivamente molti tipi di progenitori endoteliali sono stati caratterizzati utilizzando metodologie eterogenee che differivano marcatamente nel metodo di isolamento (Figura 5) [181].

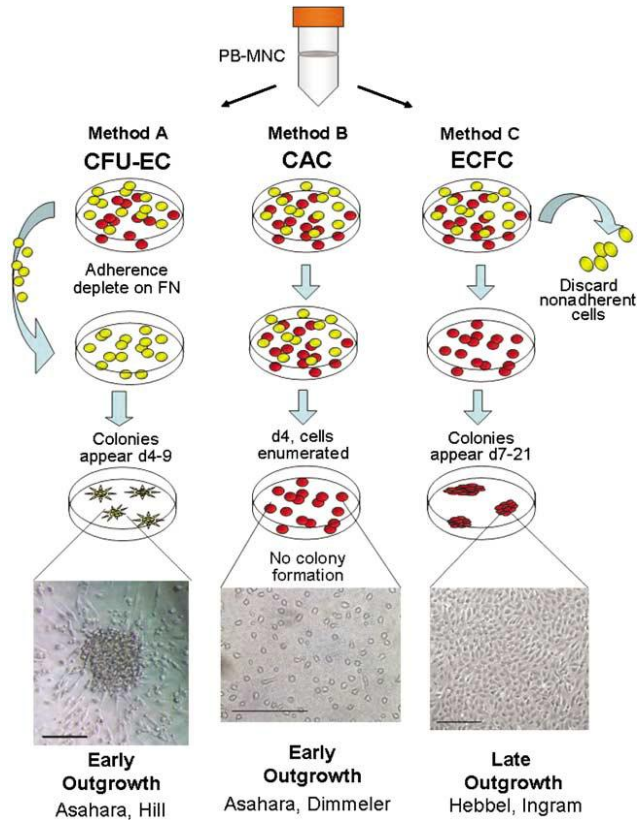


Figura 5: Metodi per la coltura della EPCs: metodo A, Colony-Forming Unit-Endothelial Cells (CFU-EC) processo in cui le cellule non aderenti danno origine alle colonie di early EPCs; metodo B, Circulating Angiogenic Cells (CAC) sono cellule mononucleate con caratteristiche endoteliali; metodo C, Endothelial Colony Forming Cells (ECFC) derivano dalla porzione di cellule aderenti coltivate per 7-21 giorni e formano colonie con morfologia "cobblestone" [159].

Nonostante le differenti caratteristiche delle EPCs coltivate coi vari metodi, gli autori hanno spesso usato il termine generico di EPCs per descrivere le loro popolazioni, generando confusione su quale sia la vera natura dei progenitori endoteliali in coltura.

Uno studio condotto da Gulati et al. ha contribuito, in parte, ad armonizzare i risultati evidenziando come nel processo di generazione delle colture di EPCs vi siano due popolazioni distinte. La prima popolazione identificata col termine di early-EPCs viene ottenuta dopo 4-9 giorni di coltura di cellule mononucleate del sangue periferico in condizioni che favoriscono lo sviluppo endoteliale, è in realtà una popolazione di derivazione monocitoide in grado di esprimere i marker tipici delle endoteliali mature in associazione con marker ematopoietici CD45 e CD14. Prolungando la coltura fino a 7-21 giorni si ottiene una seconda popolazione di cellule con morfologia endoteliale, e con un profilo fenotipico distinto e identificata col termine di late-EPCs o ECFC (Endothelial Colony Forming Cells). Questa seconda popolazione manca totalmente dell'espressione dei marker CD45 e CD14 e presenta un profilo strettamente endoteliale, con espressione di e-NOS e di

caveolina-1, che risultano invece non rilevabili nella popolazione endoteliale di derivazione monocitoide. Questa seconda popolazione di cellule presenta, infine, un elevato potenziale proliferativo che la differenzia ulteriormente dalla prima popolazione [182]. Questo studio suggerisce che la sottopopolazione di cellule mononucleate in grado di dare origine a progenitori endoteliali in coltura risiederebbe nella porzione delle cellule CD14⁻ mentre, la porzione CD14⁺ potrebbe possedere potenziale multi-differenziativo.

Le late-EPCs vengono primariamente caratterizzate basandosi sulla loro morfologia o sulla cronologicità di apparizione delle colonie in vitro, esse possono essere mantenute in coltura ed espanse in vitro grazie al loro elevato potenziale proliferativo [182, 183, 184]. Le late-EPCs sono in grado di legare la lectina ULEX-Europaeus e hanno la capacità di incorporare Ac-LDL inoltre esprimono i markers specifici della linea endoteliale come VEGFR-2, Tie-2, VE-caderina, CD34, PECAM e vWF e sono in grado di dare origine a capillari in vitro [182, 183, 184]. Quindi, basandosi sulla loro comparsa in coltura, sulla capacità proliferativa, sulla capacità di formare vasi e sulle altre loro caratteristiche, le late-EPCs sono le cellule che meglio si avvicinano alla vera definizione di EPCs, che è quella di cellule progenitrici competenti nella capillogenesi la cui progenie terminalmente differenziata sono le cellule endoteliali mature [159]. Recentemente molti autori si sono interessati alle late-EPCs ma in letteratura non è ancora noto un protocollo comune per la coltura di queste cellule. In particolare i protocolli differiscono per il substrato utilizzato per la semina dei PBMCs e fibronectina o collagene, a seconda degli autori, vengono utilizzati senza una chiara indicazione delle proprietà di uno o dell'altro substrato [185, 186].

1.3.3. I progenitori endoteliali nel Sarcoma di Kaposi

Due nostri precedenti studi hanno sottolineato che le EPCs potrebbero avere un ruolo nella patogenesi del Kaposi.

In un primo studio abbiamo dimostrato che in soggetti affetti dalla variante classica del KS il numero delle EPCs circolanti identificate come CD45^{low}/CD34⁺/KDR⁺ o come CD45^{low}/CD34⁺/KDR⁺/CD133⁺ è aumentato nei soggetti con cKS rispetto ai controlli sani. Questo aumento non è stato correlato con l'aumentato dosaggio di fattori plasmatici come VEGF ma è stato ipotizzato che l'espansione possa essere un effetto diretto o indiretto dell'ambiente virale essendo il KS legato all'infezione da HHV-8 [187].

Nel secondo studio abbiamo dimostrato che i progenitori endoteliali circolanti isolati da sangue periferico (late-EPCs) di soggetti con cKS sono HHV-8 infetti e sono in grado di sostenere persistentemente l'infezione virale potendo quindi agire come possibile reservoir virale [188].

A differenza delle colture di *spindle cells* isolate da soggetti con KS [110, 189] nelle colture di late-EPCs abbiamo dimostrato che il genoma virale viene mantenuto in vitro. Infatti è stata rilevata la presenza del genoma di HHV-8 in tutte le colture di late-EPCs, ottenute da ogni soggetto con cKS, per tutto il tempo di mantenimento in vitro. E' possibile che l'abilità delle late-EPCs di mantenere l'episoma virale possa essere legato al differente stadio replicativo di queste cellule che non sono endoteliali mature ma progenitori dotati di un'alto potenziale replicativo. Il genoma di HHV-8 è stato quantificato anche nel surnatante di coltura suggerendo che una

quota di virus entri in fase litica spontaneamente. Tale osservazione potrebbe suggerire la possibile propagazione del virus in coltura mediante cicli continui di infezione "de'novo".

2. SCOPO DEL LAVORO

Il Sarcoma di Kaposi (KS) è una malattia angioproliferativa con interessamento cutaneo e viscerale, caratterizzata da un'intensa proliferazione delle *spindle cells* che rappresentano l'elemento tipico delle lesioni sarcomatose.

Diversi studi suggeriscono che le *spindle cells* siano cellule di origine endoteliale, rimane però da chiarire se la presenza di HHV-8 nella totalità delle lesioni dipenda dalla capacità del virus di infettare le cellule endoteliali mature direttamente a livello di lesione o sia, invece, dovuta al reclutamento di cellule infettate altrove, in particolare a livello midollare.

I progenitori endoteliali circolanti (EPCs) sono dotati di un'elevata capacità proliferativa e sono in grado di sostenere il processo angiogenico in condizioni fisiologiche e patologiche [149].

Abbiamo recentemente dimostrato che i soggetti con KS classico (cKS) hanno elevati livelli di progenitori endoteliali circolanti, identificate come CD45^{low}/CD34⁺/KDR⁺, rispetto ai controlli sani [187]. Inoltre, abbiamo dimostrato che i progenitori endoteliali circolanti isolati da sangue periferico (late-EPCs) da soggetti con cKS sono HHV-8 infetti e sono in grado di sostenere persistentemente l'infezione virale potendo quindi agire come possibile reservoir virale [188]. Queste osservazioni suggeriscono che le EPCs possano avere un ruolo importante nella patogenesi del KS e che possano essere i precursori putativi delle *spindle cells*. Per approfondire questo aspetto abbiamo valutato il comportamento *in vitro* delle late-EPCs isolate da soggetti con cKS (cKS-late-EPCs) confrontandole con late-EPCs isolate da soggetti sani HHV-8 negativi (ctr-late-EPCs).

Le late-EPCs possono essere isolate a partire da cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC) sebbene non vi sia un consenso sul protocollo standard da utilizzare. Infatti, a seconda degli autori, i PBMC vengono seminati su fibronectina o collagene senza una chiara indicazione delle differenti proprietà delle due matrici. Inoltre, poiché l'identità delle cellule che danno origine alle late-EPCs *in vitro* non è nota, è possibile che il substrato utilizzato per l'adesione possa influire sull'efficienza di isolamento. Pertanto, abbiamo valutato se esiste una differente frequenza di isolamento delle late-EPCs sui due substrati.

Studi di infezione da HHV-8 hanno dimostrato che le cellule endoteliali mature possono essere infettate *in vitro*, sebbene non sia mai stata riportata l'infezione di progenitori endoteliali. Pertanto, abbiamo infettato *in vitro* con HHV-8 le ctr-late-EPCs per valutare la capacità di queste cellule di essere infettate, di mantenere l'infezione nel tempo e per studiare gli eventuali effetti dell'infezione sulla biologia delle late-EPCs.

Nella prima parte del nostro studio abbiamo:

- ❖ ottimizzato il protocollo per l'isolamento delle colonie di late-EPCs a partire da PBMC di soggetti sani, valutando l'effetto di:
 - campione d'origine
 - densità di semina dei PBMC
 - percentuale di siero nel terreno di coltura
 - tempistica del primo cambio di terreno
 - substrato utilizzato per la semina dei PBMC

- ❖ confrontato le late-EPCs ottenute dai soggetti con cKS e dai soggetti sani. In particolare abbiamo:
 - esaminato l'isolamento delle colonie di late-EPCs su fibronectina e collagene considerando:
 - la frequenza di soggetti che danno origine a colonie di late-EPCs
 - il tempo di comparsa delle colonie di late-EPCs
 - il numero di colonie di late-EPCs isolate per 20×10^6 PBMC seminati
 - caratterizzato l'espansione *in vitro* delle late-EPCs considerando:
 - la loro capacità proliferativa
 - la vitalità cellulare
 - la senescenza delle colture
 - la capacità di produrre citochine, dosando nel surnatante di coltura IL-6, TNF α , IFN α e VEGF
- ❖ valutato la presenza dell'infezione da HHV-8 nelle cKS-late-EPCs mediante marcatura in immunofluorescenza della proteina virale associata alla latenza, LANA.

Nella seconda parte dello studio abbiamo:

- ❖ valutato la capacità delle ctr-late-EPCs di soggetti HHV-8 negativi di essere infettate *in vitro* da HHV-8. La presenza di infezione è stata valutata mediante marcatura di LANA
- ❖ valutato la persistenza dell'infezione nelle late-EPCs infettate *in vitro* considerando in particolare:
 - il numero di genomi di HHV-8 presenti nel surnatante delle colture a lungo termine di late-EPCs
- ❖ valutato gli effetti dell'infezione sulla biologia delle late-EPCs infettate *in vitro* considerando in particolare:
 - la morfologia cellulare
 - la vitalità e la proliferazione cellulare
 - lo stato di attivazione delle late-EPCs infettate, mediante analisi dei marcatori VCAM-1, ICAM-1, e-selectina e delle integrine $\alpha 3$ e $\alpha \beta 3$
 - la capacità angiogenica *in vitro*.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Soggetti in studio

In questo studio sono stati presi in considerazione 69 soggetti con un'età compresa tra i 50 e 96 anni con Sarcoma di Kaposi, variante mediterranea, seguiti presso la Clinica Dermatologica dell'Ospedale Maggiore di Milano.

I soggetti sono stati suddivisi in base alla classificazione proposta da Brambilla et al. (2003). Tale classificazione prende in considerazione lo stadio tumorale (I, II, III e IV) e l'evoluzione della malattia (A lenta, B veloce). I soggetti risultano divisi come segue: 9 soggetti stadio IA, 19 soggetti stadio IB, 2 soggetti stadio IIA, 14 soggetti stadio IIB, 1 paziente stadio IIIA, 17 soggetti stadio IIIB, 0 soggetti stadio IVA, 6 soggetti stadio IVB.

Il gruppo di controlli, adeguato per età, è composto da 40 soggetti sani, 14 uomini e 19 donne con un'età compresa tra i 40 e 80 anni. Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad un prelievo di sangue venoso, eparinato e sterile. Tutti i soggetti hanno dato il loro consenso informato a partecipare allo studio.

Dato che non sono state condotte le stesse valutazioni su tutti i soggetti dello studio, per ogni test condotto verrà indicata la numerosità della casistica esaminata.

3.2. Reagenti e terreni

Per la separazione e la conta delle cellule mononucleate da sangue periferico (PBMCs) sono stati utilizzati i seguenti reagenti:

- Lympholyte, Cedarlane, Ontario, Canada
- PBS (Phosphate Buffered Saline) senza Calcio e Magnesio, EuroClone, UK
- Trypan Blue, Sigma-Aldrich, Missouri, USA

Per l'allestimento e l'espansione della coltura dei progenitori endoteliali da PBMCs separati da sangue intero vengono utilizzati i seguenti reagenti e terreni:

- EGM®-2 BulletKit® contenente 1 x 500 mL EBM®-2 (CC-3156) e 1 Set EGM®-2 SingleQuots® (CC-4147), Cambrex Bio Science, Milano (Italia)
- Fibronectin, Sigma-Aldrich, Missouri USA
- Collagen type I , BD Biosciences, USA
- Piastre 6 wells, Costar
- Fische da 25 cm² e 75 cm², Greiner
- Tripsina-EDTA (Solution C Tripsina 0,05%, EDTA 1:5000) Biological Industries
- PBS (Phosphate Buffered Saline) senza Calcio e Magnesio, EuroClone, UK

Per la caratterizzazione immunofenotipica delle cellule endoteliali in coltura sono stati utilizzati i seguenti reagenti:

- Low-density lipoprotein from human plasma, acetylated, Dil complex (Dil AcLDL), Molecular Probes, Eugene, USA
- Lectin from Ulex europaeus FITC-coniugato, Sigma, Missouri USA
- Anticorpo monoclonale anti-CD34 APC-coniugato
- Faser kit-APC, Miltenyi Biotec
- Anticorpo monoclonale anti-CD31 FITC-coniugato (Mouse IgG1k), Becton-Dickinson
- Anticorpo monoclonale anti-VEGFR-2 biotinilato, Sigma-Aldrich, Missouri
- Streptavidina FITC-coniugata, Sigma-Aldrich, Missouri

- Anticorpo monoclonale anti-CD45 PerCp-coniugato (Mouse IgG1), Becton-Dickinson
- Anticorpo monoclonale anti-CD146 PE-coniugato(IgG1), Chemicon
- Anticorpo monoclonale anti Tie-2 PE-coniugato (Mouse IgG1), R&D Syst
- Anticorpo monoclonale anti-CD105 FITC-coniugato Euroclone
- Anticorpo monoclonale anti-CD106 FITC-coniugato (IgG1), Becton-Dickinson
- Anticorpo monoclonale anti-CD62E PerCP-coniugato (IgG1), Becton-Dickinson
- Anticorpo monoclonale anti-Caveolina-1 (Mouse IgG1), Becton-Dickinson
- Anticorpo policlonale anti-eNOS (Rabbit), Becton-Dickinson
- Anticorpo monoclonale anti-von Willwbrand's factor (Mouse IgG1) Serotec
- Anticorpo monoclonale anti-CD14 PE-coniugato (MouselgG2a), Caltag
- Goat Anti-Mouse IgG FITC-coniugato, Jackson ImmunoResearch
- Goat Anti-Mouse IgG PE-coniugato, Jackson ImmunoResearch
- Goat Anti-Rabbit IgG PE-coniugato, Molecular Probes
- IgG1 PerCP coniugato, Becton-Dickinson
- Triton X-100
- PBS (Phosphate Buffered Saline) senza Calcio e Magnesio, EuroClone, UK
- PBS (Phosphate Buffered Saline) con Calcio e Magnesio, EuroClone, UK
- BSA (Bovine Serum Albumin, fraction V), Sigma-Aldrich, Missouri, Usa
- PFA (Parafolmaldeide), Sigma-Aldrich, Missouri, USA
- Soluzione di lavaggio, costituita da PBS addizionato di BSA 1% p/v
- Soluzione di fissaggio, costituita da PBS addizionato di PFA 1% p/v
- Soluzione di fissaggio, costituita da PBS addizionato di PFA 2% p/v

Per la valutazione della crescita cellulare in vitro sono stati utilizzati i seguenti reagenti e terreni:

- PBS (Phosphate Buffered Saline) senza Calcio e Magnesio, EuroClone, UK
- Acqua distillata sterile, EuroClone, UK
- Cristal violetto Sigma-Aldrich, Missouri, Usa
- Acido acetico Sigma-Aldrich, Missouri, Usa
- EGM®-2 BulletKit® contenente 1 x 500 mL EBM®-2 (CC-3156) e 1 Set EGM®-2 SingleQuots® (CC-4147), Cambrex Bio Science, Milano (Italia)

Per la valutazione della vitalità cellulare in vitro vengono sono stati utilizzati i seguenti reagenti:

- Annessina V APC-coniugato Kit, Becton-Dickinson
- 7AAD PerCP-coniugato Sigma-Aldrich, Missouri, Usa

Per la valutazione della capacità di vasculogenesi in vitro sono stati utilizzati i seguenti reagenti e terreni:

- Matrigel, Becton- Dickinson, USA
- EGM®-2 BulletKit® contenente 1 x 500 mL EBM®-2 (CC-3156) e 1 Set EGM®-2 SingleQuots® (CC-4147), Cambrex Bio Science, Milano (Italia)

Per la valutazione della capacità migratoria delle cellule endoteliali sono stati utilizzati i seguenti reagenti e terreni:

- Piastre transwell, inserti di policarbonato con pori di 8 µm, Costar
- EBM®-2 (CC-3156), Cambrex Bio Science, Milano (Italia)
- Diff-QuikTMKit, Medion Diagnostics

Per la valutazione della produzione di citochine da parte delle cellule endoteliali sono stati utilizzati i seguenti reagenti:

- Kit ELISA duoset

Per la valutazione dell'infezione e la quantificazione del genoma virale sono stati utilizzati i seguenti reagenti:

- DNeasy®Blood & Tissue kit QIAGEN
- TPA (13 myristate 13-acetate phorbol) 20ng/mL
- Kit per Real time PCR

Per l'infezione in vitro delle cellule endoteliali sono stati utilizzati i seguenti reagenti e terreni:

- Piastre 6 wells, Costar
- Fibronectin, Sigma-Aldrich, Missouri USA
- Tripsina-EDTA (Solution C Tripsina 0,05%, EDTA 1:5000) Biological Industries
- MILLEX®HV filter unit 0,45 µm Millipore
- EGM®-2 BulletKit® contenente 1 x 500 mL EBM®-2 (CC-3156) e 1 Set EGM®-2 SingleQuots® (CC-4147), Cambrex Bio Science, Milano (Italia)

Per marcatura della proteina LANA sono stati utilizzati i seguenti reagenti:

- Anticorpo monoclonale anti HHV-8 ORF73 (LANA) (Rat IgG2c) Advanced Biotechnologies Inc.
- Goat Anti-rat IgG Alexa488-coniugato, e-Bioscience
- Blocking buffer: 10% FBS + 0,2% tween 20% + 5% glicerolo + 0,02% sodio azide
- DAPI Sigma-Aldrich, Missouri, Usa
- Glicerolo Sigma-Aldrich, Missouri, Usa

3.3. Colture cellulari

Le BCBL-1 sono una linea di linfoma umano stabilmente infettata da HHV-8. Crescono in sospensione in RPMI 1640 addizionato con FCS (10%), L-glutammina (3%) e antibiotico penicillina-streptomina (1%). Vengono espanse ogni 3 giorni mediante centrifugazione e risospensione in terreno fresco.

Le HMEC sono una linea immortalizzata di cellule endoteliali del microcircolo. Crescono in adesione in MCDB-131 addizionato con FCS (10%), L-glutammina (1%), antibiotico penicillina-streptomina (1%), EGF (10ng/mL) e idrocortisone (1µg/mL). Vengono espanse mediante tripsinizzazione, risospensione in terreno fresco e semina in flask.

3.4. Isolamento e coltura dei progenitori endoteliali

3.4.1. Separazione delle cellule mononucleate da sangue venoso periferico

Il campione di sangue intero eparinato dal quale verranno separate le cellule mononucleate (PBMC) viene inizialmente centrifugato a 1400 RPM per 10 minuti in modo da separare il plasma dalla parte corpuscolata.

I PBMC sono stati isolati dal sangue mediante centrifugazione in gradiente discontinuo di densità con Lympholyte-H a 1000g per 30 minuti. I PBMC sono stati recuperati e lavati tre volte in PBS (primo lavaggio: 1000g per 30 minuti, secondo e terzo lavaggio: 350g per 15 minuti).

Le cellule isolate sono state contaminate in camera di Kova, utilizzando come colorante il Turk, (blu di metilene sciolto in acido acetico), che entra nelle cellule colorandone il nucleo, permettendo la distinzione tra linfociti e cellule polimorfonucleate. Infine le cellule sono state risospese nel terreno di coltura.

3.4.2. Allestimento colture di late-EPCs

Per ottimizzare la procedura di isolamento delle late-EPCs nei soggetti sani sono stati valutati gli effetti delle seguenti variabili:

1. Campione di origine: buffy coat o sangue periferico fresco;
2. Densità di semina dei PBMC per cm²: 2,5x10⁶ PBMC per cm² o 5x10⁶ PBMC per cm²;
3. Concentrazione di siero (FBS) nel terreno di coltura: EGM-2 con 5% FBS o EGM-2 con 10% FBS;
4. Tempistica del primo cambio del terreno: il giorno successivo alla semina (necessario per eliminare le cellule non adese) o tre giorni dopo (in modo da consentire la stabilizzazione della coltura);
5. Substrato per la semina dei PBMC: fibronectina (FN) o collagene (CL).

Combinando i cinque parametri, sui PBMCs ottenuti a partire sia da buffy coat che da sangue fresco, sono state testate le seguenti condizioni di coltura in pozzetti pretrattati con fibronectina (indicata con FN) (1µg/cm²) o collagene (indicato con CL) (5 µg/ cm²):

- METODO A_{FN} o A_{CL}: sono stati seminati 2,5x10⁶ PBMC per cm², usando come terreno di coltura EGM-2 5% FBS, e il giorno successivo alla semina è stato effettuato il cambio del terreno
- METODO B_{FN} o B_{CL}: sono stati seminati 2,5x10⁶ PBMC per cm², usando come terreno di coltura EGM-2 5% FBS, e il cambio di terreno è stato effettuato tre giorni dopo la semina
- METODO C_{FN} o C_{CL}: sono stati seminati 2,5x10⁶ PBMC per cm², usando come terreno di coltura EGM-2 10% FBS, e il giorno successivo alla semina è stato effettuato il cambio del terreno
- METODO D_{FN} o D_{CL}: sono stati seminati 2,5x10⁶ PBMC per cm², usando come terreno di coltura EGM-2 10% FBS, e il cambio di terreno è stato effettuato tre giorni dopo la semina
- METODO E_{FN} o E_{CL} sono stati seminati 5x10⁶ PBMC per cm², usando come terreno di coltura EGM-2 5% FBS, e il giorno successivo alla semina è stato effettuato il cambio del terreno
- METODO F_{FN} o F_{CL}: sono stati seminati 5x10⁶ PBMC per cm², usando come terreno di coltura EGM-2 5% FBS, e il cambio di terreno è stato effettuato tre giorni dopo la semina
- METODO G_{FN} o G_{CL}: sono stati seminati 5x10⁶ PBMC per cm², usando come terreno di coltura EGM-2 10% FBS, e il giorno successivo alla semina è stato effettuato il cambio del terreno

- METODO H_{FN} o H_{CL} : sono stati seminati 5×10^6 PBMC per cm^2 , usando come terreno di coltura EGM-2 10% FBS, e il cambio di terreno è stato effettuato tre giorni dopo la semina.

Per l'allestimento delle colture di ctr-late-EPCs e cKS-late EPCs è stato utilizzato il metodo che ha dato i risultati migliori in fase di ottimizzazione.

In particolare, i PBMCs separati dal sangue intero sono stati seminati alla concentrazione di $2,5 \times 10^6/cm^2$ in piastre da 24 pozzetti trattate alternativamente con fibronectina ($1 \mu g/cm^2$ per 45 minuti) o con collagene ($5 \mu g/cm^2$ per 90 minuti). Per il coating di collagene, prima di procedere alla semina dei PBMCs in pozzetto è necessario effettuare tre lavaggi con PBS.

Le cellule sono state mantenute in coltura utilizzando il terreno EGM-2, costituito da terreno EBM addizionato dei seguenti fattori di crescita in grado di favorire il differenziamento in senso endoteliale (FBS, idrocortisone, hFGF, VEGF, R3-IGF-1, acido ascorbico, hEGF, GA-1000, eparina).

Le cellule sono state coltivate in incubatore alla temperatura di $37^\circ C$ in atmosfera umidificata e in presenza di CO_2 5%. Il giorno successivo alla semina, il terreno di coltura è stato rimosso delicatamente e, dopo un delicato lavaggio del pozzetto, è stato sostituito con del terreno fresco. Successivamente il terreno è stato cambiato 3 volte alla settimana.

Le colonie di late-EPCs sono state visualizzate utilizzando un microscopio ottico invertito.

Le colonie sono state staccate per l'espansione utilizzando Tripsina 0.25%, risospese in EGM-2 e piastrate in piastre coattate con fibronectina o collagene.

3.5. Analisi della comparsa delle late-EPCs

3.5.1. Conta e analisi morfologica

La morfologia delle colonie di late-EPCs è stata visualizzata con microscopio ottico invertito. Il numero di colonie di late-EPCs è stato valutato in base al numero di colonie prodotte rispetto al numero di PBMC seminati. Inoltre è stato registrato il tempo di comparsa delle colonie.

3.5.2. Analisi immunofenotipica

3.5.2.1. Analisi citofluorimetrica

Dopo la coltura, le late-EPCs adese sono state staccate mediante tripsinizzazione, raccolte, centrifugate a 400 g per 10 minuti e contaminate al microscopio ottico mediante colorante Turk.

Le cellule sono state risospese ad una concentrazione di $0,1 \times 10^6$ in 30 μL di 1% BSA in PBS. Per l'analisi immunofenotipica le cellule sono state marcate con gli anticorpi di interesse ed incubate per 30 minuti al buio a $4^\circ C$. Al termine dell'incubazione nei campioni sono stati aggiunti 2 mL di soluzione di lavaggio (1% BSA in PBS) e sono stati centrifugati a 400 g per 5 minuti. Dopo aver eliminato il surnatante, le cellule sono state risospese in 300 μL di soluzione di fissaggio (1% PFA in PBS) e conservate al buio a $4^\circ C$. L'acquisizione dei campioni al citofluorimetro deve essere effettuata entro le 24 ore dalla preparazione.

Per valutare la positività al marcatore VEGFR-2 è stata eseguita una marcatura indiretta utilizzando un primo anticorpo biotilato specifico, che è stato incubato per 30 minuti al buio a $4^\circ C$. Successivamente le cellule sono state lavate e sono

state incubate con la streptavidina-FITC per 20 min al buio a 4°C. Dopo l'incubazione le cellule sono state lavate due volte, risospese in 150 µL di soluzione di fissaggio (1% PFA in PBS) e conservate al buio a 4°C per la lettura al citofluorimetro.

Per anticorpi non coniugati è stata fatta una marcatura indiretta con anticorpo secondario specifico. I campioni sono stati incubati con l'anticorpo primario di interesse. Al termine dell'incubazione ad ogni campione è stato aggiunto 1.5 mL di soluzione di lavaggio (PBS-BSA 1%) e i campioni sono stati centrifugati (400 g, 5 minuti) per eliminare le eventuali tracce di anticorpo in eccesso. Successivamente è stata effettuata una seconda incubazione, a 4°C per 20 minuti al buio, con 50 µL di anticorpo secondario specifico marcato in PE o FITC diluito 1:100 in PBS. Terminata l'incubazione ogni campione è stato lavato con 1.5 mL di soluzione di lavaggio (PBS-BSA 1%) e poi centrifugato (400 g, 5 minuti). Al termine della seconda centrifugazione di lavaggio il pellet è stato risospeso in 300 µL di soluzione di fissaggio (PBS-PFA 1%) e conservato a 4°C.

Per la tecnica FASER sono state seguite le indicazioni del produttore. Le cellule sono state incubate per 20 minuti a temperatura ambiente con l'anticorpo monoclonale anti-CD34 APC-coniugato. Successivamente i campioni sono stati lavati con 1.5 mL di soluzione di lavaggio (PBS-BSA 1%) e centrifugati a 400 g per 5 minuti. Le cellule sono state risospese in FcR blocking reagent e APC-Activator reagent per 10 minuti al buio a 4°C. Dopo l'incubazione le cellule sono state lavate con soluzione di lavaggio e risospese in FcR blocking reagent e APC-Enhancer reagent per 10 minuti al buio a 4°C.

3.5.2.2. Analisi immunocitochimica

Per l'analisi in immunofluorescenza le cellule, dopo essere state staccate con tripsina, sono state fatte crescere in chamber slide coattate con fibronectina. Una volta raggiunta la confluenza, le cellule sono state fissate e marcate.

La marcatura con Ulex europeus e per l'incorporazione di Dil-acLDL, è stata fatta nel modo seguente. Al termine della coltura le cellule sono state lavate 2 volte con PBS con Ca²⁺ e Mg²⁺ e incubate per un'ora a 37°C con il Dil-acLDL (24 µL/mL di EGM). I campioni sono stati lavati 2 volte e fissati con 200 µL di una soluzione di 2% PFA in PBS per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo 2 ulteriori lavaggi le cellule sono state fissate ulteriormente con acetone freddo ed incubate con Ulex europeus FITC-coniugato (10 µL/mL) per un'ora a 37°C. Trascorso il tempo di incubazione le cellule sono state lavate 2 volte per eliminare l'anticorpo in eccesso. Viene quindi montato il vetrino coprioggetto, utilizzando una soluzione al 50% di glicerolo. L'analisi dei vetrini viene fatta al microscopio a fluorescenza.

Per l'analisi di altri marcatori fenotipici in immunofluorescenza, ogni pozzetto è stato fissato preliminarmente con 200 µL di PFA 4% e lasciato per 20 minuti a 4°C. Per ciascun pozzetto sono stati effettuati due lavaggi da 5 minuti con 200 µL di PBS-BSA 1%, poi vengono aggiunti 200 µL di triton X, e lasciati per 10 minuti, al termine dell'incubazione è stato rimosso il triton e sono stati aggiunti 200 µL di glicina per 10 minuti. Successivamente è stato effettuato un lavaggio di 10 minuti con 200 µL PBS addizionato di FCS 10%. Sono stati aggiunti 200 µL di anticorpo primario alla diluizione desiderata e lasciato a 4°C over night. Il vetrino è stato lavato tre volte

con 200 μ L di PBS/BSA 1%, sono stati aggiunti 200 μ L di anticorpo secondario alla diluizione di interesse per 1 ora a temperatura ambiente, dopo di che l'eccesso di anticorpo è stato eliminato lavando con PBS/BSA 1%.

3.6. Caratterizzazione delle colture di late-EPCs

3.6.1 Senescenza

Le late-EPCs in senescenza sono state identificate mediante osservazione al microscopio. Le late-EPCs in senescenza perdono la loro morfologia fusata acquisendo forme casuali e inoltre presentano un rallentamento della crescita.

3.6.2 Capacità proliferativa

Per il confronto tra ctr-late-EPCs e cKS-late-EPCs la valutazione della crescita delle late-EPCs è stata fatta mediante conta delle cellule ad ogni passaggio di espansione.

Per l'infezione *in vitro* la valutazione della crescita è stata fatta mediante un test colorimetrico con Cristal Violetto. Le cellule sono state seminate in piastre da 48 pozzetti precoattate con fibronectina e sono state mantenute per 0, 24, o 72 ore in coltura. Dopo aver rimosso il terreno di coltura, e lavato con 200 μ L di PBS le late-EPC sono state fissate con 200 μ L di PFA (4%) per 20 minuti, successivamente è stato fatto un lavaggio con 200 μ L di PBS e sono stati aggiunti 200 μ L di Cristal Violetto (0,1%) per 20 minuti. Trascorso il periodo di incubazione il pozzetto è stato lavato tre volte con acqua bidistillata ed è stato aggiunto acido acetico (10%) per 20 minuti, sotto agitazione continua. La lettura di assorbanza è stata fatta alla lunghezza d'onda di 550nm.

3.6.3. Vitalità cellulare

Per il confronto tra ctr-late-EPCs e cKS-late-EPCs la vitalità è stata valutata durante la conta delle late-EPCs, ad ogni passaggio di espansione, sfruttando la capacità del Trypan Blue di colorare selettivamente le cellule morte.

Per l'infezione *in vitro* la valutazione della vitalità cellulare è stata fatta sulle EPC dopo che sono state staccate dalla piastra di coltura con EDTA.

Dopo aver levato le cellule con PBS/BSA 1%, 1×10^5 cellule vengono risospese in 100 μ L di Binding Buffer. Successivamente le cellule vengono incubate per 15 minuti con 5 μ L di Annessina e 5 μ L di 7AAD. Dopo di che i campioni sono pronti per l'analisi citofluorimetrica.

3.7. Caratterizzazione funzionale delle late-EPCs

3.7.1. Produzione di citochine

La produzione di citochine viene valutata mediante test ELISA, la cui metodica viene fornita dal produttore, sul surnatante di colture di late-EPCs di soggetti con KS e controlli. Le citochine testate sono IL-6, TNF α , INF γ , VEGF. Il surnatante delle colture viene recuperato e centrifugato a 400 g per 10 minuti, aliquotato e conservato a -20°C per essere poi utilizzato per il test ELISA.

3.7.2. Vasculogenesi in vitro

Per il saggio di vasculogenesi in vitro viene utilizzato il Matrigel, un reagente commerciale ottenuto a partire da un tumore ricco di matrice extracellulare (ECM), in grado di simulare l'interazione cellula-ECM in vitro.

Per il saggio 100 μL di matrigel freddo sono stati gelificati per 30 minuti a 37°C nei pozzetti di una piastra da 96 wells. Sono stati, quindi, aggiunti 50 μL di EGM-2 che contengono 15×10^3 cellule, ricoprendo così tutta la superficie del matrigel gelificato. Dopo un'incubazione a 37° C per 30 minuti sono stati aggiunti 100 μL di EGM-2. Le piastre, così preparate, sono state incubate a 37°C e la formazione di vasi è stata visualizzata mediante microscopio invertito dopo 24 ore dalla semina. Per la valutazione della capacità di dare origine a vasi in vitro sono stati quantificati i branch point in 5 campi scelti in modo casuale (ingrandimento 4x).

3.8. Valutazione della presenza di HHV-8 nelle late-EPCs di soggetti con cKS

3.8.1. Immunofluorescenza della proteina LANA

Per la valutazione dell'infezione sia nelle cKS-late-EPCs che nelle ctr-late-EPCs HHV-8 infette è stata visualizzata la presenza della proteina virale di latenza LANA. Le BCBL-1 (controllo positivo) è una linea stabilmente infettata da HHV-8 che cresce in sospensione pertanto le cellule sono state pellettate, lavate con PBS e $0,2 \times 10^6$ cellule sono state messe sul vetrino mediate citospin.

Le late-EPCs e le HMEC crescono in adesione pertanto è stato fatto un lavaggio in PBS e successivamente la marcatura.

Per la marcatura: le cellule sono state fissate con etanolo:acetone (95%:5%) per 20 minuti a temperatura ambiente e lavate 3 volte con PBS. Le cellule sono state permeabilizzate con Triton 0,3% per 20 minuti a temperatura ambiente e lavate 3 volte con PBS. Le cellule sono state incubate per 1 ora con blocking buffer (BSA 5% in PBS), successivamente sono state incubate con anticorpo primario antiHHV-8 ORF73 (1:500 in PBS), over night a 4°C. Al termine dell'incubazione le cellule sono state lavate 3 volte con PBS, sono state lincubate per 1 ora con anticorpo secondario anti rat-Alexa 488 (1:500 in PBS), a temperatura ambiente e al termine sono state lavate 3 volte con PBS. Infine sono state incubate con DAPI (1:5000 in acqua) per 5 minuti, lavate 3 volte con PBS. I vetrini sono stati montati con glicerolo:acqua (1:5).

3.9. Infezione in vitro delle late-EPCs di soggetti sani

La late-EPCs isolate da soggetti sani sono state infettate per 12 ore con HHV-8 nativo rilasciato nel surnatante di colture della linea BCBL-1.

Le BCBL sono una linea cellulare stabilmente infettata da HHV-8. Il rilascio del virus nel surnatante è stato stimolato mediante trattamento con TPA 20ng/mL per 72 ore. Al termine dell'incubazione il surnatante è stato recuperato, centrifugato a 400 g per 30 minuti e filtrato con filtri da 0,45 μm e successivamente ultracentrifugato a 25000 g x 2 ore. E' stat valutata la concentrazione di genomi di HHV-8 nel surnatante (7×10^6 Genomi Equivalenti (GEq)/mL).

Le late EPCs e le HMEC sono state infettate con concentrazioni scalari di virus e l'infezione è stata effettuata per 12 ore a 37°C. Trascorso questo periodo è stato

rimosso il surnatante, le cellule sono state lavate tre volte con PBS ed è stato aggiunto il terreno di coltura. Le cellule e il surnatante sono stati recuperati rispettivamente per l'estrazione del DNA e per la quantificazione del genoma virale a tempi successivi di coltura.

3.10. Valutazione dell'infezione da HHV-8

3.10.1. Estrazione del DNA virale

Per l'estrazione del DNA virale è stato utilizzato un kit commerciale. Le cellule adese sono state staccate mediante tripsinizzazione, raccolte, centrifugate a 400 g per 10 minuti e contaminate al microscopio ottico mediante colorante Turk.

Le cellule sono state risospese in 200 µL di PBS e poste in una eppendorf, dopo aver aggiunto 20 µL di proteinasi K e 200 µL di buffer AL, mescolando delicatamente. Il campione è stato lasciato a 56°C per 10 minuti. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 200 µL di etanolo al 96-100% e il campione dopo esser stato posto in una colonnina di eluizione, è stato centrifugato a 6000 g per 1 minuto. È stato sostituito il tubo di raccolta sottostante la colonnina, sono stati aggiunti 500 µL di buffer AW1 e viene centrifugato a 6000 g per 1 minuto. Al termine è stato eliminato il tubo di raccolta e sostituito, sono state poi aggiunti 500 µL di buffer AW2 e il campione è stato centrifugato a 20000 g per 3 minuti. Infine l'eluizione del DNA è stata fatta aggiungendo 200 µL buffer AE e centrifugando a 6000 g per 1 minuto.

Il DNA estratto è stato quantificato mediante lettura spettrofotometrica dell'assorbanza a 260nm e 280nm di 50 µL di campione. La restante quantità di DNA è stata conservata a -20°C per la quantificazione del genoma virale.

3.10.2. Quantificazione del genoma virale mediante PCR

Il genoma di HHV-8 è stato quantificato presso l'Istituto Oncologico Veneto mediante Real time PCR. È stato quantificato utilizzando un primer specifico per la open reading frame 26 del virus e una sonda. Il primer amplifica una regione di 233 paia di basi di ORF 26, le regioni esterne sono disegnate sulla sequenza pubblicata (nt 898-918 e 1240-1262 di ORF 26) e le regioni interne corrispondono ai primer pubblicati KS330-233; la sequenza presente nella sonda comprende 5'CGCTATTCTGCAGCAGCTGTTGGTGTAC3'. La sonda presenta un reporter dye al 5' e un dark quencher al 3' per ridurre il background di emissione per le sonde non ibridate. La PCR quantitativa e l'acquisizione dei dati sono stati effettuati con ABI PRISM sequence detection system 7700 e i reagenti sono forniti nel TaqMan reaction system (Eurogentec). Un volume di reazione di 50 µL contiene 1 µL di DNA testato, 5 µL di buffer di reazione 10x, 3.5mM MgCl₂, 200 µM di dATP, dCTP, dGTP e 400 µM di dUTP, una concentrazione 300 nM di ogni primer e 200 nM di sonda, 1.25 U di enzima Hot GoldStar e 0.5 U di uracil N-glicosidasi (UNG Eurogentec). Dopo un'iniziale incubazione di 5 minuti a 50°C seguita da 10 minuti di UNG inattivazione e denaturazione del DNA a 95°C, per 45 cicli, si ritorna a 95°C per 15 minuti e a 58°C per 1 minuto.

3.11. Analisi Statistica

La frequenza di soggetti da cui sono state isolate colonie di late-EPCs è stata indicata come valore percentuale e la significatività è stata valutata con test χ^2 . Dove richiesto i dati sono stati analizzati con Fisher test.

Il tempo di comparsa e il numero di colonie di late EPCs sono stati indicati come media \pm errore standard (SE) e per il confronto tra le late-EPCs dei soggetti con KS e dei soggetti sani la significatività è stata valutata con Student t test per campioni indipendenti.

La senescenza delle late-EPCs è stata indicata come valore percentuale e la significatività è stata valutata con Fisher test.

I dati di proliferazione, vitalità cellulare e produzione di citochine sono stati indicati come media \pm SE e la significatività è stata valutata con Mann-Whitney test per campioni indipendenti.

I dati sullo stato di attivazione, e sull'angiogenesi sono stati indicati come media \pm SE e la significatività è stata valutata con Wilcoxon test per dati appaiati.

La numerosità dei campioni è stata indicata per ogni valutazione.

Tutte le analisi statistiche presumono un livello di significatività a due code di 0,05.

Le analisi dei dati sono state effettuate con GraphPad Prism 4.03 (GraphPad Software, San Diego, CA).

4. RISULTATI

4.1. Ottimizzazione del metodo di coltura

E' ampiamente dimostrato che le late-EPCs possono essere isolate da sangue periferico e coltivate in vitro. In accordo con quanto atteso, in coltura, le late-EPCs si presentano come piccole colonie nelle quali le cellule mostrano una forma fusata (spindle-shaped). Le late-EPCs proliferano lentamente durante la prima settimana di coltura e successivamente più rapidamente formando un monostrato cellulare (Figura 6).

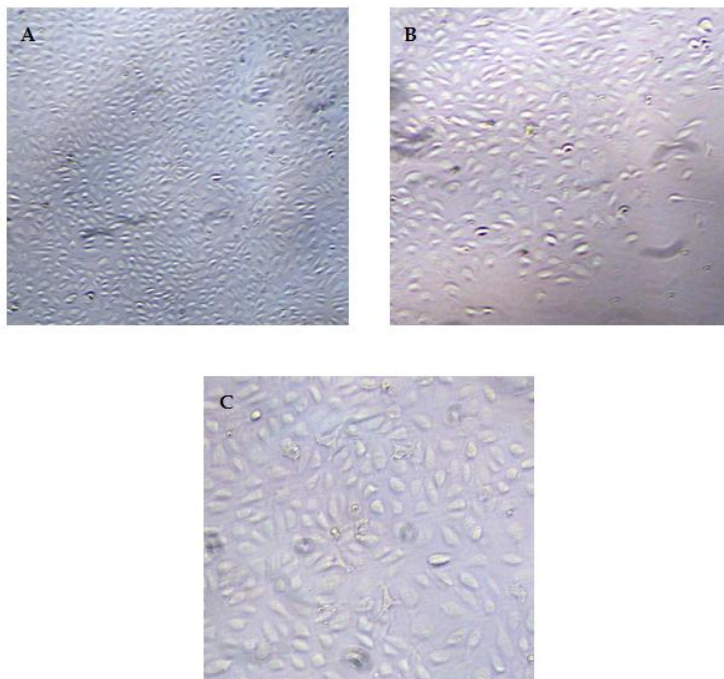


Figura 6: Colonie di late-EPCs ottenute da PBMC in coltura di 2 controlli: immagine rappresentativa di A) colonia di EPCs isolata dal primo controllo (Ingrandimento 4x) B) colonia di EPCs isolata dal secondo controllo (Ingrandimento 10x) C) colonia di EPCs isolata da controllo ad ingrandimento maggiore (Ingrandimento 20x).

Come atteso le late-EPCs esprimono i marcatori CD34, CD31 (PECAM), CD105, CD54 (ICAM), il recettore per il fattore di crescita endoteliale 2, KDR, e l'antigene CD146 mentre non esprimono i marcatori leucocitari CD45 e monocitari CD14 (Figura 7 e Tabella 3).

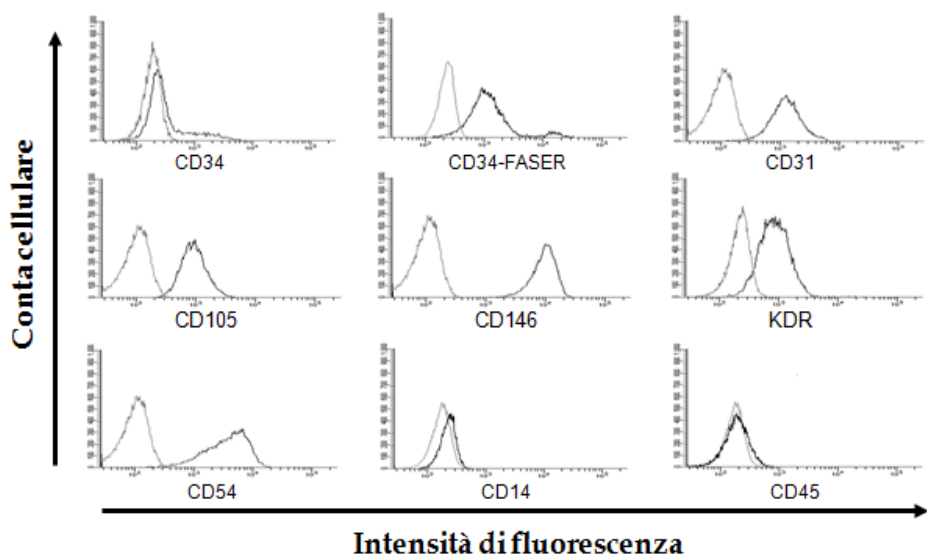


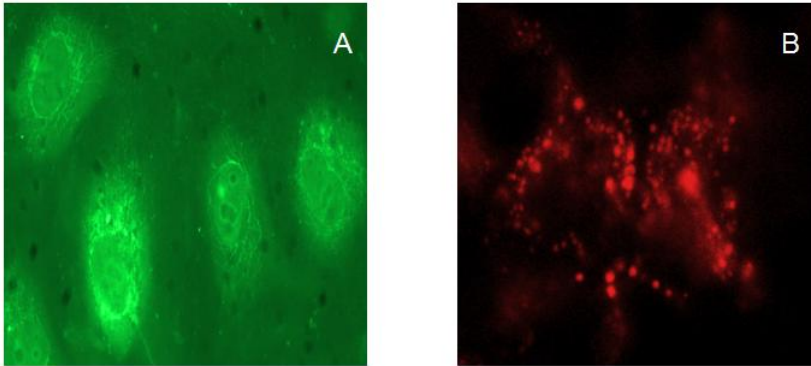
Figura 7: Caratterizzazione immunofenotipica delle late-EPCs. Analisi citofluorimetrica rappresentativa per l'espressione dei marcatori di superficie analizzati sulle late-EPCs in coltura.

IMMUNOFENOTIPO

Marcatori	Espressione sulle EPC
CD34 Faser	95.1 ± 2.1
CD31	98.1 ± 1.2
CD105	97.6 ± 0.8
CD146	98.9 ± 1.0
KDR	74.1 ± 0.9
CD54	96.9 ± 1.1
CD14	1.25 ± 0.5
CD45	0.9 ± 0.1

Tabella 3: Caratterizzazione immunofenotipica delle late-EPCs. Percentuale di cellule positive al marcatore indicato. Dati mostrati come media ± SE.

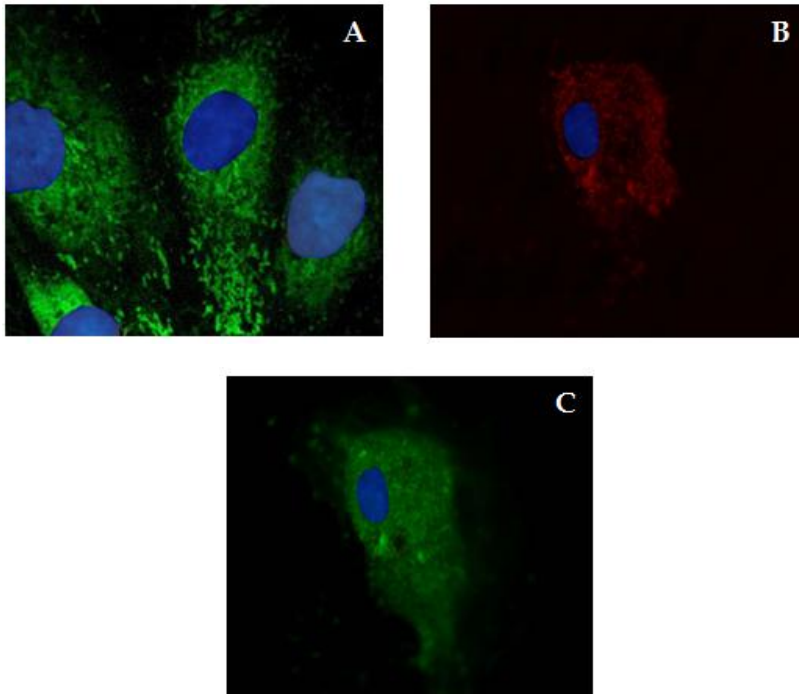
Inoltre, le late-EPCs sono in grado di incorporare il lipoproteine a bassa densità (DilAc-LDL) e di legare la lectina ULEX-Europaeus (UEA-1) (Figura 8) ed esprimono i marcatori tipici delle cellule endoteliali come l'ossido nitrico sintetasi endoteliale (e-NOS), Caveolina-1 e il fattore di von Willebrand (vWF) (Figura 9).



C

Marcatori	Espressione sulle EPC
UEA-1	99.5 ± 0.7
Ac-LDL	97.3 ± 0.9

Figura 8: Immunofluorescenza su late-EPCs in coltura (ingrandimento 40x): A) legame alla lectina UEA-1; B) uptake Ac-LDL; C) percentuale di cellule positive al marcatore indicato. Dati mostrati come media ± SE.



D

Marcatore	Espressione sulle EPC
e-NOS	98.2 ± 1.0
vWF	98.8 ± 2.8
Cav-1	96.2 ± 1.9

Figura 9: Immunofluorescenza su late-EPCs in coltura (ingrandimento 40x): A) espressione di fattore di von Willebrand; B) e-NOS e C) Caveolina-1 D) percentuale di cellule positive al marcatore indicato. Dati mostrati come media ± SE.

Infine, un'altra caratteristica delle late-EPCs è la capacità di dare origine a strutture simil-vascolari in vitro (Figura 10).

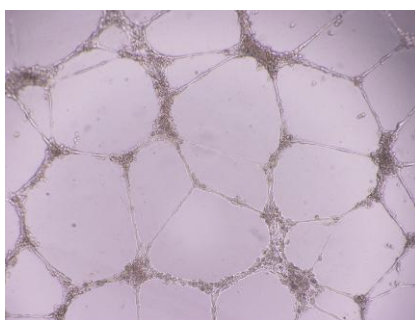


Figura 10: Saggio di angiogenesi in vitro ottenuto seminando late-EPCs (ingrandimento 4x). Immagine rappresentativa di formazione di strutture simil-vascolari in vitro su Matrigel, preparazione solubilizzata di membrana basale estratta da un tumore di topo ricco di proteine della matrice extracellulare i cui componenti fondamentali sono: laminina, collagene di tipo IV, proteoglicani, eparansolfati ed entactina. Le cellule coltivate su Matrigel assumono un comportamento simile a quello che avrebbero in vivo.

Il protocollo di coltura delle late-EPCs è stato ottimizzato, nei soggetti sani HHV-8 negativi (ctr-late-EPCs), valutando l'effetto: del campione d'origine, della densità di semina delle cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC), della percentuale di siero nel terreno di coltura, della tempistica del primo cambio di terreno e del substrato utilizzato per la semina dei PBMC.

Le late-EPCs vengono isolate a partire da PBMC che vengono seminati su un substrato di fibronectina (FN) o di collagene (CL), a seconda degli autori, senza una chiara indicazione delle proprietà di uno o dell'altro substrato.

Dall'applicazione delle diverse condizioni di coltura descritte precedentemente nella sezione Materiali e Metodi, abbiamo osservato che le colonie di late-EPCs compaiono solamente quando viene utilizzato sangue fresco come campione di origine, infatti, solamente dal 5% dei buffy coat è stata osservata la comparsa di colonie di late-EPCs mentre utilizzando i PBMC isolati da sangue fresco è stata osservata la comparsa di colonie di late-EPCs nella quasi totalità dei campioni,

pertanto il sangue fresco è stato selezionato come campione di origine per l'isolamento delle late-EPCs.

Analizzando gli altri parametri considerati è stato osservato che tra le diverse modalità di cambio di terreno testate su fibronectina, solo il metodo A_{FN} (2,5x10⁶ PBMC per cm², EGM-2 addizionato del 5% FBS, e lavaggio il giorno successivo alla semina) ha permesso di isolare le colonie di late-EPCs da 3 soggetti su 6 (50%). Mentre gli altri metodi non hanno permesso di isolare colonie di late-EPCs su fibronectina.

Su substrato di collagene è stato osservato che il metodo A_{CL} (2,5x10⁶ PBMC per cm², EGM-2 addizionato del 5% FBS, e lavaggio il giorno successivo alla semina) ha permesso l'isolamento di colonie di late-EPCs da 5 soggetti su 6 (83%), e il metodo C_{CL} (2,5x10⁶ PBMC per cm², EGM-2 addizionato del 10% FBS, e lavaggio il giorno successivo alla semina) ha permesso l'isolamento di colonie di late-EPCs solo in un 1 su 6 (16%). Inoltre utilizzando il metodo E_{CL} (5x10⁶ PBMC per cm², EGM-2 addizionato del 5% FBS, e lavaggio il giorno successivo alla semina) è stata osservata la comparsa di colonie di late-EPCs da 1 su 6 (16%).

I risultati ottenuti dimostrano che i parametri presi in considerazione influenzano l'isolamento delle colonie di late-EPCs in vitro. Pertanto, sulla base di quanto osservato è stato scelto il metodo A (2,5x10⁶ PBMC per cm², EGM-2 addizionato del 5% FBS, e lavaggio il giorno successivo alla semina) per l'isolamento delle colonie di late-EPCs dai soggetti sani HHV-8 negativi (ctr-late-EPCs) e dai soggetti con cKS (cKS-late-EPCs) per i successivi esperimenti. Inoltre, non è stato scelto un unico substrato per l'isolamento delle late-EPCs ma sono stati considerati sia fibronectina che collagene come substrati ipotizzando che le cKS-late-EPCs potrebbero avere un diverso comportamento rispetto alle ctr-late-EPCs.

4.2. Confronto tra late-EPCs isolate da soggetti con cKS e soggetti sani

Utilizzando il metodo precedentemente ottimizzato, sono state isolate le late-EPCs, coltivando i PBMC sui due substrati di coltura, fibronectina e collagene, al fine di valutare se esiste una differenza nella frequenza di soggetti da cui è stata isolata almeno una colonia di late-EPCs, nel tempo di comparsa e nel numero delle colonie di late-EPCs isolate da soggetti con cKS rispetto ai soggetti sani.

Le late-EPCs originate da questi due gruppi di soggetti sono state utilizzate per le seguenti caratterizzazioni.

4.2.1. Efficienza di isolamento delle colonie di late-EPCs

Le late-EPCs sono state identificate sulla base del loro aspetto morfologico in coltura e, per ogni soggetto sano e soggetto con cKS, è stato registrato il numero di PBMC seminati, il tempo di comparsa delle colonie e il numero di colonie originate in coltura. Morfologicamente non vi sono evidenti differenze tra le cKS-late-EPCs e le ctr-late-EPCs.

4.2.1.1. Frequenza di soggetti da cui sono state isolate colonie di late-EPCs

Per i due gruppi in studio, è stata calcolata la frequenza di soggetti da cui è stata isolata almeno una colonia di late-EPCs (FQ-late-EPCs) su fibronectina e collagene per valutare l'efficienza del substrato nell'isolamento delle late-EPCs.

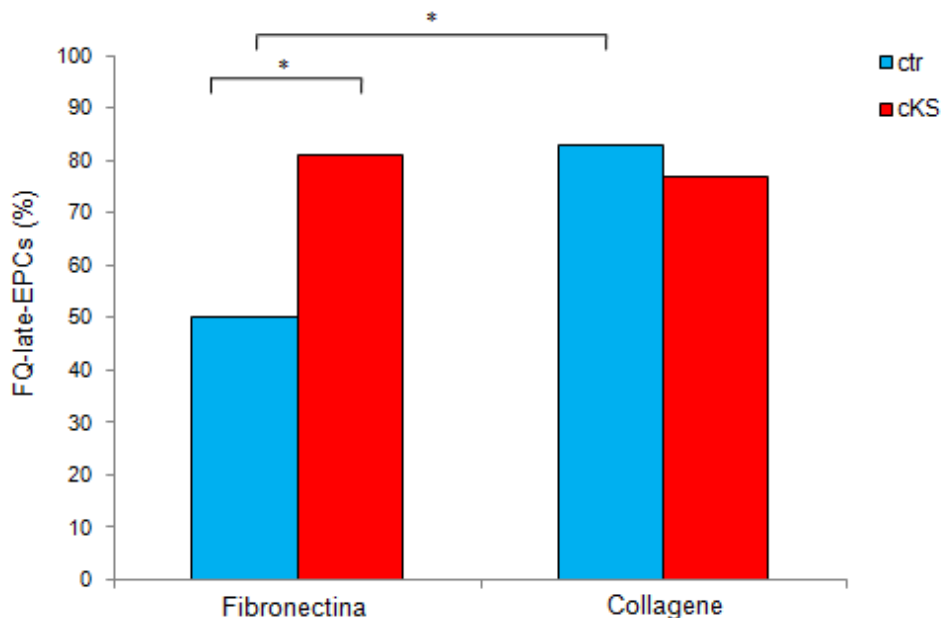


Figura 11: Frequenza di soggetti da cui è stata isolata almeno una colonia di late-EPCs (FQ-late-EPCs). Percentuale di soggetti che ha dato origine ad almeno una colonia di late-EPCs nei soggetti sani e nei soggetti con cKS seminati su fibronectina o collagene. Dati mostrati come valore percentuale. Significatività calcolata con χ^2

Come si osserva in figura 11, su fibronectina la FQ-late-EPCs è maggiore nei soggetti con cKS rispetto ai soggetti sani (soggetti sani vs soggetti con cKS: 50% n= 18; 81% n= 47; p<0,05). Su collagene la FQ-late-EPCs non presenta differenze fra soggetti con cKS e soggetti sani (soggetti sani vs soggetti con cKS: 83% n=24; 78% n=22; p=ns).

Nei soggetti sani la FQ-late-EPCs su fibronectina è minore rispetto alla FQ-late-EPCs su collagene (FN vs CL: 50% n= 18; 84% n=24; p<0,05). Nei soggetti con cKS non ci sono differenze nella FQ-late-EPCs su fibronectina rispetto FQ-late-EPCs su collagene (FN vs CL: 81% n= 47; 77% n=22; p=ns).

Valutata la differente frequenza di soggetti da cui sono state isolate le colonie di late-EPCs tra soggetti con cKS e soggetti sani, sono stati presi in considerazione solo i soggetti con cKS al fine di valutare se lo stadio e la progressione del tumore influiscono sulla FQ-late-EPCs.

I soggetti sono stati divisi, sulla base della stadiazione tumorale in due gruppi: il primo comprende soggetti allo stadio I e II (nodulare e infiltrativo, senza componente angiomatosa), l'altro, soggetti allo stadio III e IV (florido e disseminato, con componente angiomatosa). Utilizzando questa divisione si vuole individuare se la FQ-late-EPCs è correlata allo stadio della malattia.

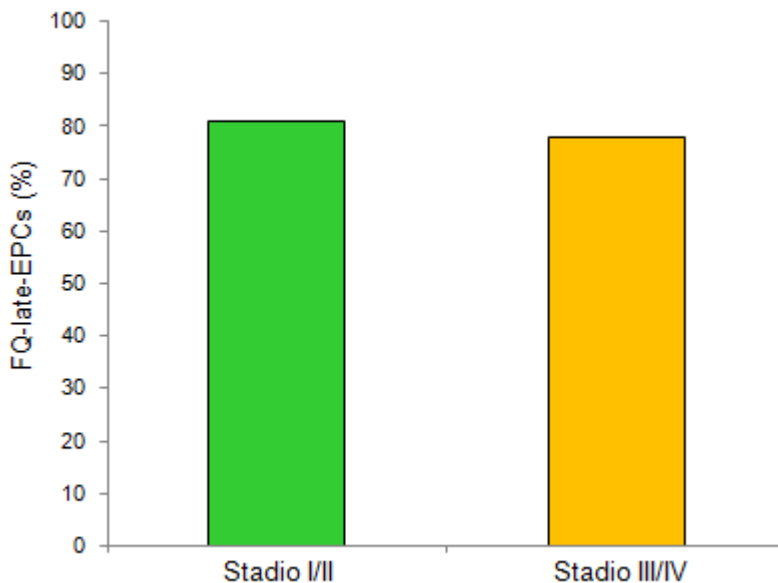


Figura 12: Frequenza di soggetti da cui è stata isolata almeno una colonia di late-EPCs (FQ-late-EPCs). nei soggetti con cKS allo stadio I/II e allo stadio III/IV. Dati mostrati come valore percentuale. Significatività calcolata con Fischer test.

Dai risultati ottenuti è stato osservato che la FQ-late-EPCs nei soggetti con cKS non varia in maniera significativa in base allo stadio della patologia (I/II vs III/IV: 81% n=21; 78% n=34; p=ns) (Figura 12).

Gli stessi soggetti sono stati divisi, sulla base dell'evoluzione tumorale, in due gruppi: il primo comprende soggetti ad evoluzione lenta della malattia (A), l'altro, soggetti ad evoluzione veloce (B). Dopo una prima analisi dei soggetti abbiamo osservato che il numero di soggetti in stadio III e IV con evolutività lenta della patologia è molto limitato, infatti, come accennato precedentemente, questi stadi aggressivi sono legati ad una progressione veloce della malattia.

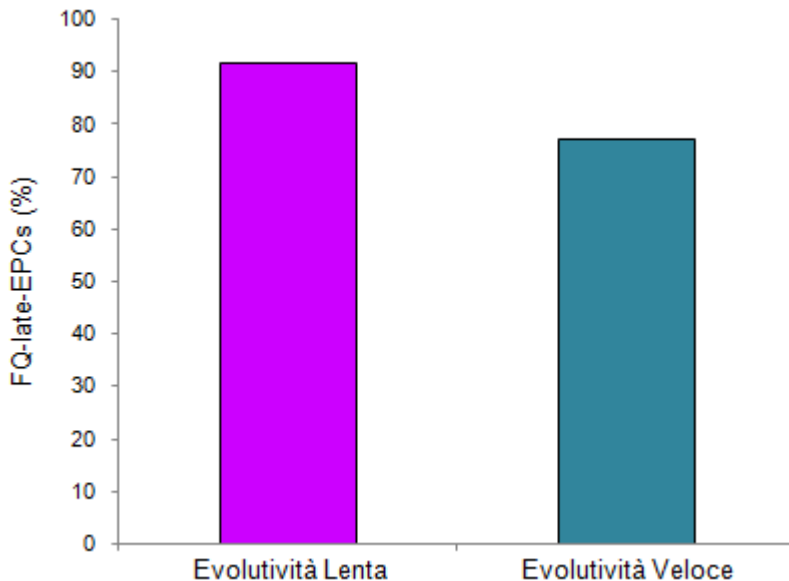


Figura 13: Frequenza di soggetti da cui è stata isolata almeno una colonia di late-EPCs (FQ-late-EPCs) nei soggetti con cKS ad evolutività lenta (A) e ad evolutività veloce (B). Dati mostrati come valore percentuale. Significatività calcolata con Fischer test.

Come si osserva in figura 13, non ci sono differenze significative nella FQ-late-EPCs tra il gruppo di soggetti con cKS a evoluzione lenta e il gruppo dei soggetti con cKS a evoluzione veloce (A vs B: 92% n=11; 77% n=44; p=ns).

4.2.1.2. Tempo di comparsa delle colonie di late-EPCs

E' stato valutato il tempo di comparsa delle cKS-late-EPCs e delle ctr-late-EPCs su fibronectina o collagene. Per tale valutazione sono stati presi in considerazione solo i soggetti che hanno dato origine almeno ad una colonia di late-EPCs. Il tempo di comparsa delle colonie di late-EPCs è indicato come numero di giorni al momento della comparsa a partire dal giorno della semina dei PBMCs.

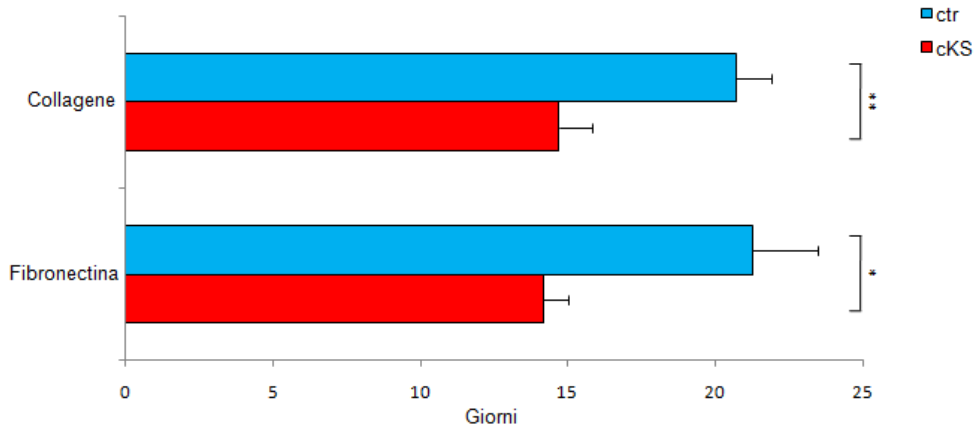


Figura 14: Tempo di comparsa delle colonie di late-EPCs su fibronectina o collagene nei soggetti sani e nei soggetti con cKS. Dati mostrati come media \pm SE. Significatività calcolata con Student T test.

Come mostrato in figura 14, su fibronectina il tempo di comparsa delle colonie di late-EPCs è significativamente minore nei soggetti con cKS rispetto ai soggetti sani (ctr-late-EPCs vs cKS-late-EPCs: $21,37 \pm 2,53$ n=9; $14,17 \pm 0,86$ n=18; $p < 0,05$). Su collagene sono stati ottenuti risultati analoghi, infatti il tempo di comparsa delle colonie di late-EPCs è significativamente minore nei soggetti con cKS rispetto ai soggetti sani (ctr-late-EPCs vs cKS-late-EPCs: $20,69 \pm 1,23$ n=20; $14,7 \pm 1,14$ n=17; $p < 0,001$).

Nei soggetti sani non ci sono differenze nel tempo di comparsa delle colonie di late-EPCs isolate su fibronectina rispetto al tempo di comparsa delle colonie di late-EPCs isolate su collagene (FN vs CL t test: $21,37 \pm 2,53$ n=9; $20,69 \pm 1,23$ n=20; $p = ns$). Risultati analoghi sono stati ottenuti per i soggetti con cKS infatti, non ci sono differenze nel tempo di comparsa delle colonie di late-EPCs isolate su fibronectina rispetto al tempo di comparsa delle colonie di late-EPCs isolate su collagene (FN vs CL: $14,17 \pm 0,86$ n=18; $14,7 \pm 1,14$ n=17; $p = ns$).

E' stato valutato se le differenze permangono indipendentemente dal substrato utilizzato. E' stato osservato che il tempo di comparsa delle colonie di late-EPCs nei controlli sani è significativamente minore che nei soggetti con cKS, indipendentemente dal substrato utilizzato per la semina dei PBMC (ctr-late-EPCs vs cKS-late-EPCs: $20,90 \pm 1,13$ n=29; $14,36 \pm 0,69$ n=55 $p < 0,001$).

Valutate le differenze nel tempo di comparsa delle colonie di late-EPCs tra soggetti sani e soggetti con cKS, sono stati presi in considerazione i soggetti con cKS al fine di valutare se lo stadio e la progressione del tumore influiscono sul tempo di comparsa delle colonie di late-EPCs.

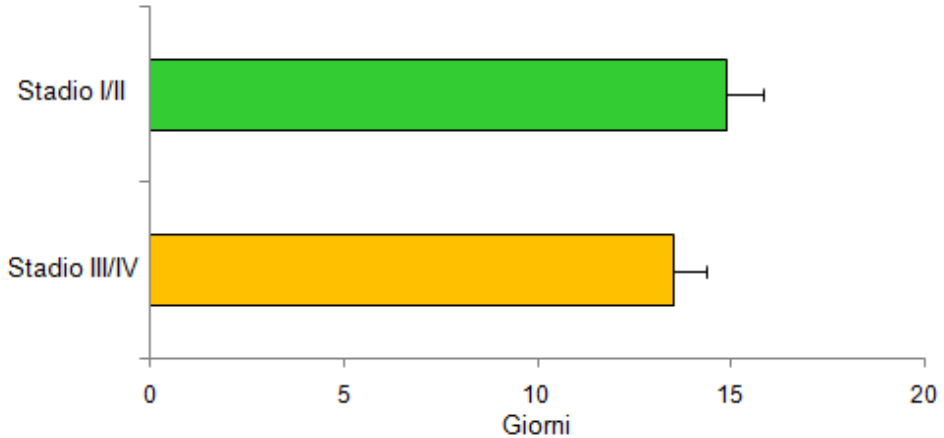


Figura 15: Tempo di comparsa delle colonie di late-EPCs nei soggetti con cKS allo stadio I/II e allo stadio III/IV. Dati mostrati come media \pm SE. Significatività calcolata con Student T test.

Come si osserva in figura 15, il tempo di comparsa delle colonie di late-EPCs isolate dai soggetti con cKS non varia in maniera significativa in base allo stadio della patologia (I/II vs III/IV: 14,88 \pm 0,97; n=21; 13,51 \pm 0,87; n=34 p=ns).

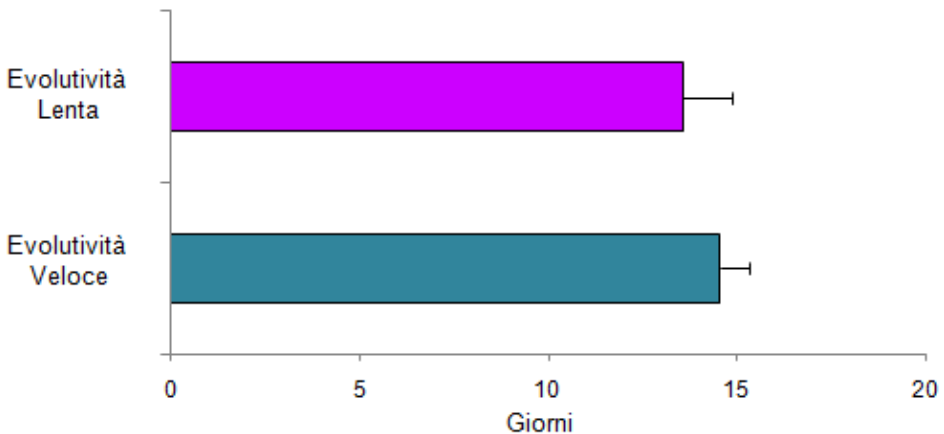


Figura 16: Tempo di comparsa delle colonie di late-EPCs nei soggetti con cKS ad evolutività lenta (A) e ad evolutività veloce (B) Dati mostrati come media \pm SE. Significatività calcolata con Student T test.

Come si osserva in figura 16, non ci sono differenze significative nel tempo di comparsa delle colonie di late-EPCs isolate tra il gruppo di soggetti con cKS a evoluzione lenta e il gruppo dei soggetti con cKS a evoluzione veloce (A vs B: $13,57 \pm 1,29$ n=11; $14,55 \pm 0,8$; n=44 p=ns).

4.2.1.3. Numero di colonie di late-EPCs

E' stato quantificato il numero di colonie di cKS-late-EPCs e di ctr-late-EPCs su fibronectina o collagene al fine di verificare se il substrato di semina influisce sul numero di late-EPCs isolate. Inoltre è stata valutata la presenza di possibili alterazioni nel numero di cKS-late-EPCs rispetto alle ctr-late-EPCs.

Per questa valutazione sono stati presi in considerazione solo i soggetti che hanno dato origine almeno ad una colonia di late-EPCs. Il numero di colonie è stato espresso come numero di colonie per 20×10^6 PBMC seminati.

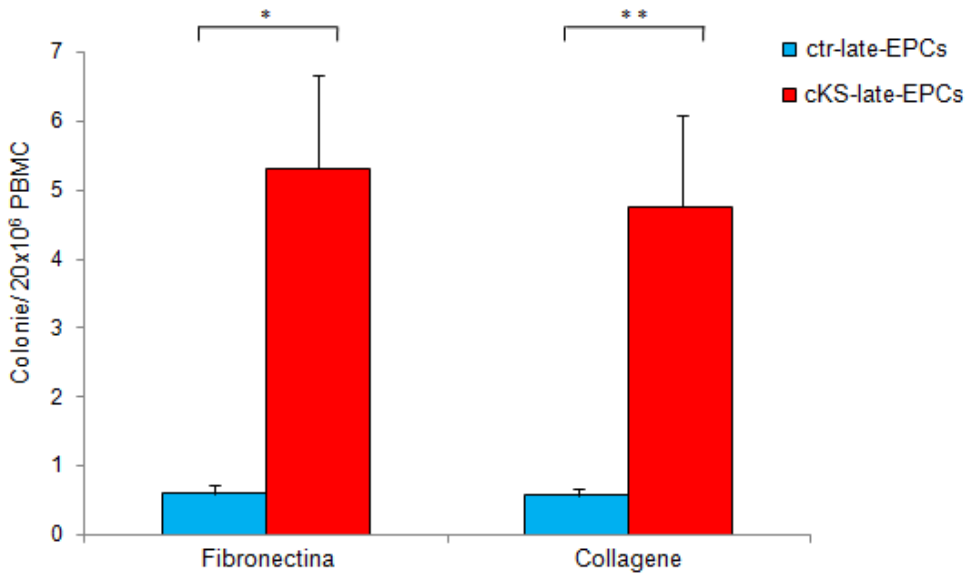


Figura 17: Numero di colonie di late-EPCs/ 20×10^6 PBMC seminati isolate da soggetti sani e soggetti con cKS su fibronectina o collagene. Dati mostrati come media \pm SE. Significatività calcolata con Student T test.

Come si osserva in figura 17, su fibronectina il numero di colonie di late-EPCs isolate nei soggetti con cKS è significativamente maggiore rispetto ai soggetti sani (ctr-late-EPCs vs cKS-late-EPCs: $0,61 \pm 0,13$ n=9; $5,32 \pm 1,33$ n=18; $p < 0,05$). Risultati analoghi sono stati ottenuti su collagene, infatti il numero di colonie di late-EPCs isolate nei soggetti con cKS è significativamente maggiore rispetto ai soggetti sani (ctr-late-EPCs vs cKS-late-EPCs: $0,57 \pm 0,11$ n=20; $4,75 \pm 1,34$ n=17; $p < 0,005$).

Nei soggetti sani non ci sono differenze nel numero di colonie di late-EPCs isolate su fibronectina rispetto al numero di colonie di late-EPCs isolate su collagene (FN vs CL: $0,61 \pm 0,13$ n=9; $0,57 \pm 0,11$ n=20; $p = ns$). Risultati analoghi sono stati ottenuti per i soggetti con cKS, infatti, non ci sono differenze nel numero di colonie di late-EPCs isolate su fibronectina rispetto al numero di colonie di late-EPCs isolate su collagene (FN vs CL: $5,28 \pm 0,93$ n=18; $4,75 \pm 1,34$ n=17; $p = ns$).

I dati sono stati analizzati indipendentemente dal substrato utilizzato. È stato osservato che il numero di colonie di late-EPCs isolate è significativamente maggiore nei soggetti con cKS rispetto ai soggetti sani (ctr-late-EPCs vs cKS-late-EPCs: $0,58 \pm 0,08$ n=29; $5,01 \pm 0,93$ n=35; $p < 0,0001$).

Valutata la differente capacità di dare origine a colonie di late-EPCs tra soggetti con cKS e soggetti sani, sono stati presi in considerazione i soggetti con cKS al fine di valutare se lo stadio e la progressione del tumore influiscono sul numero di colonie di late-EPCs isolate.

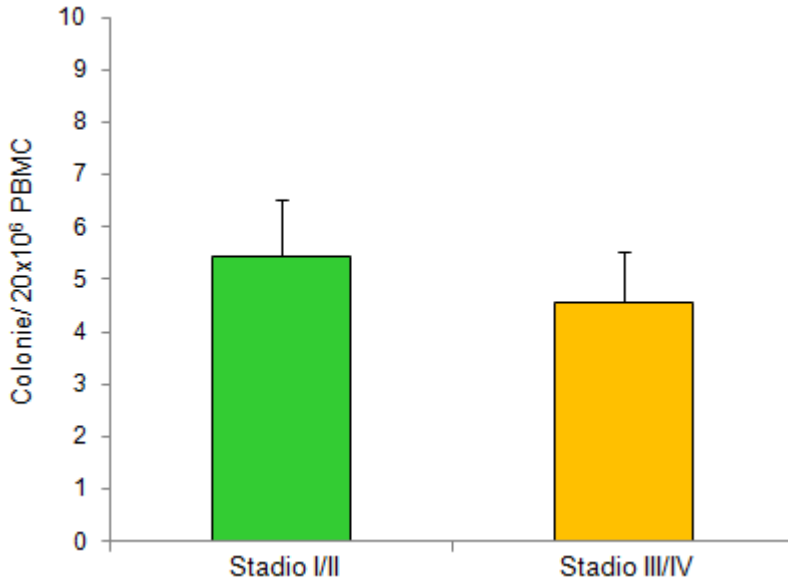


Figura 18: Numero di colonie/20x10⁶ PBMC seminati nei soggetti con cKS allo stadio I/II e allo stadio III/IV. Dati mostrati come media ± SE. Significatività calcolata con Student T test.

I risultati hanno mostrato che il numero di colonie di late-EPCs isolate dai soggetti con cKS non varia in maniera significativa in base allo stadio della patologia (I/II vs III/IV: $5,44 \pm 1,09$ n=34; $4,58 \pm 0,95$ n=21; $p = ns$) (Figura 18).

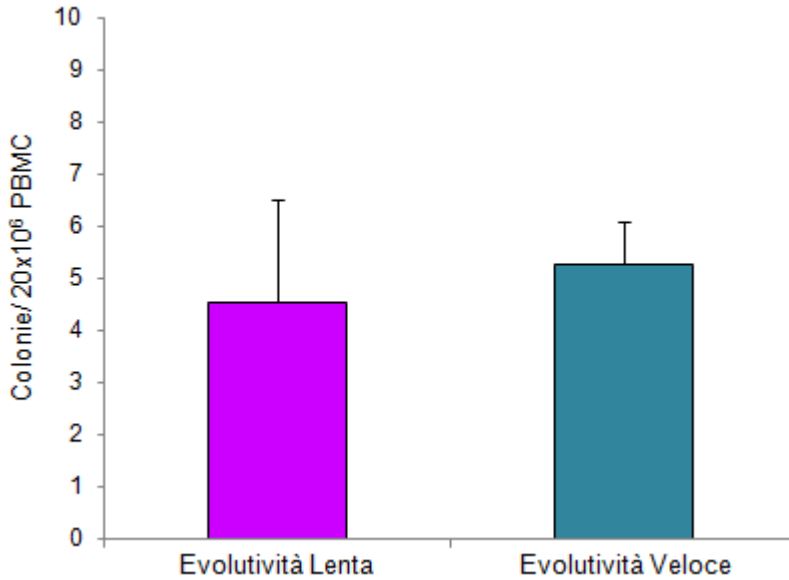


Figura 19: Numero di colonie/20x10⁶ PBMC seminati nei soggetti con cKS con evolutività lenta (A) e con evolutività veloce (B). Dati mostrati come media \pm SE. Significatività calcolata con Student T test.

Come mostrato in figura 19, non sono state osservate differenze nel numero di colonie di late-EPCs isolate tra il gruppo di soggetti con cKS a evoluzione lenta e il gruppo dei soggetti con cKS a evoluzione veloce (A vs B: 4,54 \pm 1,97 n=11; 5,26 \pm 0,82 n=44; p=ns).

4.2.2. Espansione in vitro delle late-EPCs

Una volta isolate, le colonie di late-EPCs possono essere espanse in vitro. Abbiamo quindi voluto comparare la senescenza, la proliferazione e la vitalità delle cKS-late-EPCs con le ctr-late-EPCs.

I risultati ottenuti dalle differenti valutazioni sono stati espressi in funzione del passaggio di coltura invece che dei giorni di coltura poiché la velocità di crescita delle cKS-late-EPCs è maggiore rispetto alla velocità di crescita delle ctr-late-EPCs. Infatti analizzando i vari parametri in funzione dei giorni di coltura avremmo confrontato cellule in condizioni di coltura differenti.

E' stato osservato che la proliferazione cellulare non varia in relazione al tipo di substrato utilizzato. Inoltre è stato osservato che la senescenza, e la vitalità delle late-EPCs non variano quando queste cellule vengono espanse su fibronectina o collagene (dati non mostrati).

Nelle analisi successive è stata confrontata la senescenza, proliferazione e la vitalità delle late-EPCs isolate dai controlli sani e dai soggetti con cKS indipendentemente dal substrato utilizzato per l'isolamento.

4.2.2.1. Senescenza

È stata valutata la senescenza cellulare nelle cKS-late-EPCs e nelle ctr-late-EPCs. La senescenza delle late-EPCs è stata definita come perdita della morfologia fusata e rallentamento della crescita. Quindi è stato registrato a quale passaggio di coltura si trovavano le late-EPCs quando si manifestano tali segni di senescenza.

Al fine di espandere le late-EPCs è necessario che le colonie raggiungano un numero di cellule minimo che possa essere staccato con tripsina e riseminato. Come parametro per la decisione dell'espansione è stata considerata la dimensione della colonia, infatti quando la colonia occupa almeno $\frac{1}{4}$ dell'area di un pozzetto di una multiwell da 2 cm^2 è possibile procedere all'espansione.

E' stato osservato che il 15% delle colonie isolate nei soggetti con cKS e il 30 % delle colonie isolate nei soggetti sani non riesce ad essere espanso in vitro.

Sono state analizzate le colonie che riescono ad essere espanse in vitro e in figura 20 si può osservare che le cKS-late-EPCs raggiungono la senescenza tardivamente rispetto alle ctr-late-EPCs. Infatti il 13% delle cKS-late-EPCs entra in senescenza nel primo passaggio di coltura rispetto al 29% delle ctr-late-EPCs (ctr-late-EPCs vs cKS-late-EPCs: Passaggio 1: $p < 0,005$). Inoltre il 56% delle cKS-late-EPCs entra in senescenza al quinto (o successivo) passaggio rispetto al 28% delle ctr-late-EPCs (ctr-late-EPCs vs cKS-late-EPCs: Passaggio 5: $p < 0,05$).

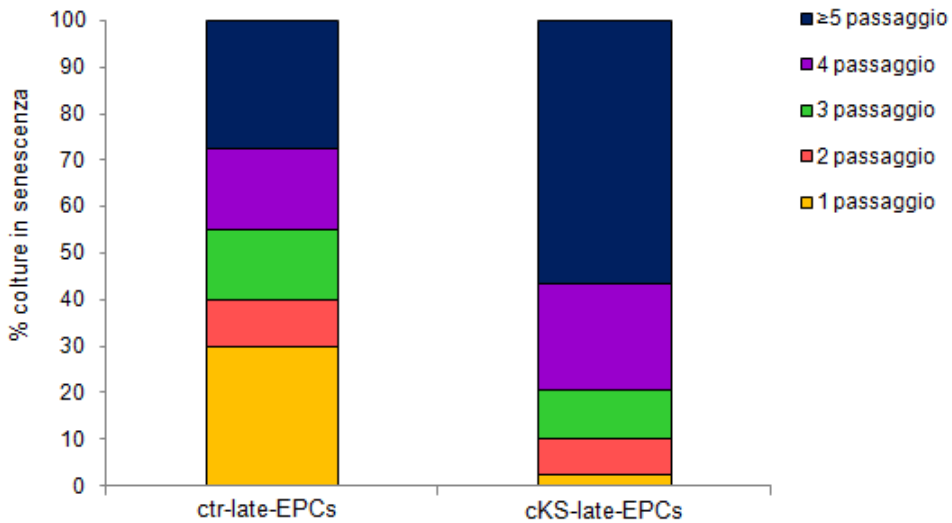


Figura 20: Senescenza delle colonie di late-EPCs isolate da soggetti sani e soggetti con cKS. Percentuale di colonie di late-EPCs che entra in senescenza per ogni passaggio di coltura. Dati mostrati come valore percentuale. Significatività calcolata con Fischer test.

4.2.2.2. Proliferazione

E' stata valutata la presenza di possibili differenze nella capacità proliferativa tra le cKS-late-EPCs e le ctr-late-EPCs espanso fino al quinto passaggio.

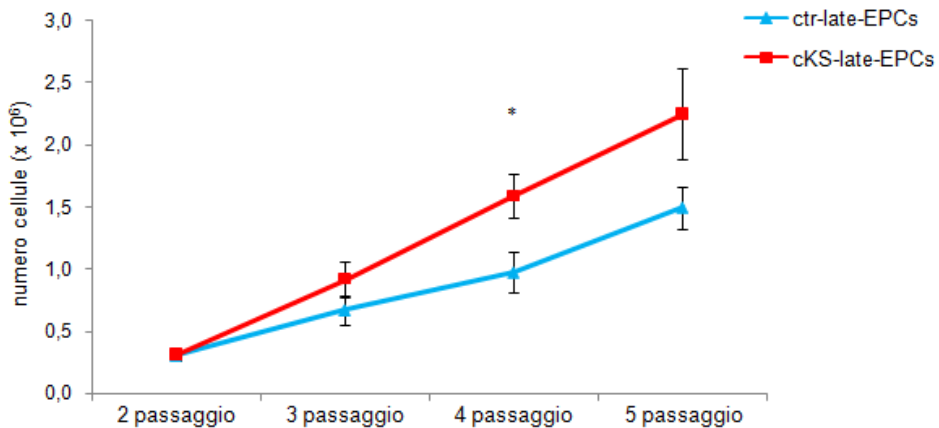


Figura 21: Curve di crescita delle late-EPCs isolate dai soggetti sani e dai soggetti con cKS. Conta del numero di cellule ad ogni passaggio di espansione. Dati mostrati come media \pm SE. Significatività calcolata con Mann-Whitney test.

Dal grafico in figura 21 si può osservare che vi è un incremento della popolazione cellulare fino al quinto passaggio di coltura. Inoltre le cKS-late-EPCs crescono

maggiormente rispetto alle ctr-late-EPCs s isolate dai controlli sani. Infatti la conta delle late-EPCs, ad ogni passaggio di espansione, è maggiore nei soggetti con cKS rispetto ai soggetti sani (ctr-late-EPCs vs cKS-late-EPCs: n=6; cKS n=8; Passaggio 4 $p<0,05$).

4.2.2.3. Vitalità cellulare

E' stata valutata la presenza di possibili differenze nella vitalità tra le cKS-late-EPCs e le ctr-late-EPCs espanso fino al quinto passaggio.

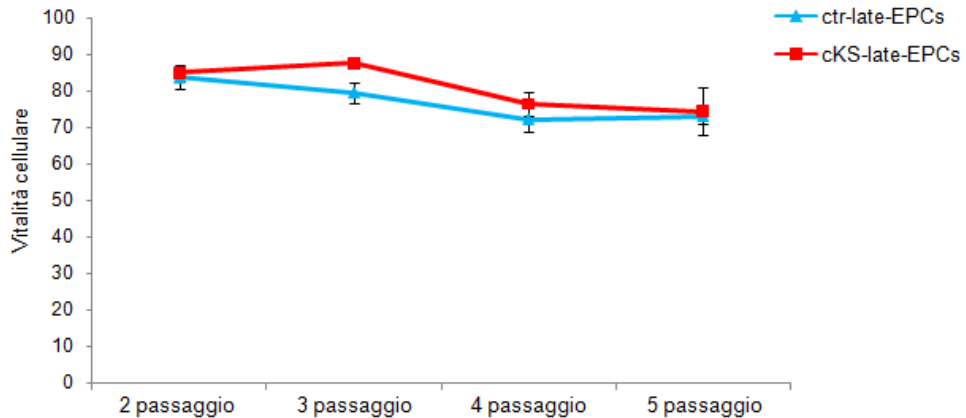


Figura 22: Vitalità cellulare valutata con Trypan Blue in soggetti sani e soggetti con cKS. Valore della vitalità cellule ad ogni passaggio di espansione. Dati mostrati come media \pm SE. Significatività calcolata con Mann-Whitney test.

I risultati ottenuti indicano che non sono presenti differenze significative nella percentuale di cellule vitali tra le cKS-late-EPCs e le ctr-late-EPCs (ctr-late-EPCs vs cKS-late-EPCs: n=6; n=8; Passaggio 3 $p<0,05$) (Figura 22).

4.2.3. Produzione di citochine

Al fine di valutare se le cKS-late-EPCs e le ctr-late-EPCs hanno una diversa produzione di citochine, è stata dosata la quantità di IL-6, IFN α , TNF α e VEGF nei surnatanti di coltura.

Il dosaggio è stato effettuato nei surnatanti di coltura a partire dal secondo passaggio, dopo raccolta e filtrazione del surnatante, utilizzando una metodica ELISA.

Come mostrato in figura 23, la produzione di IL-6 è maggiore nelle cKS-late-EPCs rispetto alle ctr-late-EPCs al quarto ed al quinto passaggio di coltura (ctr-late-EPCs vs cKS-late-EPCs: n=3, n=5; Passaggio 5 $p<0,05$).

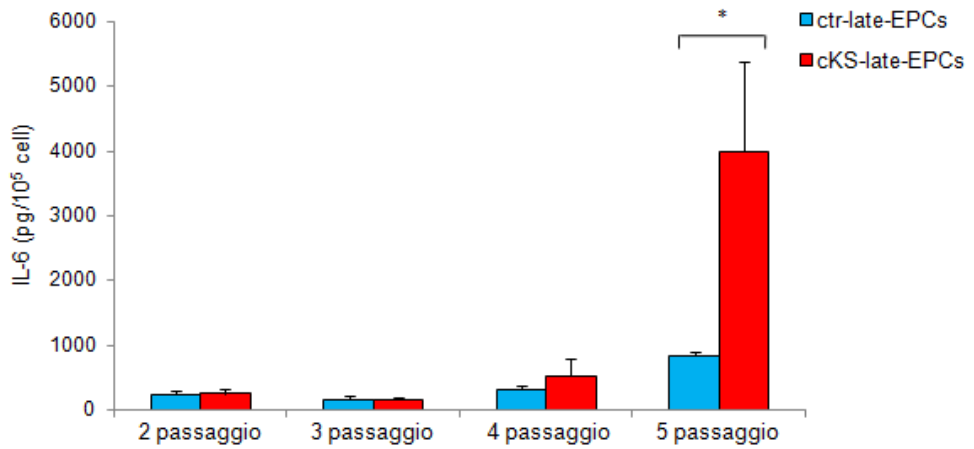


Figura 23: Produzione di IL-6 (pg/10⁶ cell) delle late-EPCs isolate dai controlli sani e dai soggetti con cKS. Dati mostrati come media \pm SE. Significatività calcolata con Mann-Whitney test.

TNF α , IFN γ , VEGF non sono dosabili nel surnatante di coltura delle cKS-late-EPCs e delle ctr-late-EPCs.

4.3. Quantificazione dell'infezione da HHV-8 nelle late-EPCs dei soggetti con cKS

È stata valutata la presenza dell'infezione da HHV-8 nelle cKS-late EPCs mediante la marcatura della proteina di latenza LANA la cui espressione è necessaria perché si stabilisca un'infezione latente all'interno della cellula ospite ed è stata calcolata la percentuale di cellule infettate.

4.3.1. Valutazione dell'espressione della proteina virale di latenza LANA

Sono stati descritti numerosi metodi per la visualizzazione di LANA mediante metodiche di immunofluorescenza; pertanto è stato necessario identificare le condizioni di marcatura che consentissero la visualizzazione della proteina LANA nel nostro modello sperimentale.

È stato osservato che le condizioni di marcatura sono importanti per la visualizzazione della proteina nelle cKS-late-EPCs, infatti per la visualizzazione di LANA è necessaria una incubazione overnight con l'anticorpo primario.

Abbiamo utilizzato come controllo positivo per la presenza di LANA una linea cellulare di linfoma umano stabilmente infettata da HHV-8, BCBL-1, che esprime LANA ad alti livelli. In figura 24 si può osservare il caratteristico pattern intranucleare della proteina LANA nelle BCBL-1.

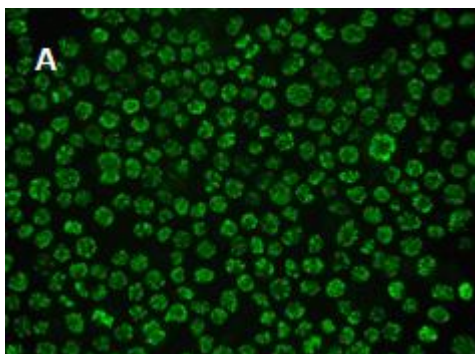


Figura 24: Immunofluorescenza per l'espressione della proteina LANA nelle BCBL-1. Le BCBL-1 sono stabilmente infettate da HHV-8 ed esprimono numerose copie di LANA all'interno del nucleo. Marcatura LANA (verde). Ingrandimento 40x.

Nelle cKS-late-EPCs è stata osservata l'espressione della proteina LANA (Figura 25). L'espressione di LANA è a livelli inferiori rispetto alle BCBL-1. La percentuale di cellule infettate varia tra le singole colture di late-EPCs tra il 5% e il 30% ed è molto variabile da una coltura all'altra.

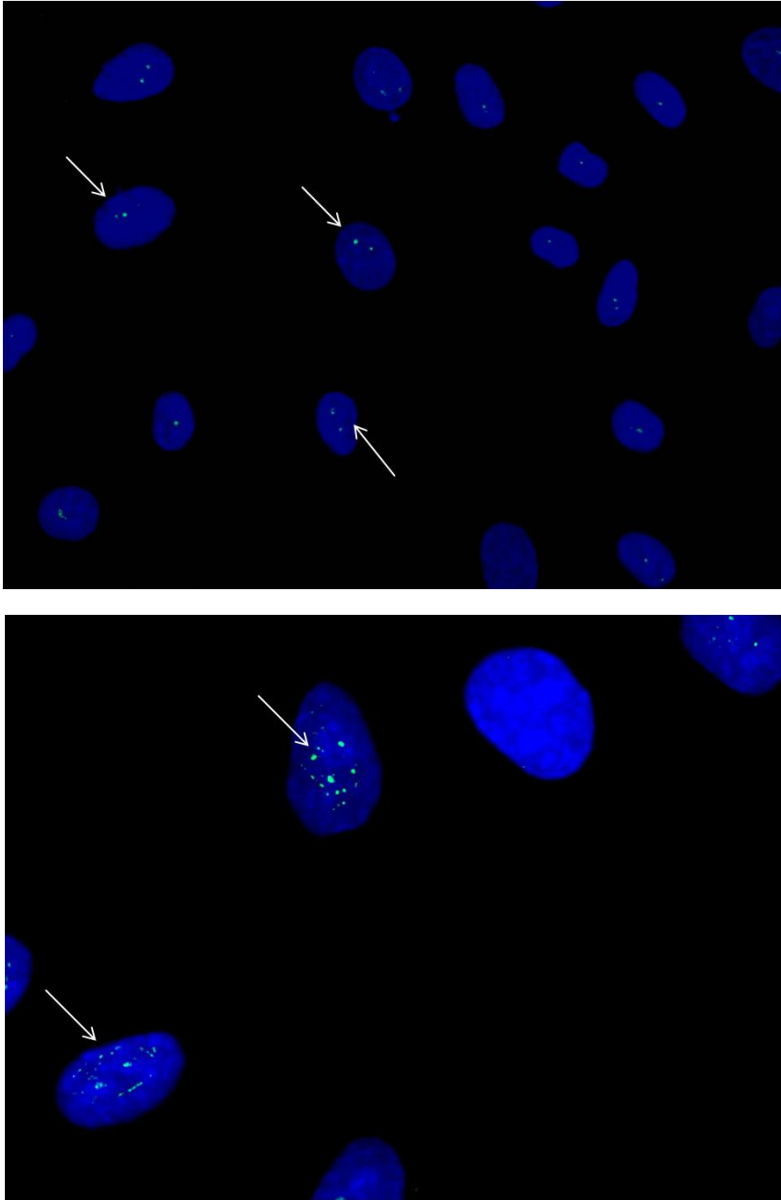


Figura 25: Immunofluorescenza per l' espressione della proteina LANA nelle cKS-late-EPCs. Le cKS-late-EPCs sono infettate da HHV-8 ed esprimono un basso numero di copie di LANA all'interno del nucleo. Nella stessa popolazione cellulare si osservano cellule che portano l'espressione di LANA e cellule non esprimenti la proteina. (A) Ingrandimento 40x (B) ingrandimento 100x. Merge DAPI (blu)LANA (verde).

4.4. Infettabilità *in vitro* dei progenitori endoteliali con HHV-8

E' stata valutata la capacità delle ctr-late-EPCs di essere infettate *in vitro* con HHV-8 e la capacità di queste cellule di sostenere il programma di infezione latente e litica virale.

4.4.1. Valutazione della percentuale di cellule infettate

Le ctr-late-EPCs possono essere infettate *in vitro* infatti in figura 26B, si può osservare l'espressione di LANA nelle ctr-late-EPCs HHV-8 infette. Come controllo dell'avvenuta infezione abbiamo utilizzato una linea endoteliale di microcircolo (HMEC) nota per essere in grado di sostenere l'infezione da HHV-8 (Figura 26A).

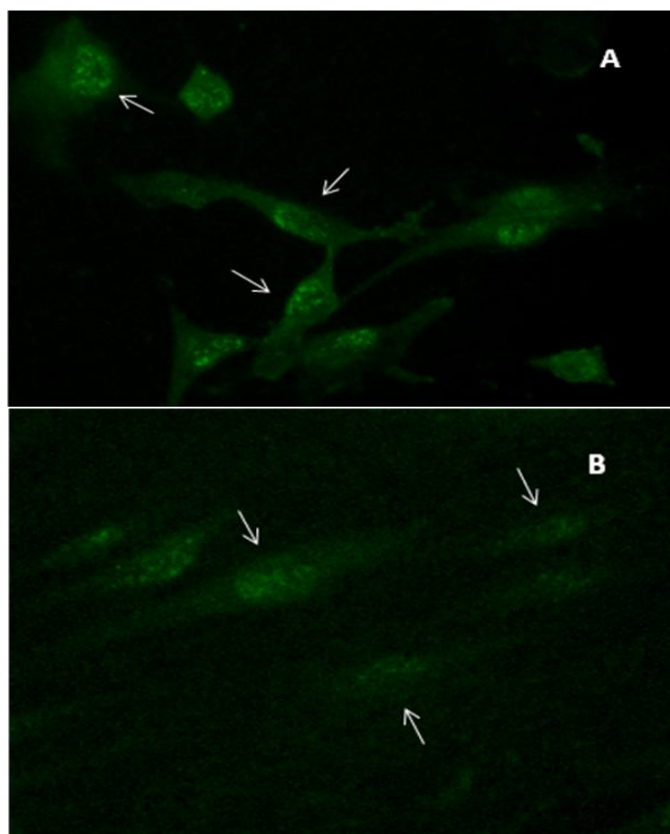


Figura 26: Immunofluorescenza per l'espressione della proteina LANA nelle HMEC HHV8-infette (A) e nelle ctr-late-EPC HHV-8 infette (B). Nella stessa popolazione cellulare si osservano cellule esprimenti LANA e cellule non esprimenti la proteina. Marcatura LANA (verde). Ingrandimento 40x.

La presenza di LANA è stata osservata già un giorno dopo l'infezione. LANA è espressa da un numero di cellule che varia dal 10 al 30% nelle ctr-late-EPC HHV-8 infette. La percentuale di cellule infettate aumenta fino al 30-50%, 9

giorni dopo l'infezione, risultati che sono analoghi a quelli ottenuti sulle HMEC HHV-8 infette.

4.4.2. Valutazione della persistenza dell'infezione mediante PCR

I surnatanti delle colture di ctr-late-EPCs HHV-8 infette sono stati conservati per verificare la presenza ed il mantenimento dell'infezione *in vitro*. I surnatanti sono stati prelevati a tempi successivi sino al termine della coltura. Per valutare la persistenza dell'infezione nelle ctr-late-EPCs HHV-8 infette in coltura, è stata utilizzata una metodica di PCR quantitativa.

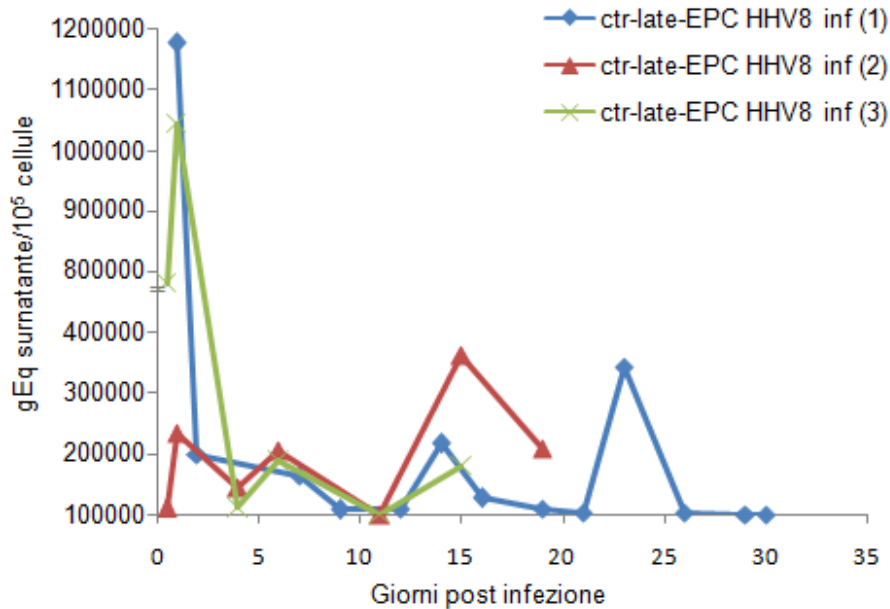


Figura 27: Quantificazione del genoma virale di HHV-8 nel surnatante di coltura delle ctr-late-EPC HHV-8 infette a tempi successivi di coltura. Dati ottenuti mediante quantificazione del genoma di HHV-8 con Real Time PCR.

Dalla figura 27 si può osservare la presenza del genoma virale nel surnatante di coltura delle ctr-late-EPCs HHV-8 infette già 1 giorno dopo l'infezione. Il genoma virale permane per tutto il tempo di mantenimento in coltura. E' stato osservato che i livelli dei genomi virali sono variabili all'interno della coltura di ctr-late-EPCs HHV-8 infette.

I livelli dei genomi virali sono stati valutati in parallelo nel surnatante di coltura e nel DNA estratto dalle cellule. Dalla figura 28 si può osservare il confronto tra il numero di genomi virali presenti nel surnatante di coltura delle ctr-late-EPCHHV-8 infette e il numero di genomi presenti nelle cellule. Il numero di genomi virali presenti nelle cellule è superiore rispetto al numero di genomi virali che si ritrovano nel surnatante di coltura.

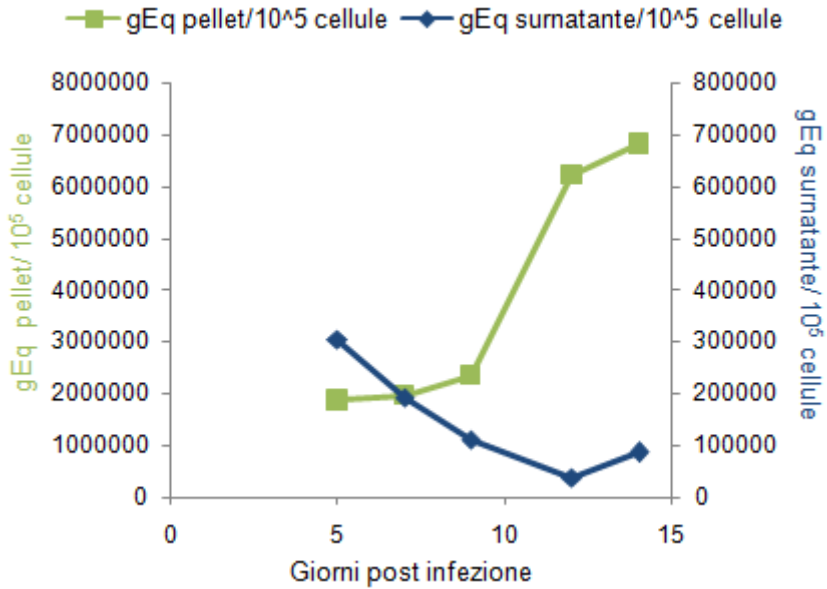


Figura 28: Quantificazione del genoma virale di HHV-8 nel surnatante di coltura delle ctr-late-EPC HHV-8 infette e nel pellet cellulare a tempi successivi di coltura. Dati ottenuti mediante quantificazione del genoma di HHV-8 con Real-Time PCR.

Oltre alle late-EPC che rappresentano cellule allo stadio di progenitore, sono state infettate anche le HMEC ed è stato quantificato il genoma virale nel surnatante di coltura.

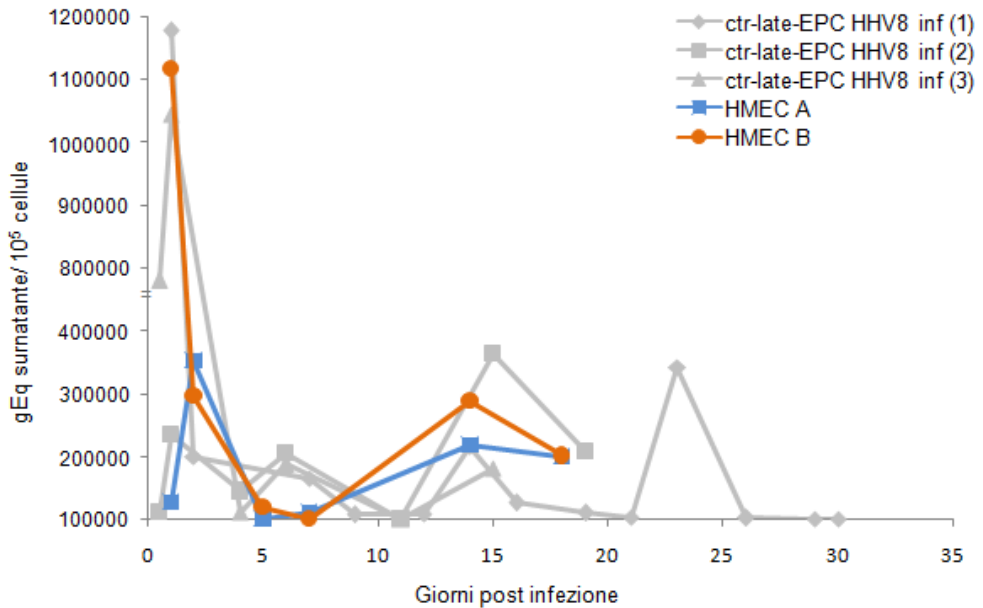


Figura 29: Quantificazione del genoma virale di HHV-8 nel surnatante di coltura delle HMEC HHV-8 infette a tempi successivi di coltura. Dati ottenuti mediante quantificazione del genoma di HHV-8 con Real Time PCR.

Dalla figura 29 si può osservare che i livelli dei genomi virali nel surnatante di coltura delle ctr-late-EPCs HHV-8 infette sono simili a quelli delle HMEC HHV-8 infette.

4.4.3. Effetti dell'infezione *in vitro* sulla biologia delle late-EPC

Sono stati valutati gli effetti dell'infezione *in vitro* da HHV-8 sulla biologia delle late-EPCs.

4.4.3.1. Effetti sulla morfologia

La morfologia delle late-EPC è stata valutata mediante osservazione al microscopio ottico 1 giorno dopo l'infezione e per tutto il tempo di mantenimento in coltura.

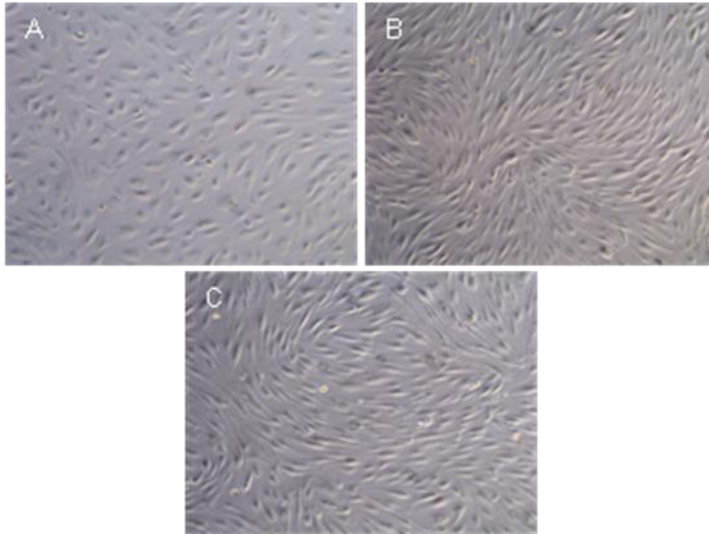


Figura 30: Induzione della morfologia fusata nelle late-EPC in coltura 1 giorno dopo l'infezione con HHV-8. Immagini rappresentative acquisite al microscopio ottico a contrasto di fase: (A) ctr-late-EPCs HHV-8 non infette (B) ctr-late-EPCs HHV-8 infette (C) ctr-late-EPCs infettate con HHV-8 inattivato con UV (ingrandimento 10x).

In figura 30 si può osservare che le late-EPC infettate con HHV-8 vivo e HHV8 inattivato mediante trattamento con UV acquisiscono una morfologia spindle già 1 giorno dopo l'infezione.

La morfologia spindle è solo un evento acuto dell'infezione infatti col progredire dell'espansione *in vitro* questa morfologia viene persa.

4.4.3.2. Effetti sulla vitalità e proliferazione cellulare

E' stata valutata la presenza di possibili differenze nella capacità proliferativa tra le ctr-late-EPCs HHV-8 infette e le ctr-late-EPCs HHV-8 non infette. Le ctr-late-EPCs sono state infettate con differenti concentrazioni virali (50x corrisponde a 7×10^6 GeEq/mL) ed è stata valutata la proliferazione mediante colorazione con cristal violetto.

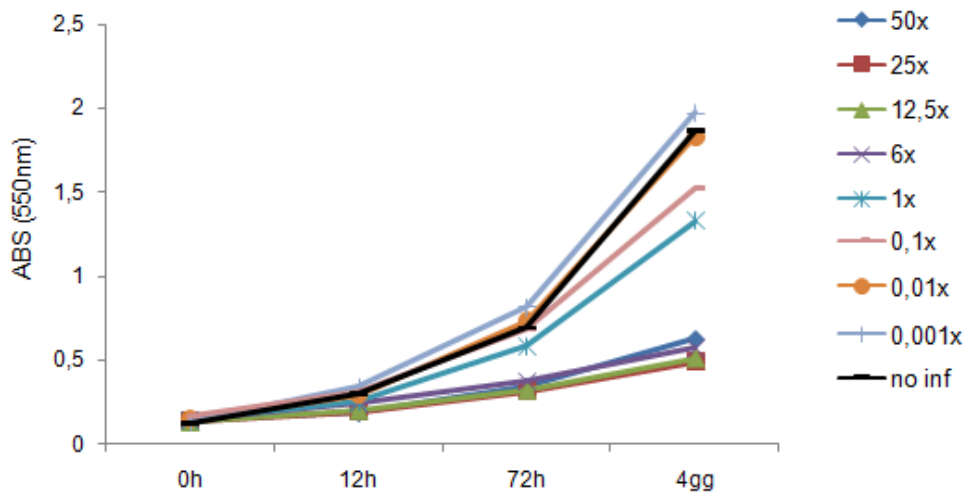


Figura 31: Proliferazione ctr-late-EPCs HHV-8 infettate con diverse concentrazioni di virus (grafico rappresentativo di 1 su 3 esperimenti). Dati indicati come valore di assorbanza del cristal violetto a 550nm.

Come mostrato in figura 31, l'infezione in vitro induce una diminuzione della proliferazione cellulare che è dipendente dalla quantità di virus utilizzata per l'infezione.

Per i successivi esperimenti è stata presa in considerazione solamente l'infezione con lo 0,01x di virus.

4.4.3.3. Effetti sullo stato di attivazione

E' stata valutata l'espressione di marcatori cellulari di attivazione espressi sulla superficie delle late-EPC allo scopo di verificare se vi sono differenze nello stato di attivazione tra le ctr-late-EPCs HHV-8 infette e le ctr-late-EPCs HHV-8 non infette 1 giorno dopo l'infezione e 9 giorni dopo l'infezione.

I marcatori di attivazione considerati sono le molecole di adesione ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106) e e-selectina (CD62e); le integrine $\alpha 3$ (CD49c) e $\alpha \beta 3$ (CD51/CD61).

In figura 32 si può osservare l'intensità media di fluorescenza (MFI) dei marcatori di attivazione 1 giorno dopo l'infezione. L'MFI di ICAM-1, VCAM-1 e $\alpha \beta 3$ è significativamente più elevata nelle ctr-late-EPCs HHV-8 infette rispetto alle ctr-late-EPCs HHV-8 non infette (HHV-8 non infetto vs HHV-8 infetto: ICAM-1: 13884 ± 3448 vs 26514 ± 4734 ; $p=0,05$; VCAM-1: 7382 ± 2858 vs 11593 ± 3167 $p=0,05$. $\alpha \beta 3$: 7963 ± 1707 vs 15557 ± 2746 ; $p=0,05$) mentre l' MFI di e-selectina e di $\alpha 3$ non varia significativamente nelle late-EPC HHV-8 infette rispetto alle late-EPC HHV-8 non infette (HHV-8 non infetto vs HHV-8 infetto: e-selectina 6617 ± 4191 vs 10026 ± 5253 ; $p=ns$. $\alpha 3$: 24365 ± 7531 vs 27081 ± 10060 $p=ns$).

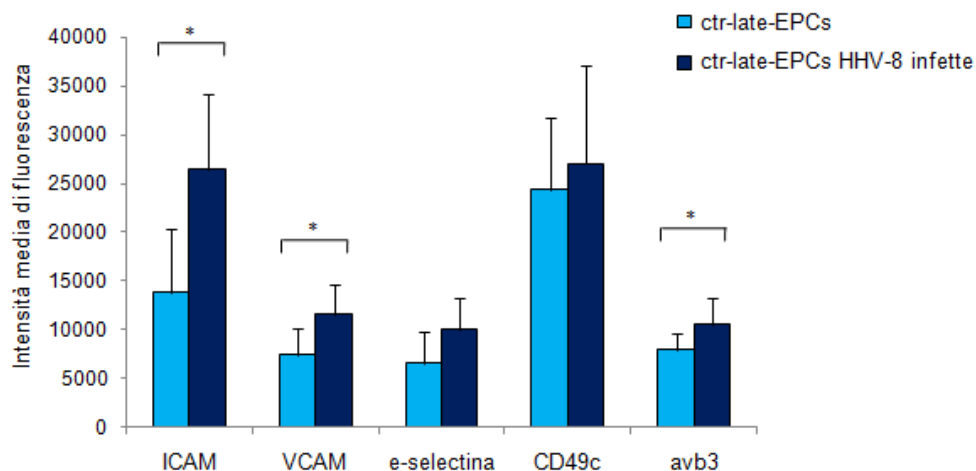


Figura 32: Intensità media di fluorescenza (MFI) dei marcatori di attivazione considerati sulle late-EPC HHV-8 infette e HHV-8 non infette 1 giorno dopo l'infezione. Dati mostrati come media \pm SE (n=3). Significatività calcolata con Wilcoxon test.

In figura 33 si osserva l'MFI dei marcatori di attivazione 9 giorni dopo l'infezione. L'MFI di ICAM-1, VCAM-1 e $\alpha\beta 3$ è significativamente più elevata nelle ctr-late-EPCs HHV-8 infette rispetto alle ctr-late-EPCs HHV-8 non infette (HHV-8 non infetto vs HHV-8 infetto: ICAM-1: 24300 \pm 3375 vs 31875 \pm 3957; p=0,05. VCAM-1: 5643 \pm 3253 vs 15075 \pm 2945; p=0,05. $\alpha\beta 3$: 6610 \pm 1884 vs 9981 \pm 2107; p=0,05) mentre l'MFI di e-selectina e $\alpha 3$ non varia significativamente nelle ctr-late-EPCs HHV-8 infette rispetto alle ctr-late-EPCs HHV-8 non infette (HHV-8 non infetto vs HHV-8 infetto: e-selectina: 5356 \pm 3139; 6981 \pm 3240; p=ns; $\alpha 3$: 26514 \pm 7481; 28612 \pm 6156; p=ns).

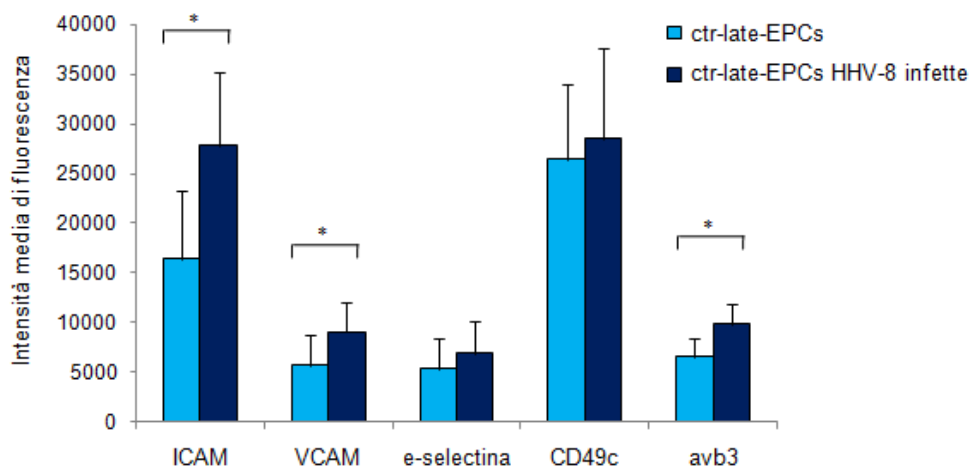


Figura 33: Intensità media di fluorescenza dei marcatori di attivazione considerati sulle late-EPC HHV-8 infette e HHV-8 non infette 9 giorni dopo l'infezione. Dati mostrati come media \pm SE (n=3). Significatività calcolata con Wilcoxon test.

Non si osservano differenze nel confronto tra lo stato di attivazione delle ctr-late-EPCs HHV-8 infette e delle ctr-late-EPCs HHV-8 non infette 1 giorno dopo l'infezione e 9 giorni dopo l'infezione.

4.4.3.4. Angiogenesi *in vitro*

E' stata valutata la capacità delle ctr-late-EPCs HHV-8 infette e delle ctr-late-EPCs HHV-8 non infette di dare origine a strutture simil-vascolari tramite un saggio di angiogenesi *in vitro* per verificare se l'infezione con HHV-8 ha effetti sulle caratteristiche funzionali delle late-EPC.

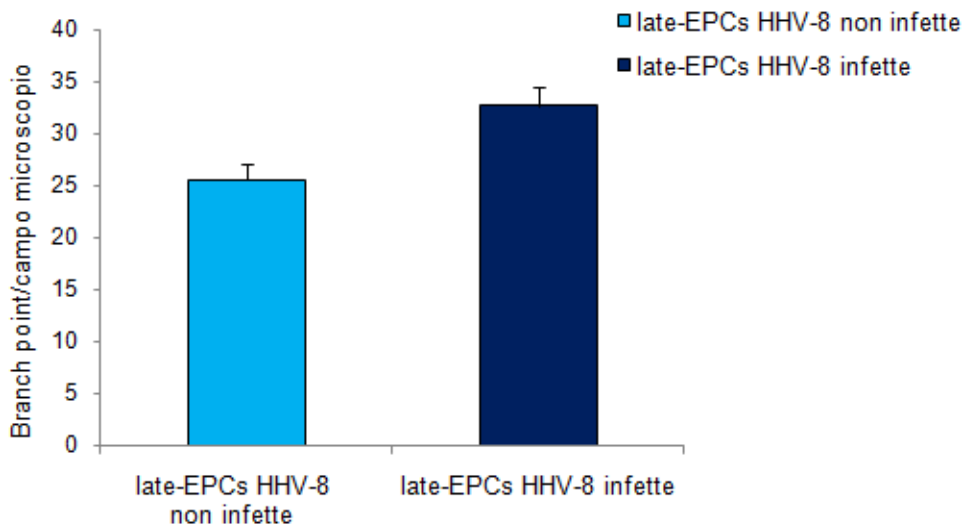


Figura 34: Media del numero di branch point formati dalle late-EPC HHV-8 infette e HHV-8 non infette 1 giorno dopo l'infezione e 9 giorni dopo l'infezione. La formazione dei tubuli è stata misurata contando il numero di ramificazioni, branch point, che danno origine ai vasi. La quantificazione è stata fatta su 5 campi microscopici scelti casualmente (ingrandimento 4x). Dati mostrati come media \pm SE (n=3). Significatività calcolata con Wilcoxon test.

Un giorno dopo l'infezione il numero di branch-point formati dalle ctr-late-EPCs HHV-8 infette non varia significativamente rispetto al numero di branch-point formati dalle ctr-late-EPCs HHV-8 non infette (HHV-8 non infetto vs HHV-8 infetto: 14,22 \pm 1,5 vs p=ns 18,22 \pm 1,7; p=ns) (figura 34).

9 giorni dopo l'infezione il numero di branch-point formati dalle ctr-late-EPCs HHV-8 infette non varia significativamente rispetto al numero di branch-point formati dalle ctr-late-EPCs HHV-8 non infette (HHV-8 non infetto vs HHV-8 infetto 15,52 \pm 1,6 vs 19,43 \pm 1,9; p=ns, dati non mostrati).

5. DISCUSSIONE

Le EPCs sono una popolazione, di origine midollare identificata all'interno della popolazione delle cellule CD34+, in grado di sostenere il processo angiogenetico in condizioni fisiologiche e patologiche [190]. E' stato dimostrato che dalle cellule mononucleate da sangue periferico (PBMC) coltivate in condizioni che stimolano il differenziamento endoteliale possono derivare due differenti popolazioni con caratteristiche fenotipiche e funzionali differenti. La prima popolazione ottenuta dopo 4-9 giorni di coltura, chiamata early-EPCs, è di derivazione monocitaria ed esprime i marcatori tipici delle cellule endoteliali mature in associazione con il marcatore ematopoietico CD45 e monocitario CD14. La seconda popolazione ottenuta dopo 7-21 giorni di coltura, chiamata late-EPCs, manca totalmente dell'espressione del CD14 e del CD45 e presenta un profilo strettamente endoteliale, con espressione di e-NOS e di caveolina-1, che risultano invece non rilevabili nella popolazione di derivazione monocitaria. Le late-EPCs si caratterizzano per l'elevato potenziale proliferativo [185] e per la capacità di promuovere il processo di angiogenesi *in vitro* ed *in vivo* [191; 192].

In letteratura sono noti diversi protocolli per l'isolamento delle late-EPCs e l'esiguo numero di questi progenitori in circolo rende difficile isolare *in vitro* questa popolazione. I vari protocolli differiscono per alcuni parametri fondamentali tra cui: il campione d'origine, la densità di semina dei PBMC, la percentuale di siero nel terreno di coltura, la tempistica del primo cambio di terreno. Inoltre i PBMC vengono seminati su collagene o fibronectina senza una chiara indicazione delle differenti proprietà delle due matrici.

Kalka et. al hanno dimostrato che è possibile isolare questi progenitori seminando i PBMC su fibronectina ed effettuando due cambi completi del medium di coltura al giorno 4 e 7 dopo la semina [151]. Gulati et al. hanno dimostrato che effettuando il cambio del medium di coltura per i primi sette giorni dopo la semina dei PBMC l'efficienza di generazione delle late-EPCs da individui sani è passata dal 10% al 100% dei casi [160]. Il protocollo descritto da Ingram et al. prevede la semina dei PBMC su collagene di tipo I e la rimozione dopo 24 ore dalla semina delle cellule non aderenti, ed il cambio del medium di coltura per i primi sette giorni successivi [162].

Poiché l'identità e il fenotipo delle cellule che danno origine alle late-EPCs *in vitro* non è nota, è possibile che il substrato utilizzato per l'adesione possa influire sull'efficienza di isolamento.

Quindi, oltre ad ottimizzare il protocollo di isolamento delle late-EPCs in controlli sani, abbiamo valutato se esiste una differente frequenza di isolamento delle late-EPCs sui substrati di fibronectina e collagene.

Abbiamo isolato i PBMC da buffy coat e da sangue periferico fresco eparinato ed abbiamo osservato che da buffy coat vengono isolate colonie di late-EPCs nel 5% dei campioni seminati. Questo dato è in disaccordo con quanto riportato in uno studio condotto da Fuchs et al. [2006] nel quale le late-EPCs sono state isolate da buffy coat nel 100% dei soggetti in analisi. È possibile che questa differenza nell'efficienza di isolamento delle colonie di late-EPCs sia almeno in parte attribuibile alle differenti procedure di preparazione dei buffy coat.

Invece abbiamo osservato che da sangue periferico fresco eparinato vengono isolate colonie di late-EPCs nella quasi totalità dei campioni seminati. Poiché l'efficienza di isolamento delle colonie di late-EPCs è maggiore nel sangue

periferico fresco rispetto al buffy coat, abbiamo scelto di utilizzare il sangue periferico fresco eparinato come campione d'origine.

Considerando la densità di semina dei PBMC, la percentuale di siero nel terreno di coltura, la tempistica del primo cambio di terreno e il substrato utilizzato per la semina dei PBMC, abbiamo seminato i PBMC in tutte le diverse condizioni di coltura e abbiamo osservato che le colonie di late-EPCs compaiono quando i PBMC sono seminati, sia su fibronectina che su collagene, alla densità di $2,5 \times 10^6$ cellule/cm², in terreno di coltura addizionato del 5% di siero e il primo cambio di terreno viene effettuato il giorno successivo alla semina dei PBMC. Probabilmente queste potrebbero essere le condizioni sperimentali che, nel nostro caso, ci permettono di rimuovere le cellule non adese consentendo la proliferazione delle late-EPCs.

Abbiamo osservato che le colonie di late-EPCs possono essere isolate sia su fibronectina che su collagene. Questo è in accordo con quanto riportato in letteratura [164; 163] inoltre, abbiamo osservato che il substrato di semina dei PBMC influisce sull'isolamento delle colonie di late-EPCs. Infatti, su collagene la frequenza di isolamento di colonie di late-EPCs è maggiore rispetto alla fibronectina nei soggetti sani. Questa diversa frequenza di isolamento delle late-EPCs sui due substrati potrebbe essere dovuta alle molecole di adesione espresse dalle cellule, la cui identità non è nota, che danno origine alle colonie di late-EPCs *in vitro*.

Il protocollo ottimizzato non ci ha comunque permesso di isolare le colonie di late-EPCs in tutti i campioni d'origine. Probabilmente la frequenza in circolo delle cellule, la cui identità non è nota, che danno origine alle late-EPCs *in vitro* potrebbe influire sull'isolamento. Il numero di cellule presenti in circolo potrebbe essere molto basso, infatti *in vitro* viene isolata circa una colonia di late-EPCs ogni 20 ml di sangue, nei soggetti sani [163].

Il Sarcoma di Kaposi (KS) è una malattia angioproliferativa con interessamento cutaneo e viscerale, caratterizzata da un'intensa proliferazione di *spindle cells* che rappresentano l'elemento tipico delle lesioni sarcomatose. Diversi studi suggeriscono che le *spindle cells* sono cellule di origine endoteliale. Abbiamo recentemente dimostrato che i soggetti con KS classico (cKS) hanno elevati livelli di progenitori endoteliali circolanti, identificate come CD45^{low}/CD34⁺/KDR⁺, rispetto ai controlli sani [187]. Inoltre, abbiamo dimostrato che late-EPCs isolate da soggetti con cKS sono HHV-8 infette e sono in grado di sostenere persistentemente l'infezione virale potendo quindi agire come possibile reservoir virale [188]. Queste osservazioni suggeriscono che le EPCs possano avere un ruolo importante nella patogenesi del KS e che possano essere i precursori putativi delle *spindle cells*. Pertanto, in questo studio abbiamo confrontato le late-EPCs isolate dai soggetti con cKS con le late-EPCs isolate dai soggetti sani. Inoltre, abbiamo isolato le colonie di late-EPCs su fibronectina e collagene ipotizzando un differente comportamento delle late-EPCs dei soggetti con cKS rispetto alle late-EPCs dei soggetti sani.

Le cellule isolate da ogni soggetto hanno tutti i requisiti per essere definite late-EPCs. I nostri risultati indicano che le late-EPCs in coltura hanno una morfologia fusata, alti livelli di espressione dei marcatori di superficie che caratterizzano questi progenitori: CD31, CD105, CD54, KDR, CD146 ed esprimono a bassa intensità

anche l'antigene staminale CD34. Sono in grado di incorporare diIAc-LDL, di legare la lectina ULEX europaeus-1, ed esprimono molecole tipicamente endoteliali come e-NOS, caveolina-1 e il fattore di von Willebrand. La mancata espressione dei marcatori CD14 e CD45 permette di escludere che le nostre cellule appartengano alla linea monocitica-macrofagica.

In fase di isolamento, la frequenza dei soggetti che hanno dato origine ad almeno una colonia di late-EPCs varia tra pazienti con cKS e controlli sani ed è sensibile al substrato utilizzato per la semina dei PBMC. Infatti, nei soggetti sani la frequenza di soggetti che hanno dato origine ad almeno una colonia di late-EPCs è maggiore su collagene rispetto alla fibronectina. Questo dato conferma quanto osservato anche in fase di ottimizzazione del metodo. Nei soggetti con cKS la frequenza di soggetti che hanno dato origine ad almeno una colonia di late-EPCs non è influenzata dal substrato utilizzato per la semina dei PBMC. Probabilmente nei soggetti con cKS è possibile che le cellule, la cui identità non è nota, che danno origine alle late-EPCs *in vitro* possano esprimere molecole di adesione che permettono di aderire ad entrambi i substrati.

Inoltre, su fibronectina la frequenza di soggetti che hanno dato origine ad almeno una colonia di late-EPCs è maggiore nei soggetti con cKS rispetto ai soggetti sani, mentre su collagene la frequenza di soggetti che hanno dato origine ad almeno una colonia di late-EPCs nei soggetti con cKS è simile a quella nei soggetti sani. Questo diverso comportamento potrebbe essere dovuto alla diversa espressione delle molecole di adesione sulle cellule, la cui identità non è nota, che danno origine alle late-EPCs *in vitro*, nei soggetti con cKS e nei soggetti sani. In precedenti esperimenti abbiamo osservato che le late-EPCs di soggetti sani esprimono le integrine $\alpha v\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha v\beta 5$ a differente intensità ma rimane da chiarire se nelle late-EPCs di soggetti con cKS siano presenti variazioni nell'espressione di tali integrine. Studi recenti dimostrano che le late-EPCs di soggetti con coronaropatia presentano una diversa espressione delle integrine $\alpha v\beta 3$ e $\alpha 5\beta 1$ rispetto alle late-EPCs di soggetti sani [193].

L'analisi del tempo di comparsa delle colonie di late-EPCs indica che le colonie di late-EPCs dei soggetti con cKS compaiono *in vitro* precocemente rispetto alle colonie di late-EPCs dei soggetti sani, sia su fibronectina che su collagene. È possibile che la velocità di crescita delle cellule influenzi il tempo di comparsa delle colonie, infatti le late-EPCs vengono identificate mediante osservazione microscopica ed è possibile che le late-EPCs dai soggetti con cKS, crescendo più velocemente, raggiungano precocemente le dimensioni adeguate per la visualizzazione delle colonie.

Nei singoli individui, il numero di colonie di late-EPCs isolate per 20×10^6 PBMC dei soggetti con cKS è maggiore del numero di colonie di late-EPCs isolate dei soggetti sani. Infatti nei soggetti con cKS è stato isolato un numero di late-EPCs circa cinque volte superiore rispetto ai soggetti sani sia su fibronectina che su collagene. Questi risultati potrebbero suggerire che nel cKS esiste una maggiore propensione al differenziamento endoteliale rispetto ai soggetti sani o un maggior numero di cellule, la cui identità non è nota, che danno origine alle late-EPCs *in vitro*. I dati ottenuti sono in accordo con un nostro precedente studio in cui abbiamo dimostrato che il numero di progenitori endoteliali presenti in circolo, identificati

come cellule CD45^{low}/CD34⁺/KDR⁺ è maggiore nei soggetti con cKS rispetto ai soggetti sani [187], sebbene non sia chiaro se vi sia una relazione tra CD45^{low}/CD34⁺/KDR⁺ e le late-EPCs isolate *in vitro*.

Data la natura angioproliferativa del KS, si potrebbe ipotizzare che la proliferazione e la mobilitazione delle EPCs nei pazienti con KS possa essere sostenuta dalla presenza di fattori angiogenetici solubili presenti in circolo [44]. In realtà, dati precedenti hanno evidenziato che la concentrazione plasmatica di fattori in grado di promuovere la mobilitazione delle late-EPCs come VEGF, TNF α , non è diversa nei soggetti con cKS rispetto ai soggetti sani [194], mentre vi è un aumento del GM-CSF che comunque non è correlato alla frequenza in circolo delle late-EPCs [187]. Escludendo il ruolo delle citochine si potrebbe ipotizzare che l'aumentato numero di late-EPCs isolate *in vitro* nei soggetti con cKS possa essere legato alla presenza di HHV-8 che potrebbe conferire a queste cellule un vantaggio proliferativo. La variante classica del KS utilizzata nel nostro studio infatti ci permette di escludere possibili fattori confondenti come l'immunosoppressione iatrogena o l'infezione da altri virus per valutare solamente gli effetti determinati dall'infezione da HHV-8.

Il KS viene classificato in base all'evoluitività ed allo stadio della malattia [29] ed è possibile che questi parametri possano influire sulla frequenza di soggetti che hanno dato origine ad almeno una colonia di late-EPCs, sul tempo di comparsa e sul numero delle colonie di late-EPCs isolate. Abbiamo osservato che la frequenza di soggetti che hanno dato origine ad almeno una colonia di late-EPCs, il tempo di comparsa e il numero delle colonie di late-EPCs isolate non variano né in relazione allo stadio né all'evoluitività della patologia. Questo dato è in disaccordo con quanto osservato nel nostro precedente studio nel quale il numero di CD45^{low}/CD34⁺/KDR⁺ presenti nel sangue periferico è significativamente maggiore nei pazienti con cKS ad evoluitività lenta rispetto ai pazienti ad evoluitività veloce [187]. Questi differenti risultati potrebbero essere legati ai diversi tipi cellulari considerati nei due studi.

In fase di espansione, abbiamo osservato che le late-EPCs dei soggetti con cKS raggiungono la senescenza più tardivamente rispetto alle late-EPCs dei soggetti sani. La presenza di infezione da HHV-8 nelle late-EPCs dei soggetti con cKS riportata nel nostro precedente studio [188] permette di ipotizzare che tali differenze potrebbero essere legate all'infezione da HHV-8 delle late-EPCs nei soggetti con cKS. Risultati analoghi sulla sopravvivenza sono stati riportati da Flore et al. [116] in uno studio in cui è stato dimostrato che l'infezione *in vitro* da HHV-8 determina un aumento della sopravvivenza delle cellule endoteliali primarie (HUVEC) mediante acquisizione dell'attività telomerasica.

Abbiamo osservato che le late-EPC dei soggetti con cKS hanno una maggiore attività proliferativa rispetto alle late-EPCs dei controlli sani. Questa differente capacità proliferativa potrebbe essere dovuta all'infezione da HHV-8. In modelli di infezione *in vitro* è stato dimostrato che HHV-8 fornisce un vantaggio proliferativo nelle HUVEC infettate, sebbene solo una parte delle cellule risulti infettata (5%), l'infezione da HHV-8 favorisce la proliferazione anche delle cellule non direttamente infettate attraverso meccanismi paracrini mediante l'upregolazione di KDR [116].

Inoltre, è noto che HHV-8 induce un vantaggio proliferativo non solo nelle cellule endoteliali ma anche in altri tipi cellulari, infatti in un nostro precedente studio,

abbiamo dimostrato che l'infezione da HHV-8, nei soggetti con cKS, ma anche in soggetti HHV-8 positivi senza cKS, determina l'espansione della sottopopolazione preimmune/natural effector nei linfociti B [60] come effetto indiretto dell'infezione.

Una componente importante per lo sviluppo e la trasformazione delle *spindle cells* nel KS è la presenza di un ambiente ricco di citochine che vengono prodotte dalle cellule infiammatorie ma anche dalle stesse *spindle cells*. Pertanto abbiamo valutato la produzione di citochine da parte delle late-EPCs dei soggetti con cKS.

Il dosaggio di IL-6 ha evidenziato che le late-EPCs dei soggetti con cKS producono una quantità maggiore di IL-6 rispetto alle late-EPCs dei soggetti sani. E' verosimile ipotizzare che l'aumentata produzione di IL-6 possa essere dovuta all'infezione da HHV-8 infatti è stato riportato che vIL6 codificata da HHV-8 è in grado di indurre la produzione di IL-6 da parte di diversi tipi cellulari [195]. L'infezione in vitro da HHV-8 determina un aumento dell'espressione di IL-6 in cellule dell'endotelio microvascolare umano (HMEC) [196] ed in un precedente studio condotto su cellule dendritiche abbiamo dimostrato che la concentrazione plasmatica di IL-6 è aumentata nei soggetti con cKS [194].

E' comunque possibile che l'aumentata produzione di IL-6 possa essere un effetto indiretto dell'infezione da HHV-8 che stimola la produzione di questa citochina nelle cellule non infettate.

I dosaggi di VEGF, TNF α e IFN α hanno evidenziato che le late-EPCs dei soggetti con cKS e dei soggetti sani non producono queste citochine. Questi risultati sono in accordo con quanto descritto da altri studi nei quali è stato dimostrato che le late-EPCs producono minime quantità di VEGF mentre le early-EPCs producono VEGF in quantità maggiore [192]. Le early-EPCs e le late-EPCs hanno differenti ruoli nella vasculogenesi infatti le early-EPCs contribuiscono principalmente secernendo citochine angiogeniche mentre le late-EPCs, grazie alla loro elevata capacità proliferativa, forniscono le cellule endoteliali necessarie alla vasculogenesi.

Abbiamo valutato la presenza di infezione da HHV-8 nelle late-EPCs dei soggetti con cKS e la presenza della proteina virale di latenza, LANA, nelle late-EPCs indica che queste cellule sono HHV-8 infette. Ogni coltura di late-EPCs presenta una percentuale di infezione differente che varia dal 5% al 30%. La presenza di infezione latente ci permette quindi di ipotizzare che le caratteristiche di aumentate frequenza, proliferazione, e produzione di IL-6 nelle late-EPCs di soggetti con cKS possano, almeno in parte, essere dovute alla presenza di HHV-8 o ad un effetto indiretto dell'infezione.

E' noto che le cellule endoteliali mature possono essere infettate *in vitro* da HHV-8 [197; 198] ma nulla è stato riportato riguardo all'infezione di progenitori endoteliali *in vitro*. Abbiamo infettato le late-EPCs di soggetti sani ed abbiamo dimostrato che sono infettabili *in vitro* da HHV-8 e che l'infezione viene mantenuta nel tempo. L'espressione della proteina LANA nelle late-EPCs indica l'avvenuta infezione. La presenza di infezione latente di HHV-8 è evidente nel 10-30% delle late-EPC HHV-8 infette, un giorno dopo l'infezione, ed aumenta al 30-50% nove giorni dopo l'infezione. La percentuale di infezione è simile nelle late-EPC HHV-8 infette e nelle HMEC HHV-8 infette ed è in accordo con lo studio condotto da Moses et.al. che osserva nelle HMEC una percentuale di infezione pari al 10%, dodici ore dopo

l'infezione che sale approssimativamente al 50% dopo sette giorni [199]. Inoltre, la presenza di infezione latente è ulteriormente confermata dalla presenza di HHV-8 nel pellet cellulare alla fine della coltura.

La quantificazione del genoma di HHV-8 nel surnatante di coltura dimostra che le late-EPCs supportano la replicazione litica virale.

Il numero di genomi virali presenti nel surnatante della stessa coltura è variabile nel tempo. Queste variazioni potrebbero essere dovute alla presenza di replicazione litica spontanea a cui potrebbe andare incontro il virus. Abbiamo osservato che, in due colture, i livelli dei genomi virali nel surnatante sono elevati un giorno dopo l'infezione, quindi decrescono mostrando un andamento oscillante. Abbiamo ipotizzato che le particelle virali potrebbero rimanere adese alla superficie delle cellule senza essere eliminate completamente dai lavaggi effettuati per rimuovere il virus alla fine del tempo di incubazione dell'infezione.

All'interno della stessa coltura di late-EPCs il numero di genomi virali nel pellet cellulare è superiore rispetto a quello che si ritrova nel surnatante di coltura. Questo potrebbe indicare che si sia stabilita un'infezione latente nella maggior parte delle cellule con una piccola quota di cellule che sostiene la replicazione litica virale. Tali evidenze sono in accordo con nostre precedenti osservazioni che dimostrano che le late-EPC isolate da soggetti con cKS sono HHV-8 infette e sono in grado di mantenere l'infezione quando coltivate in vitro, con oscillazioni variabili nel numero di genomi nel surnatante di coltura [188]. La persistenza dell'infezione assume un forte valore se si pensa che le *spindle cells*, appena isolate da biopsie di pazienti con KS, risultano essere nella quasi totalità dei casi latentemente infettate ma mostrano successivamente la perdita del genoma di HHV-8 durante il loro mantenimento in vitro [110]. In altri studi condotti su HMEC è stata osservata la mancanza del mantenimento dell'infezione *in vitro* da HHV-8 [200;198]. La persistenza dell'infezione nelle late-EPCs e la mancata persistenza nelle HMEC potrebbe essere dovuta ai diversi tipi cellulari utilizzati negli studi o al fatto che le colture soccombono a causa della spontanea riattivazione del ciclo litico virale. Sarebbe inoltre possibile ipotizzare che le late-EPCs possano agire come reservoir virale mantenendo l'infezione meglio e più a lungo delle cellule endoteliali mature.

Morfologicamente le late-EPC infettate in vitro assumono una forma fusata che ricorda quella delle *spindle cells* del KS e questo cambiamento non viene mantenuto durante il tempo in coltura. Sebbene l'infezione non sia presente nella totalità delle late-EPC infettate *in vitro* con HHV-8, l'acquisizione della morfologia fusata è stata osservata nella totalità delle cellule. Tali cambiamenti morfologici sono stati osservati anche in modelli di infezione *in vitro* di HMEC [122; 200]. HHV-8 infatti può alterare direttamente il fenotipo cellulare o indirettamente tramite l'induzione di meccanismi paracrini che influenzano le cellule adiacenti non infettate [116]. Infatti, l'attivazione di NF- κ B mediata dal gene di latenza virale vFLIP è necessaria da un lato per l'acquisizione della morfologia fusata, dall'altro induce la produzione di citochine infiammatorie in grado di indurre questa morfologia [123; 124]. Inoltre, l'acquisizione della morfologia fusata non può essere considerata un fenomeno guidato solo da HHV-8 latente poiché nel nostro studio questa morfologia viene assunta anche nell'infezione con virus inattivato.

In vitro, l'infezione da HHV-8 induce una riduzione della proliferazione cellulare. La diminuzione della proliferazione è molto evidente ad alte concentrazioni virali e diminuisce alla diminuzione della concentrazione di virus utilizzata per l'infezione. Questo è un dato importante sebbene sia in disaccordo con altri studi di infezione *in vitro*. Infatti Flore et.al. hanno osservato nelle HUVEC infettate *in vitro* da HHV-8 un aumento della proliferazione causato dall'up-regolazione dell'attività dell'enzima telomerasi [116]. Questi dati contrastanti potrebbero essere legati al differente tipo cellulare infettato *in vitro*. Questa diminuzione della proliferazione nelle late-EPCs HHV-8 infette è in disaccordo con quanto osservato nella prima parte dello studio sulle late-EPCs isolate da soggetti con cKS probabilmente perché nell'infezione *in vitro* potrebbero prevalere gli effetti citopatici dell'infezione da HHV-8.

Le late-EPC HHV-8 infette mostrano una maggiore espressione delle molecole di attivazione VCAM-1, ICAM-1 e e-selectina e delle integrine $\alpha 3$ e $\alpha v\beta 3$. Queste osservazioni sulle late-EPCs HHV-8 infette potrebbero far ipotizzare che il diverso comportamento su collagene e fibronectina delle late-EPCs dei soggetti con cKS rispetto ai soggetti sani potrebbe essere legato alla diversa espressione di molecole di adesione sulle cellule.

L'aumentata espressione di molecole di adesione sulle late-EPCs HHV-8 infette è in accordo con quanto riportato in precedenti studi, infatti è noto che HHV-8 up-regola l'espressione di ICAM-1, VCAM-1 e e-selectina [119]. E' stato dimostrato che, *in vitro*, HMEC HHV-8 infette producono citochine infiammatorie che inducono l'espressione delle molecole di adesione sulla superficie delle cellule endoteliali [203]. Inoltre le integrine $\alpha 3$ e $\alpha v\beta 3$ agiscono da recettori per l'ingresso di HHV-8 nella cellula e la loro up-regolazione potrebbe essere indotta dal virus come meccanismo per aumentare l'infettabilità delle cellule target.

Si potrebbe ipotizzare che l'infezione con HHV-8 sia in grado di attivare i progenitori endoteliali. Infatti da un punto di vista patogenetico, il KS è caratterizzato da tre processi paralleli: proliferazione delle cellule endoteliali, infiammazione locale e angiogenesi che sono contemporaneamente necessari per la comparsa e la progressione delle lesioni. Almeno negli stadi iniziali della malattia, il KS può essere considerato un processo di tipo proliferativo-infiammatorio senza alcuna caratteristica della crescita neoplastica [44]. Infatti le *spindle cells* in coltura risultano fortemente dipendenti per la loro crescita, e sopravvivenza, dai fattori di crescita esogeni, non presentano alterazioni geniche caratteristiche, non crescono in soft agar e non producono tumori stabili nei topi.

In conclusione, nel nostro studio abbiamo dimostrato che il substrato utilizzato per l'isolamento delle late-EPCs influisce sulla frequenza di isolamento e che le late-EPCs dei soggetti con cKS hanno un comportamento differente rispetto a quelle dei soggetti sani. Le colonie di late-EPCs dei soggetti con cKS compaiono in coltura più precocemente e sono numericamente maggiori rispetto alle late-EPCs dei soggetti sani. Inoltre, le late-EPCs dei soggetti con cKS hanno una maggiore capacità proliferativa, sopravvivono più a lungo e producono IL-6 in quantità maggiore rispetto alle late-EPCs dei soggetti sani. Abbiamo dimostrato che le late-EPCs dei soggetti con cKS portano il genoma di HHV-8 e che il loro comportamento *in vitro* potrebbe, almeno in parte essere attribuito all'infezione da HHV-8.

Inoltre, le late-EPC di soggetti sani possono essere infettate *in vitro* con HHV-8. Le late-EPC di soggetti sani supportano la replicazione latente e litica di HHV-8. L'infezione *in vitro* da HHV-8 induce una diminuzione della proliferazione cellulare ed induce le cellule ad acquisire particolari caratteristiche che ricordano quelle delle *spindle cells* presenti nelle lesioni del KS.

6. CONCLUSIONI

Nel nostro studio abbiamo ottimizzato il protocollo di coltura delle late-EPCs e definito il comportamento delle late-EPCs su due substrati, collagene e fibronectina. Abbiamo confrontato le caratteristiche delle late-EPCs isolate dai soggetti con KS classico con quelle isolate da soggetti sani, inoltre, abbiamo valutato i possibili effetti dell'infezione *in vitro* da HHV-8 sulle late-EPCs isolate dai soggetti sani.

I risultati dell'ottimizzazione indicano che è possibile isolare le late-EPCs sui substrati di fibronectina e collagene e che la frequenza di isolamento è differente in relazione al substrato utilizzato. Abbiamo dimostrato che late-EPCs dei soggetti con cKS hanno un comportamento differente rispetto alle late EPCs dei soggetti sani sui substrati utilizzati. Inoltre, le late EPCs dei soggetti con cKS compaiono più precocemente, sono più numerose, hanno una maggiore capacità proliferativa, sopravvivono più a lungo e producono IL-6 in quantità maggiori rispetto alle late-EPCs isolate dai soggetti sani. È verosimile ipotizzare che tali caratteristiche possano essere ricondotte, almeno in parte, all'infezione da HHV-8 dimostrata dalla presenza di LANA nelle late-EPCs dei soggetti con cKS. Questo dato conferma quanto riportato nel nostro precedente studio in cui abbiamo osservato che le late-EPCs dei soggetti con cKS sono HHV-8 infette [188]. Le nostre osservazioni rafforzano l'ipotesi che le late-EPCs possano avere un ruolo importante nella patogenesi del KS. Infatti, le late-EPCs potrebbero contribuire alla formazione delle lesioni sarcomatose e potrebbero rappresentare i precursori putativi delle *spindle cells*. È possibile ipotizzare che la presenza di un microambiente infiammatorio ricco di citochine e fattori di crescita [201] possa favorire il richiamo, l'insediamento, la proliferazione e la trasformazione delle EPCs già infettate a livello midollare, che, localmente potrebbero dare origine allo sviluppo delle lesioni sarcomatose acquisendo caratteristiche delle *spindle cells*.

Inoltre i nostri dati indicano che le late-EPC di soggetti sani sono infettabili con HHV-8 *in vitro* e sostengono la replicazione latente e litica virale. HHV-8 induce le late-EPCs ad acquisire particolari caratteristiche morfologiche che ricordano quelle delle *spindle cells* presenti nelle lesioni sarcomatose e potrebbe essere in grado di attivare i progenitori endoteliali.

Complessivamente i dati ottenuti rafforzano le ipotesi che le late-EPCs isolate da soggetti con cKS possano rappresentare i precursori putativi delle *spindle cells*. Le late-EPCs dei soggetti con cKS sembrerebbero rappresentare un buon modello per lo studio degli effetti dell'infezione da HHV-8. Inoltre lo studio delle late-EPCs dei soggetti con cKS sembrerebbe preferibile rispetto a quello dell'infezione *in vitro* di late-EPCs dei soggetti sani perché *in vitro* sembrerebbero prevalere gli effetti citopatici dell'infezione da HHV-8 rispetto agli effetti dell'infezione a lungo termine osservabile nelle late-EPCs dei soggetti con cKS.

Il ruolo delle EPCs come precursori delle *spindle cells* dovrà essere confermato mediante ulteriori studi in modelli animali disegnati per analizzare il comportamento delle late-EPCs inoculate in un contesto infiammatorio per valutare se le late-EPCs di pazienti con KS sono effettivamente in grado di dare origine alle lesioni tipiche di questa malattia. Tale modello potrà essere successivamente utilizzato per studiare l'efficacia di nuove possibili strategie terapeutiche.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Biberfeld P, Ensoli B, Stürzl M, Schulz TF. "Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8, cytokines, growth factors and HIV in pathogenesis of Kaposi's sarcoma", *Curr Opin Infect Dis*, Vol. Apr;11(2), 1998, pp 97-105.
2. Kaposi M, "Idiopathic multiple pigmented sarcoma of the skin", *Arch Dermatol Syphil*, Vol. 4, 1872, pp. 265.
3. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, Moore PS, "Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma", *Science*, Vol. 266, 1994, pp. 1865-9.
4. Schulz TF. The pleiotropic effects of Kaposi's sarcoma herpesvirus. *J Pathol*, Vol. 208, no. 2, 2006, pp. 187-98.
5. Jones JL, Hanson DL, Dworkin MS, Ward JW, Jaffe HW. Effect of antiretroviral therapy on recent trends in selected cancers among HIV-infected persons. Adult/Adolescent Spectrum of HIV Disease Project Group. *J Acquir Immune Defic Syndr*, Vol. 1, no. 21, 1999 Suppl 1:S11-7.
6. Stallone G, Schena A, Infante B, Di Paolo S, Loverre A, Maggio G, Ranieri E, Gesualdo L, Schena FP, Grandaliano G. Sirolimus for Kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients. *N Engl J Med*, Vol. 352, no. 13, 2005, pp. 1317-23.
7. Iscovich J, Boffetta P, Franceschi S, Azizi E, Sarid R. Classic kaposi sarcoma: epidemiology and risk factors. *Cancer*, 2000 Vol. Feb 1;88(3), pp. 500-17. Review.
8. Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK, Stuschke M, Roggendorf M, Schwartz RA, Seeber S. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy. *Lancet Infect Dis*, Vol. 2, no. 5, 2002, pp. 281-92. Review.
9. Christeff N, Winter C, Gharakhanian S, Thobie N, Wirbel E, Costagliola D, Nunez EA, Rozenbaum W. Differences in androgens of HIV positive patients with and without Kaposi sarcoma. *J Clin Pathol*, Vol. 48, no. 6, 1995, pp. 513-8.
10. Brambilla L, Boneschi V, Ferrucci S, Taglioni M, Berti E. "Human herpesvirus-8 infection among heterosexual partners of patients with classical Kaposi's sarcoma", *Br J Dermatol*, Vol. 143, no. 5, 2000, pp. 1021-5.
11. Cattani P, Capuano M, Cerimele F, La Parola IL, Santangelo R, Masini C, Cerimele D, Fadda G. "Human herpesvirus 8 seroprevalence and evaluation of nonsexual transmission routes by detection of DNA in clinical specimens from human immunodeficiency virus-seronegative patients from central and southern Italy, with and without Kaposi's sarcoma", *J Clin Microbiol*, Vol. 37, no. 4, 1999, pp1150-3.
12. Rezza G, Dorrucchi M, Serraino D, Andreoni M, Giuliani M, Zerboni R, Sarmati L, Colangeli V, Salassa B, Monini P, Ensoli B, Pezzotti P. Incidence of Kaposi's sarcoma and HHV-8 seroprevalence among homosexual men with known dates of HIV seroconversion. Italian Seroconversion Study. *AIDS*, Vol. 14, no. 11, 2000, pp. 1647-53.
13. Wabinga HR, Parkin DM, Wabwire-Mangen F, Mugerwa JW. "Cancer in Kampala, Uganda, in 1989-91: changes in incidence in the era of AIDS", *Int J Cancer*, Vol. 54, no. 1, 1993, pp. 26-36.
14. Plancoulaine S, Abel L, van Beveren M, Trégouët DA, Joubert M, Tortevoye P, de Thé G, Gessain A. "Human herpesvirus 8 transmission from mother to child and between siblings in an endemic population", *Lancet*, Vol. 356, no. 9235, 2000, pp. 1062-5.

15. Andreoni M, Sarmati L, Nicastri E, El Sawaf G, El Zalabani M, Uccella I, Bugarini R, Parisi SG, Rezza G. "Primary human herpesvirus 8 infection in immunocompetent children", *JAMA*, Vol. 287, no. 10, 2002, pp. 1295-300.
16. Schwartz RA. "Kaposi's sarcoma: advances and perspectives", *J Am Acad Dermatol*, Vol. 34, no. 5, 1996, 804-14.
17. Hudnall SD, Rady PL, Tying SK, Fish JC. "Serologic and molecular evidence of human herpesvirus 8 activation in renal transplant recipients", *J Infect Dis*, Vol. 178, no. 6, 1998, pp. 1791-4.
18. Barozzi P, Luppi M, Facchetti F, Mecucci C, Alù M, Sarid R, Rasini V, Ravazzini L, Rossi E, Festa S, Crescenzi B, Wolf DG, Schulz TF, Torelli G. "Post-transplant Kaposi sarcoma originates from the seeding of donor-derived progenitors", *Nat Med*, Vol. 9, no. 5, 2003, pp. 554-61. Epub 2003 Apr 7.
19. Luppi M, Barozzi P, Guaraldi G, Ravazzini L, Rasini V, Spano C, Riva G, Vallerini D, Pinna AD, Torelli G. "Human herpesvirus 8-associated diseases in solid-organ transplantation: importance of viral transmission from the donor" *Clin Infect Dis*, Vol. 37, no. 4, 2003, pp. 606-7.
20. Ackerman AB. "Subtle clues to diagnosis by conventional microscopy. The patch stage of Kaposi's sarcoma", *Am J Dermatopathol*, Vol. 1, no. 2, 1979, pp. 165-72.
21. Regezi JA, MacPhail LA, Daniels TE, DeSouza YG, Greenspan JS, Greenspan D. "Human immunodeficiency virus-associated oral Kaposi's sarcoma. A heterogeneous cell population dominated by spindle-shaped endothelial cells", *Am J Pathol*, Vol. 143, no. 1, 1993, pp. 240-9.
22. Modlin RL, Hofman FM, Kempf RA, Taylor CR, Conant MA, Rea TH. "Kaposi's sarcoma in homosexual men: an immunohistochemical study", *J Am Acad Dermatol*, Vol. 8, no. 5, 1983, pp. 620-7.
23. Browning PJ, Sechler JM, Kaplan M, Washington RH, Gendelman R, Yarchoan R, Ensoli B, Gallo RC. "Identification and culture of Kaposi's sarcoma-like spindle cells from the peripheral blood of human immunodeficiency virus-1-infected individuals and normal controls", *Blood*, Vol. 84, no. 8, 1994, pp. 2711-20.
24. Davis DA, Rinderknecht AS, Zoetewij JP, Aoki Y, Read-Connole EL, Tosato G, Blauvelt A, Yarchoan R. "Hypoxia induces lytic replication of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus", *Blood*, Vol. 97, no. 10, 2001, pp. 3244-50.
25. Taylor JF, Templeton AC, Vogel CL, Ziegler JL, Kyalwazi SK. "Kaposi's sarcoma in Uganda: a clinico-pathological study", *Int J Cancer*, Vol. 8, no. 1, 1971, pp. 122-35.
26. Mitsuyasu RT. "Clinical variants and staging of Kaposi's sarcoma." *Semin Oncol*, Vol. 14, no. 2, 1987, pp. 13-8.
27. Chachoua A, Krigel R, Lafleur F, Ostreicher R, Speer M, Laubenstein L, Wernz J, Rubenstein P, Zang E, Friedman-Kien A. "Prognostic factors and staging classification of patients with epidemic Kaposi's sarcoma", *J Clin Oncol*, Vol. 7, no. 6, 1989, pp. 774-80.
28. Krown SE, Metroka C, Wernz JC. "Kaposi's sarcoma in the acquired immune deficiency syndrome: a proposal for uniform evaluation, response, and staging criteria. AIDS Clinical Trials Group Oncology Committee", *J Clin Oncol*. Vol. 7, no. 9, 1989, pp. 1201-7.
29. Brambilla L, Boneschi V, Taglioni M, Ferrucci S. "Staging of classic Kaposi's sarcoma: a useful tool for therapeutic choices", *Eur J Dermatol*, Vol. 13, no. 1, 2003, pp. 83-6.

30. Brambilla L, Bellinvia M, Tourlaki A, Scoppio B, Gaiani F, Boneschi V. "Intralesional vincristine as first-line therapy for nodular lesions in classic Kaposi sarcoma: a prospective study in 151 patients", *Br J Dermatol*, Vol. 162, no. 4, 2010, pp. 854-9.
31. Fatahzadeh M. "Kaposi sarcoma: Review and medical management update", *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. Vol. 1, 2011.
32. Vaz P, Macassa E, Jani I, Thome B, Mahagaja E, Madede T, Muando V, Biberfeld G, Anderson S, Blanche S. "Treatment of Kaposi sarcoma in human immunodeficiency virus-1-infected Mozambican children with antiretroviral drugs and chemotherapy", *Pediatr Infect Dis J*, Vol. 30, no. 10, 2011, pp. 891-3.
33. Coras B, Hafner C, Reichle A, Hohenleutner U, Szeimies RM, Landthaler M, Vogt T. "Antiangiogenic therapy with pioglitazone, rofecoxib, and trofosfamide in a patient with endemic kaposi sarcoma", *Arch Dermatol*, Vol. 140, no. 12, 2004, pp. 1504-7.
34. Nagy S, Gyulai R, Kemeny L, Szenohradszky P, Dobozy A. Iatrogenic "Kaposi's sarcoma: HHV8 positivity persists but the tumors regress almost completely without immunosuppressive therapy", *Transplantation*, Vol. 69, no. 10, 2000, pp. 2230-1.
35. Gao SJ, Kingsley L, Li M, Zheng W, Parravicini C, Ziegler J, Newton R, Rinaldo CR, Saah A, Phair J, Detels R, Chang Y, Moore PS. "KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma", *Nat Med*, Vol. 2, no. 8, 1996, pp. 925-8.
36. Zong JC, Ciufu DM, Alcendor DJ, Wan X, Nicholas J, Browning PJ, Rady PL, Tyring SK, "High-level variability in the ORF-K1 membrane protein gene at the left end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome defines four major virus subtypes and multiple variants or clades in different human populations", *J Virol*, Vol. 73, no. 5, 1999, pp. 4156-70.
37. Said W, Chien K, Takeuchi S, Tasaka T, Asou H, Cho SK, De Vos S, Cesarman E, Knowles DM and Koeffler HP, 1996. "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV or HHV8) in primary effusion lymphoma; ultrastructural demonstration of herpesvirus in lymphoma cells", *Blood*, Vol. 87, pp. 4937-4943.
38. Renne R, Lagunoff M, Zhong W and Ganem D. 1996. "The size and conformation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in infected cells and virions", *J. Virol*, Vol. 70, pp. 8151-8154.
39. Ballestas ME, Chatis PA and Kaye KM. 1999. "Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen", *Science*, Vol. 284: 641-644.
40. Renne R, Barry C, Dittmer D, Compitello N, Brown PO, Ganem D. "Modulation of cellular and viral gene expression by the latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus", *J Virol*, Vol. 75, no.1, 2001, pp. 458-68.
41. Chang Y, Moore PS, Talbot SJ, Boshoff CH, Zarkowska T, Godden-Kent, Paterson H, Weiss RA and Mitnacht S. "Cyclin encoded by KS herpesvirus", *Nature*, Vol. 382, 1996, pp. 410-411.
42. Li M, Lee H, Yoon DW, Albrecht JC, Fleckenstein B, Neipel F and Jung JU. "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin", *J. Virol*, Vol. 71, 1997, pp. 1984-1991.
43. Sarid R, Sato T, Bohenzky RA, Russo JJ, Chang Y. "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional bcl-2 homologue", *Nat Med*, Vol. 3, no. 3, 1997, pp. 293-8.

44. Ensoli B, Sgadari C, Barillari G, Sirianni MC, Stürzl M, Monini P. "Biology of Kaposi's sarcoma", *Eur J Cancer*, Vol. 37, no. 10, 2001, pp. 1251-69.
45. Schulz TF. "The pleiotropic effects of Kaposi's sarcoma herpesvirus", *J Pathol*, Vol. 208, no. 2, 2006, pp. 187-98.
46. Osborne J, Moore PS, Chang Y. "KSHV-encoded viral IL-6 activates multiple human IL-6 signaling pathways", *Hum Immunol*, Vol. 60, no. 10, 1999, pp. 921-7.
47. Yang TY, Chen SC, Leach MW, Manfra D, Homey B, Wiekowski M, Sullivan L, Jenh CH, Narula SK, Chensue SW, Lira SA. "Transgenic expression of the chemokine receptor encoded by human herpesvirus 8 induces an angioproliferative disease resembling Kaposi's sarcoma", *J Exp Med*, Vol. 191, no. 3, 2000, pp. 445-54.
48. Huang LM, Huang SY, Chen MY, Chao MF, Lu CY, Tien HF, Lee CY, Jeang KT. "Geographical differences in human herpesvirus 8 seroepidemiology: a survey of 1,201 individuals in Asia", *J Med Virol*, Vol. 60, no. 3, 2000, pp. 290-3.
49. Polstra AM, Van Den Burg R, Goudsmit J, Cornelissen M. "Human herpesvirus 8 load in matched serum and plasma samples of patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma", *J Clin Microbiol*, Vol. 41, no. 12, 2003, pp. 5488-91.
50. Polstra AM, Goudsmit J, Cornelissen M. "Latent and lytic HHV-8 mRNA expression in PBMCs and Kaposi's sarcoma skin biopsies of AIDS Kaposi's sarcoma patients", *J Med Virol*, Vol. 70, no. 4, 2003, pp. 624-7.
51. Mayama S, Cuevas LE, Sheldon J, Omar OH, Smith DH, Okong P, Silvel B, Hart CA, Schulz TF. "Prevalence and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in Ugandan children and adolescents", *Int J Cancer*, Vol. 77, no. 6, 1998, pp. 817-20.
52. Stürzl M, Hohenadl C, Zietz C, Castanos-Velez E, Wunderlich A, Ascherl G, Biberfeld P, Monini P, Browning PJ, Ensoli B. "Expression of K13/v-FLIP gene of human herpesvirus 8 and apoptosis in Kaposi's sarcoma spindle cells" *J Natl Cancer Inst*, Vol. 91, no. 20, 1999, pp. 1725-33.
53. Stürzl M, Wunderlich A, Ascherl G, Hohenadl C, Monini P, Zietz C, Browning PJ, Neipel F, Biberfeld P, Ensoli B. "Human herpesvirus-8 (HHV-8) gene expression in Kaposi's sarcoma (KS) primary lesions: an in situ hybridization study", *Leukemia*, Vol. 13 1999, pp. 110-2.
54. Dupon M, Masquelier B, Cazorla C, Chêne G, Dumon B, Ragnaud JM, de Barbeyrac B, Bébéar C, Lacut JY, Fleury HJ. "Acquired immunodeficiency syndrome-associated Kaposi's sarcoma and human herpesvirus 8 DNA detection in serial peripheral blood mononuclear cell samples", *Res Virol*, Vol. 148, no. 6, 1997, pp. 417-25.
55. Blasig C, Zietz C, Haar B, et al. "Monocytes in Kaposi's sarcoma lesions are productively infected by human herpesvirus 8", *J Virol*, Vol. 71, 1997, pp. 7963-7968.
56. Ensoli B, Sgadari C, Barillari G, Sirianni MC, Stürzl M, Monini P. "Biology of Kaposi's sarcoma", *Eur J Cancer*, Vol. 37, no. 10, 2001, pp. 1251-69. Review.
57. Nsubuga MM, Biggar RJ, Combs S, Marshall V, Mbisa G, Kambugu F, Mehta M, Biryahwaho B, Rabkin CS, Whitby D, Mbulaiteye SM. "Human herpesvirus 8 load and progression of AIDS-related Kaposi sarcoma lesions", *Cancer Lett*, Vol. 263, no. 2, 2008, pp. 182-8.
58. Hassman LM, Ellison TJ, Kedes DH. "KSHV infects a subset of human tonsillar B cells, driving proliferation and plasmablast differentiation", *J Clin Invest*, Vol. 121, no. 2, 2011, pp. 752-68.

59. Wen KW, Damania B. "Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV): molecular biology and oncogenesis", *Cancer Lett*, Vol. 289, no. 2, 2010, pp. 140-50.
60. Della Bella S, Taddeo A, Colombo E, Brambilla L, Bellinvia M, Pregliasco F, Cappelletti M, Calabrò ML, Villa ML. "Human herpesvirus-8 infection leads to expansion of the preimmune/natural effector B cell compartment", *PLoS One*, Vol. 5, no.11, 2010, e15029.
61. Chadburn A, Hyjek EM, Tam W, Liu Y, Rengifo T, Cesarman E, Knowles DM. "Immunophenotypic analysis of the Kaposi sarcoma herpesvirus (KSHV; HHV-8)-infected B cells in HIV+ multicentric Castlemans disease (MCD)", *Histopathology*, Vol. 53, no. 5, 2008, pp. 513-24.
62. Gantt S, Casper C. "Human herpesvirus 8-associated neoplasms: the roles of viral replication and antiviral treatment", *Curr Opin Infect Dis*, Vol. 24, no. 4, 2011, pp. 295-301.
63. Henry M, Uthman A, Geusau A, Rieger A, Furci L, et al. "Infection of circulating CD34+ cells by HHV-8 in patients with Kaposi's sarcoma", *J Invest Dermatol*, Vol. 113, 1999, pp. 613-616.
64. Wu W, Vieira J, Fiore N, Banerjee P, Sieburg M, Rochford R, Harrington W Jr, Feuer G. "KSHV/HHV-8 infection of human hematopoietic progenitor (CD34+) cells: persistence of infection during hematopoiesis in vitro and in vivo", *Blood*, Vol. 108, no. 1, 2006, pp. 141-51.
65. Pellet C, Kerob D, Dupuy A, Carmagnat MV, Mourah S, Podgorniak MP, Toledano C, Morel P, Vérola O, Dosquet C, Hamel Y, Calvo F, Rabian C, Lebbé C. "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viremia is associated with the progression of classic and endemic Kaposi's sarcoma", *J Invest Dermatol*, Vol. 126, no. 3, 2006, pp. 621-7.
66. Rezaee SA, Cunningham C, Davison AJ and Blackbourn DJ. "Kaposi's sarcoma -associated herpesvirus immune modulation: an overview". *J. Gen. Virol*, Vol. 87, 2006, pp. 1781-1804.
67. Coscoy L.. "Immune evasion by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus", *Nat. Rev. Immunol*, Vol. 7, 2007, pp. 391-401.
68. Spiller OB, Blackbourn DJ, Mark L, Proctor DG and Blom AM. "Functional activity of the complement regulator encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus", *J. Biol. Chem*, Vol. 278, 2003, pp. 9283-9289.
69. Dourmishev LA, Dourmishev AL, Palmeri D, Schwartz RA and Lukac DM. "Molecular Genetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) epidemiology and pathogenesis", *Microbiol. Mol. Biol. Rev*, Vol. 67, 2003, pp. 175-212.
70. Coscoy L. and Ganem D. "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes two proteins that block cell surface display of MHC class I chains by enhancing their endocytosis", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 97, 2000, pp. 8051-8056.
71. Coscoy L and Ganem D. "A viral protein that selectively downregulates ICAM-1 and B7-2 and modulates T cell costimulation", *J. Clin. Invest*, Vol. 107, 2001, pp. 1599-1606.
72. Stine JT, Wood C, Hill M, Epp A, Raport CJ, Schweickart VL, Endo Y, Sasaki T, Simmons G, Boshoff C, Clapham P, Chang Y, Moore P, Gray PW and Chantry D. "KSHV-encoded CC chemokine vMIP-III is a CCR4 agonist, stimulates angiogenesis, and selectively chemoattracts TH2 cells", *Blood*, Vol. 95, 2000, pp. 1151- 1157.

73. Holst PJ, Lutichau HR, Schwartz TW and Rosenkilde MM. "Virally encoded chemokines and chemokine receptors in the role of viral infections", *Contrib. Microbiol*, Vol. 10, 2003, pp. 232-252.
74. Jensen KK and Lira S. "Chemokines and Kaposi's sarcoma", *Semin. Cancer Biol*, Vol. 14, 2004, pp. 187-194.
75. Della Bella S, Nicola S, Brambilla L, Riva A, Ferrucci S, Presicce P, Boneschi V, Berti E, Villa ML. "Quantitative and functional defects of dendritic cells in classic Kaposi's sarcoma", *Clin Immunol*, Vol. 119, no. 3, 2006, pp. 317-29.
76. Samaniego F, Markham PD, Gendelman R, Watanabe Y, Kao V, Kowalski K, Sonnabend JA, Pintus A, Gallo RC, Ensoli B. "Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor present in Kaposi's sarcoma (KS) are induced by inflammatory cytokines and synergize to promote vascular permeability and KS lesion development", *Am J Pathol*, Vol. 152, no. 6, 1998, pp. 1433-43.
77. Sirianni MC, Vincenzi L, Fiorelli V, Topino S, Scala E, Uccini S, Angeloni A, Faggioni A, Cerimele D, Cottoni F, Aiuti F, Ensoli B. "gamma-Interferon production in peripheral blood mononuclear cells and tumor infiltrating lymphocytes from Kaposi's sarcoma patients: correlation with the presence of human herpesvirus-8 in peripheral blood mononuclear cells and lesional macrophages", *Blood*, Vol. 91, no. 3, 1998, pp. 968-76.
78. Monini P, Colombini S, Stürzl M, Goletti D, Cafaro A, Sgadari C, Buttò S, Franco M, Leone P, Fais S, Leone P, Melucci-Vigo G, Chiozzini C, Carlini F, "Reactivation and persistence of human herpesvirus-8 infection in B cells and monocytes by Th-1 cytokines increased in Kaposi's sarcoma", *Blood*, Vol. 93, no. 12, 1999, pp. 4044-58.
79. Ensoli B, Barillari G, Gallo RC. "Cytokines and growth factors in the pathogenesis of AIDS-associated Kaposi's sarcoma", *Immunol Rev*, Vol. 127, 1992, pp. 147-55. Review.
80. Thompson EW, Nakamura S, Shima TB, Melchiori A, Martin GR, Salahuddin SZ, Gallo RC, Albini A. "Supernatants of acquired immunodeficiency syndrome-related Kaposi's sarcoma cells induce endothelial cell chemotaxis and invasiveness", *Cancer Res*, Vol. 51, no. 10, 1991, pp. 2670-6.
81. Albini A, Fontanini G, Masiello L, Tacchetti C, Bigini D, Luzzi P, Noonan DM, Stetler-Stevenson WG. "Angiogenic potential in vivo by Kaposi's sarcoma cell-free supernatants and HIV-1 tat product: inhibition of KS-like lesions by tissue inhibitor of metalloproteinase-2", *AIDS*, Vol. 8, no. 9, 1994, pp. 1237-44.
82. Fiorelli V, Gendelman R, Sirianni MC, Chang HK, Colombini S, Markham PD, Monini P, Sonnabend J, Pintus A, Gallo RC, Ensoli B. "gamma-Interferon produced by CD8+ T cells infiltrating Kaposi's sarcoma induces spindle cells with angiogenic phenotype and synergy with human immunodeficiency virus-1 Tat protein: an immune response to human herpesvirus-8 infection?", *Blood*, Vol. 91, no. 3, 1998, pp. 956-67.
83. Sodhi A, Montaner S, Patel V, Zohar M, Bais C, Mesri EA, Gutkind JS. "The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha", *Cancer Res*, Vol. 60, no. 17, 2000, pp. 4873-80.
84. Ensoli B, Gendelman R, Markham P, Fiorelli V, Colombini S, Raffeld M, Cafaro A, Chang HK, Brady JN, Gallo RC. "Synergy between basic fibroblast growth factor

- and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma", *Nature*, Vol. 371, no. 6499, 1994, pp. 674-80.
85. Samaniego F, Markham PD, Gendelman R, Gallo RC, Ensoli B. "Inflammatory cytokines induce endothelial cells to produce and release basic fibroblast growth factor and to promote Kaposi's sarcoma-like lesions in nude mice", *J Immunol*, Vol. 158, no. 4, 1997, pp. 1887-94.
86. Cornali E, Zietz C, Benelli R, Weninger W, Masiello L, Breier G, Tschachler E, Albin A, Stürzl M. "Vascular endothelial growth factor regulates angiogenesis and vascular permeability in Kaposi's sarcoma", *Am J Pathol*, Vol. 149, no. 6, 1996, pp. 1851-69.
87. Stürzl M, Brandstetter H, Zietz C, Eisenburg B, Raivich G, Gearing DP, Brockmeyer NH, Hofschneider PH. "Identification of interleukin-1 and platelet-derived growth factor-B as major mitogens for the spindle cells of Kaposi's sarcoma: a combined in vitro and in vivo analysis", *Oncogene*, Vol. 10, no. 10, 1995, pp. 2007-16.
88. Masood R, Cai J, Tulpule A, Zheng T, Hamilton A, Sharma S, Espina BM, Smith DL, Gill PS. "Interleukin 8 is an autocrine growth factor and a surrogate marker for Kaposi's sarcoma", *Clin Cancer Res*, Vol. 7, no.9, 2001, pp. 2693-702.
89. Yang J, Hagan MK, Offermann MK. "Induction of IL-6 gene expression in Kaposi's sarcoma cells", *J Immunol*, Vol. 152, no. 2, 1994, pp. 943-55.
90. Ensoli B, Sirianni MC. "Kaposi's sarcoma pathogenesis: a link between immunology and tumor biology", *Crit Rev Oncog*, Vol. 9, no. 2, 1998, pp. 107-24. Review.
91. Gill PS, Tsai YC, Rao AP, Spruck CH 3rd, Zheng T, Harrington WA Jr, Cheung T, Nathwani B, Jones PA. "Evidence for multiclonality in multicentric Kaposi's sarcoma", *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 95, 1998, pp. 8257–8261.
92. Duprez R, Lacoste V, Brière J, Couppié P, Frances C, Sainte-Marie D, Kassa-Kelembho E, Lando MJ, et al. "Evidence for a multiclonal origin of multicentric advanced lesions of Kaposi sarcoma", *J Natl Cancer Inst*, Vol. 99, no. 14, 2007, pp. 1086-94.
93. Herndier BG, Werner A, Arnstein P, Abbey NW, Demartis F, Cohen RL, Shuman MA, Levy JA. "Characterization of a human Kaposi's sarcoma cell line that induces angiogenic tumors in animals", *AIDS*, Vol. 8, no.5, 1994, pp. 575-81.
94. Corbeil J, Evans LA, Vasak E, Cooper DA, Penny R. "Culture and properties of cells derived from Kaposi sarcoma", *J Immunol*, Vol.146, no.9, 1991, pp. 2972-6.
95. Lebbe C, de Cremoux P, Millot G, Podgorniak MP, Verola O, et al. "Characterization of in vitro culture of HIV-negative Kaposi's sarcoma-derived cells. In vitro responses to alfa interferon", *Arch Dermatol Res*, Vol. 289, 1997, pp. 421–428.
96. Mutlu AD, Cavallin LE, Vincent L, Chiozzini C, Eroles P, Duran EM, Asgari Z, Hooper AT, La Perle KM, Hilsher C, Gao SJ, Dittmer DP, Rafii S, Mesri EA. "In vivo-restricted and reversible malignancy induced by human herpesvirus-8 KSHV: a cell and animal model of virally induced Kaposi's sarcoma", *Cancer Cell*, Vol. 11, no. 3, 2007, pp. 245-58.
97. Pyakurel P, Pak F, Mwakigonja AR, Kaaya E, Heiden T, Biberfeld P. "Lymphatic and vascular origin of Kaposi's sarcoma spindle cells during tumor development", *Int J Cancer*, Vol. 119, no.6, 2006, pp. 1262-7.
98. Cheung L, Rockson SG. "The lymphatic biology of Kaposi's sarcoma", *Lymphat Res Biol*, Vol. 3, no. 1, 2005, pp. 25-35.

99. Browning PJ, Sechler JM, Kaplan M, Washington RH, Gendelman R, Yarchoan R, Ensoli B, Gallo RC. "Identification and culture of Kaposi's sarcoma-like spindle cells from the peripheral blood of human immunodeficiency virus-1-infected individuals and normal controls", *Blood*, Vol. 84, no. 8, 1994, pp. 2711-20.
100. Carroll PA, Brazeau E, Lagunoff M. "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of blood endothelial cells induces lymphatic differentiation", *Virology*, Vol. 328, no. 1, 2004, pp. 7-18.
101. Yoo J, Kang J, Lee HN, Aguilar B, Kafka D, Lee S, Choi I, Lee J, Ramu S, Haas J, Koh CJ, Hong YK. "Kaposin-B enhances the PROX1 mRNA stability during lymphatic reprogramming of vascular endothelial cells by Kaposi's sarcoma herpes virus", *PLoS Pathog*, Vol. 6, 2010.
102. Zhang X, Wang JF, Chandran B, Persaud K, Pytowski B, Fingerroth J, Groopman JE. "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus activation of vascular endothelial growth factor receptor 3 alters endothelial function and enhances infection", *J Biol Chem*, Vol. 280, no. 28, 2005, pp. 26216-24.
103. Wang HW, Trotter MW, Lagos D, Bourboulia D, Henderson S, Mäkinen T, Elliman S, Flanagan AM, Alitalo K, Boshoff C. "Kaposi sarcoma herpesvirus-induced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma", *Nat Genet*, Vol. 36, no. 7, 2004, pp. 687-93.
104. Hong YK, Foreman K, Shin JW, Hirakawa S, Curry CL, Sage DR, Libermann T, Dezube BJ, Fingerroth JD, Detmar M. "Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus", *Nat Genet*, Vol. 36, no. 7, 2004, pp. 683-5.
105. Webster-Cyriaque J. "Development of Kaposi's sarcoma in a surgical wound", *N Engl J Med*, Vol. 346, no. 16, 2002, pp. 1207-10.
106. Barozzi P, Luppi M, Facchetti F, Mecucci C, Alù M, Sarid R, Rasini V, Ravazzini L, Rossi E, Festa S, Crescenzi B, Wolf DG, Schulz TF, Torelli G. "Post-transplant Kaposi sarcoma originates from the seeding of donor-derived progenitors", *Nat Med*, Vol. 9, no. 5, 2003, pp. 554-61.
107. Barillari G, Buonaguro L, Fiorelli V, Hoffman J, Michaels F, Gallo RC, Ensoli B. J "Effects of cytokines from activated immune cells on vascular cell growth and HIV-1 gene expression. Implications for AIDS-Kaposi's sarcoma pathogenesis", *Immunol*, Vol. 149, no. 11, 1992, pp. 3727-34.
108. Browning PJ, Sechler JM, Kaplan M, Washington RH, Gendelman R, Yarchoan R, Ensoli B, Gallo RC. "Identification and culture of Kaposi's sarcoma-like spindle cells from the peripheral blood of human immunodeficiency virus-1-infected individuals and normal controls", *Blood*, Vol. 84, no. 8, 1994, pp. 2711-20.
109. Kaaya EE, Parravicini C, Ordonez C, Gendelman R, Berti E, Gallo RC, Biberfeld P. "Heterogeneity of spindle cells in Kaposi's sarcoma: comparison of cells in lesions and in culture", *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, Vol. 10, no. 3, 1995, pp. 295-305.
110. Aluigi MG, Albini A, Carlone S, Repetto L, De Marchi R, et al. "KSHV sequences in biopsies and cultured spindle cells of epidemic, iatrogenic and Mediterranean forms of Kaposi's sarcoma", *Res Virol*, Vol. 147, 1996, pp. 267-275.
111. Lebbe C, de Cremoux P, Millot G, Podgorniak MP, Verola O, et al. () "Characterization of in vitro culture of HIV-negative Kaposi's sarcoma-derived cells. In vitro responses to alfa interferon", *Arch Dermatol Res*, Vol. 289, 1997, pp. 421-428.

112. Grundhoff A, Ganem D. "Inefficient establishment of KSHV latency suggests an additional role for continued lytic replication in Kaposi sarcoma pathogenesis", *J Clin Invest*, Vol. 113, no. 1, 2004, pp. 124-36.
113. Sgadari, C., Monini, P., Barillari, G., & Ensoli, B. "Use of HIV protease inhibitors to block Kaposi's sarcoma and tumour growth", *Lancet Oncol*, Vol. 4, 2003, pp. 537-547.
114. Kennedy MM, Lucas SB, Jones RR, Howells DD, Picton SJ, Hanks EE, McGee JO, O'Leary JJ. "HHV8 and Kaposi's sarcoma: a time cohort study", *Mol Pathol*, Vol. 50, no. 2, 1997, pp. 96-100.
115. Sakurada S, Katano H, Sata T, Ohkuni H, Watanabe T, Mori S. "Effective human herpesvirus 8 infection of human umbilical vein endothelial cells by cell-mediated transmission", *J Virol*, Vol. 75, no. 16, 2001, pp. 7717-22.
116. Flore O., Rafii S., Ely S., O'Leary J., Hyjek E.M. and Cesarman E. "Transformation of primary human endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus", *Nature*, Vol. 394, 1998, pp. 588-592
117. Grundhoff A, Ganem D. "Inefficient establishment of KSHV latency suggests an additional role for continued lytic replication in Kaposi sarcoma pathogenesis", *J Clin Invest*, Vol. 113, no. 1, 2004, pp. 124-36.
118. Lagunoff M., Bechtel J., Venetsanakos E., Roy A.-M., Abbey N., Herndier B., McMahon M., Ganem D. "De novo infection and serial transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured endothelial cells", *J Virol*, Vol. 76: 2002, pp. 2440-48
119. Naranatt PP, Krishnan HH, Svojanovsky SR, Bloomer C, Mathur S, Chandran B. "Host gene induction and transcriptional reprogramming in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8)-infected endothelial, fibroblast, and B cells: insights into modulation events early during infection", *Cancer Res*, Vol. 64, no. 1, 2004, pp. 72-84.
120. Wang S, Liu S, Wu M, Geng Y, Wood C. "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 ORF50 gene product contains a potent C-terminal activation domain which activates gene expression via a specific target sequence", *Arch Virol*, Vol. 146, no. 7, 2001, pp. 1415-26.
121. Veettil MV, Sadagopan S, Sharma-Walia N, Wang FZ, Raghu H, Varga L, Chandran B. "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus forms a multimolecular complex of integrins (alphaVbeta5, alphaVbeta3, and alpha3beta1) and CD98-xCT during infection of human dermal microvascular endothelial cells, and CD98-xCT is essential for the postentry stage of infection", *J Virol*, Vol. 82, no. 24, 2008, pp. 12126-44.
122. Moses AV, Jarvis MA, Raggio C, Bell YC, Ruhl R, Luukkonen BG, Griffith DJ, Wait CL, Druker BJ, Heinrich MC, Nelson JA, Früh K. "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-induced upregulation of the c-kit proto-oncogene, as identified by gene expression profiling, is essential for the transformation of endothelial cells", *J Virol*, Vol. 76, no. 16, 2002, pp. 8383-99.
- 123 Grossman C., Podgrabinska S., Skobe M., Ganem D. "Activation of NF-kB by the latent vFLIP gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is required for the spindle shape of virus-infected endothelial cells and contributes to their proinflammatory phenotype", *J Virol*; Vol. 80, 2006, pp. 7179-7185
- 124 Matta H., Surabhi R.M., Zhao J., Punj V., Sun Q., Schamus S., Mazzacurati L., Chaudray P.M. "Induction of spindle cell morphology in human vascular endothelial

- cells by human herpesvirus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein K13", *Oncogene*, Vol. 26, 2007, pp. 1656-1660
125. Tzima E. "Role of small GTPases in endothelial cytoskeletal dynamics and the shear stress response", *Circ Res*, Vol. 98, no. 2, 2006, pp. 176-85.
- 126 Wang L, Damania B. "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus confers a survival advantage to endothelial cells", *Cancer Res*, Vol. 68, no. 12, 2008, pp. 4640-8.
127. Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J. "Endothelial cells and VEGF in vascular development", *Nature*, Vol. 438, no. 7070, 2005, pp. 937-45.
128. Dzierzak E, Medvinsky A, de Bruijn M. "Qualitative and quantitative aspects of haematopoietic cell development in the mammalian embryo", *Immunol Today*, Vol. 19, no. 5, 1998, pp. 228-36.
129. Sabin FR. "Preliminary note on the differentiation of angioblasts and the method by which they produce blood-vessels, blood-plasma and red blood-cells as seen in the living chick", *J Hematother Stem Cell Res*, Vol. 11, no. 1, 2002, pp. 5-7.
130. Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, Sutherland DR, Baker MA, Greaves MF. "Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells", *Blood*, Vol. 75, no. 12, 1990, pp. 2417-26..
131. Plate KH, Breier G, Millauer B, Ullrich A, Risau W. "Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis", *Cancer Res*, Vol. 53, no. 23, 1993, pp. 5822-7.
132. Fong GH, Klingensmith J, Wood CR, Rossant J, Breitman ML. "Regulation of flt-1 expression during mouse embryogenesis suggests a role in the establishment of vascular endothelium", *Dev Dyn*, Vol. 207, no. 1, 1996, pp. 1-10.
133. Takakura N, Huang XL, Naruse T, Hamaguchi I, Dumont DJ, Yancopoulos GD, Suda T. "Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis", *Immunity*, Vol. 9, no. 5, 1998, pp. 677-86.
134. Kallianpur AR, Jordan JE, Brandt SJ. "The SCL/TAL-1 gene is expressed in progenitors of both the hematopoietic and vascular systems during embryogenesis", *Blood*, Vol. 83, no. 5, 1994, pp. 1200-8.
135. Dorfman DM, Wilson DB, Bruns GA, Orkin SH. "Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells", *J Biol Chem*. Vol. 267, no. 2, 1992, pp. 1279-85.
136. Watt SM, Gschmeissner SE, Bates PA. "PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells", *Leuk Lymphoma*, Vol. 17, no. 3-4, 1995, pp. 229-44.
137. Bagley RG, Walter-Yohrling J, Cao X, Weber W, Simons B, Cook BP, Chartrand SD, Wang C, Madden SL, Teicher BA. "Endothelial precursor cells as a model of tumor endothelium: characterization and comparison with mature endothelial cells", *Cancer Res*, Vol. 63, no. 18, 2003, pp. 5866-73.
138. Jung YD, Ahmad SA, Liu W, Reinmuth N, Parikh A, Stoeltzing O, Fan F, Ellis LM. "The role of the microenvironment and intercellular cross-talk in tumor angiogenesis", *Semin Cancer Biol*, Vol. 12, no. 2, 2002, pp. 105-12.
139. Carmeliet P. "Angiogenesis in life, disease and medicine", *Nature*, Vol. 438, no. 7070, 2005, pp. 932-6.
140. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. "Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating

- human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors”, *Blood*, Vol. 95, no. 3, 2000, pp. 952-8.
141. Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, Botta R, Gabbianelli M, Lulli V, Marziali G, Masella B, Müller R, Sgadari C, Testa U, Bonanno G, Peschle C. “Identification of the hemangioblast in postnatal life”, *Blood*, Vol. 100, no. 9, 2002, pp. 3203-8.
142. Bailey AS, Jiang S, Afentoulis M, Baumann CI, Schroeder DA, Olson SB, Wong MH, Fleming WH. “Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells”, *Blood*, Vol. 103, no. 1, 2004, pp. 13-9.
143. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J, Imaizumi T. “Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation”, *Circulation*, Vol. 103, no. 6, 2001, pp. 897-903.
144. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. “Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells”, *Blood*, Vol. 92, no. 2, 1998, pp. 362-7.
145. Li TS, Hayashi M, Liu ZL, Ito H, Mikamo A, Furutani A, Matsuzaki M, Hamano K. “Low angiogenic potency induced by the implantation of ex vivo expanded CD117(+) stem cells”, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, Vol. 286, no. 4, 2004, H1236-41.
146. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. “Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors”, *FASEB J*, Vol. 13, no. 1, 1999, pp. 9-22.
147. Asahara T, Murohara T, Sullivan M, Van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner LM. “Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis”, *Science*, Vol. 275, 1997, pp. 964-967.
148. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Bischoff J, Mayer JE Jr. “Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo”, *Nat Med*, Vol. 7, no. 9, 2001, pp. 1035-40.
149. Urbich C, Dimmeler S. “Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology”, *Circ Res*, Vol. 95, no. 4, 2004, pp. 343-53.
150. Fadini GP, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Significance of endothelial progenitor cells in subjects with diabetes”, *Diabetes Care*, Vol. 30, no. 5, 2007, pp. 1305-13.
151. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. “Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization”, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 97, no. 7, 2000, pp. 3422-7.
152. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K et al. “Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease”, *Circulation*, Vol. 103, 2001a, pp. 2885-2890.
153. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A et al. “Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease”, *Circ Res*, Vol. 89, 2001b, E1–E7.
154. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. “Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization”, *Nat Med*, 1999 Vol. Apr;5(4):434-8.
155. Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. “Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of

- VEGFR2(+)/AC133(+) endothelial precursor cells”, *Circ Res*, Vol. 88, no. 2, 2001, pp. 167-74.
156. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Böhm M, Nickenig G. “Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation”, *Circulation*, Vol. 107, no. 24, 2003, pp. 3059-65.
157. Adams V, Lenk K, Linke A, Lenz D, Erbs S, Sandri M, Tarnok A, Gielen S, Emmrich F, Schuler G, Hambrecht R. “Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia”, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol. 24, no. 4, 2004, pp. 684-90
158. Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, Kerbel RS. “The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification”, *Nat Rev Cancer*, Vol. 6, no. 11, 2006, pp. 835-45.
159. Hristov M, Erl W, Weber PC. “Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing”, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol. 23, no. 7, 2003, pp. 1185-9.
160. Conway EM, Carmeliet P. “The diversity of endothelial cells: a challenge for therapeutic angiogenesis”, *Genome Biol*, Vol. 5, no. 2, 2004, pp. 207.
161. Duan HX, Cheng LM, Wang J, Hu LS, Lu GX. “Angiogenic potential difference between two types of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood”, *Cell Biol Int*, Vol. 30, no. 12, 2006, pp. 1018-27.
162. Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, Martin PJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF. “Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation”, *Circ Res*, Vol. 87, no. 9, 2000, pp. 728-30.
163. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. “Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells”, *J Clin Invest*, Vol. 107, no. 11, 2001, pp. 1395-402.
164. Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Böhm M, Nickenig G. “Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury”, *Circ Res*, Vol. 93, no. 2, 2003, e17-24.
165. Xu Q, Zhang Z, Davison F, Hu Y. “Circulating progenitor cells regenerate endothelium of vein graft atherosclerosis, which is diminished in ApoE-deficient mice”, *Circ Res*, Vol. 93, no. 8, 2003, e76-86.
166. Gao D, Nolan D, McDonnell K, Vahdat L, Benezra R, Altorki N, Mittal V. “Bone marrow-derived endothelial progenitor cells contribute to the angiogenic switch in tumor growth and metastatic progression”, *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1796, no. 1, 2009, pp. 33-40.
167. Peters BA, Diaz LA, Polyak K, Meszler L, Romans K, Guinan EC, Antin JH, Myerson D, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW, Lengauer C. “Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature”, *Nat Med*, Vol. 11, no. 3, 2005, pp. 261-2.
168. Purhonen S, Palm J, Rossi D, Kaskenpää N, Rajantie I, Ylä-Herttuala S, Alitalo K, Weissman IL, Salven P. “Bone marrow-derived circulating endothelial precursors do not contribute to vascular endothelium and are not needed for tumor growth”, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 105, no. 18, 2008, pp. 6620-5.

169. Kopp HG, Ramos CA, Rafii S. "Contribution of endothelial progenitors and proangiogenic hematopoietic cells to vascularization of tumor and ischemic tissue", *Curr Opin Hematol*, Vol. 13, no. 3, 2006, pp. 175-81.
170. Kerbel RS, Benezra R, Lyden DC, Hattori K, Heissig B, Nolan DJ, Mittal V, Shaked Y, Dias S, Bertolini F, Rafii S. "Endothelial progenitor cells are cellular hubs essential for neoangiogenesis of certain aggressive adenocarcinomas and metastatic transition but not adenomas", *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 105, no. 34, 2008, E54.
171. Sata M. "Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair, remodeling, and lesion formation", *Trends Cardiovasc Med*, Vol. 13, no. 6, 2003, pp. 249-53.
172. Rigolin GM, Fraulini C, Ciccone M, Mauro E, Bugli AM, De Angeli C, Negrini M, Cuneo A, Castoldi G. "Neoplastic circulating endothelial cells in multiple myeloma with 13q14 deletion", *Blood*, Vol. 107, no. 6, 2006, pp. 2531-5.
173. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. "Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand", *Cell*, Vol. 109, no. 5, 2002, pp. 625-37.
174. Xiao Q, Ye S, Oberhollenzer F, Mayr A, Jahangiri M, Willeit J, Kiechl S, Xu Q. "SDF1 gene variation is associated with circulating SDF1alpha level and endothelial progenitor cell number: the Bruneck Study", *PLoS One*, Vol. 3, no. 12, 2008, e4061.
175. Kimura T, Boehmler AM, Seitz G, Kuçi S, Wiesner T, Brinkmann V, Kanz L, Möhle R. "The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 supports CXCR4-dependent migration and bone marrow homing of human CD34+ progenitor cells", *Blood*, Vol. 103, no. 12, 2004, pp. 4478-86.
176. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. "Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization", *Circulation*, Vol. 107, no. 9, 2003, pp. 1322-8.
177. Fujiyama S, Amano K, Uehira K, Yoshida M, Nishiwaki Y, Nozawa Y, Jin D, Takai S, Miyazaki M, Egashira K, Imada T, Iwasaka T, Matsubara H. "Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells", *Circ Res*, Vol. 93, no. 10, 2003, pp. 980-9.
178. Vajkoczy P, Blum S, Lamparter M, Mailhammer R, Erber R, Engelhardt B, Vestweber D, Hatzopoulos AK. "Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis", *J Exp Med*, Vol. 197, no. 12, 2003, pp. 1755-65.
179. Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, Sasaki K, Kaiser R, El Makhfi N, Urbich C, Peters T, Scharffetter-Kochanek K, Zeiher AM, Chavakis T, Dimmeler S. "Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells", *J Exp Med*, Vol. 201, no. 1, 2005, pp. 63-72.
180. Walter DH, Dimmeler S. "Endothelial progenitor cells: regulation and contribution to adult neovascularization", *Herz*, Vol. 27, no. 7, 2002, pp. 579-88.

181. Prater DN, Case J, Ingram DA, Yoder MC. "Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells", *Leukemia*, Vol. 21, no. 6, 2007, pp. 1141-9.
182. Gulati R, Jevremovic D, Peterson TE, Chatterjee S, Shah V, Vile RG, Simari RD. "Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood", *Circ Res*, Vol. 93, no. 11, 2003, pp. 1023-5.
183. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. "Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization", *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 97, no. 7, 2000, pp. 3422-7.
184. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC." Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood", *Blood*, Vol. 104, no. 9, 2004, pp. 2752-60. Epub 2004 Jun 29.
185. Mead LE, Prater D, Yoder MC, Ingram DA. "Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from human blood", *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 2008 Jul; Chapter 2:Unit 2C.1.
186. Fuchs S, Hermanns MI, Kirkpatrick CJ. "Retention of a differentiated endothelial phenotype by outgrowth endothelial cells isolated from human peripheral blood and expanded in long-term cultures", *Cell Tissue Res*, Vol. 326, no. 1, 2006, pp. 79-92.
187. Taddeo A, Presicce P, Brambilla L, Bellinvia M, Villa ML, Della Bella S. "Circulating endothelial progenitor cells are increased in patients with classic Kaposi's sarcoma", *J Invest Dermatol*, Vol. 128, no. 8, 2008, pp. 2125-8.
188. Della Bella S, Taddeo A, Calabrò ML, Brambilla L, Bellinvia M, Bergamo E, Clerici M, Villa ML. "Peripheral blood endothelial progenitors as potential reservoirs of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus", *PLoS One*, Vol. 3, no. 1, 2008, e1520.
189. 26. Flamand L, Zeman RA, Bryant JL, Lunardi-Iskandar Y, Gallo RC. "Absence of human herpesvirus 8 DNA sequences in neoplastic Kaposi's sarcoma cell lines", *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, Vol. 13, 1996, pp. 194-197.
190. Rafii S, Meeus S, Dias S, Hattori K, Heissig B, Shmelkov S, Rafii D, Lyden D. "Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration", *Semin Cell Dev Biol*, Vol. 13, no. 1, 2002, pp. 61-7. Review.
191. Sieveking DP, Buckle A, Celermajer DS, Ng MK. "Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay", *J Am Coll Cardiol*, Vol. 51, no. 6, 2008, pp. 660-8
192. Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB. "Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol. 24, no. 2, 2004, pp. 288-93.
193. Stroncek JD, Grant BS, Brown MA, Povsic TJ, Truskey GA, Reichert WM. "Comparison of endothelial cell phenotypic markers of late-outgrowth endothelial progenitor cells isolated from patients with coronary artery disease and healthy volunteers", *Tissue Eng Part A*, Vol. 15, no. 11, 2009, pp. 3473-86.
194. Della Bella S, Nicola S, Brambilla L, Riva A, Ferrucci S, Presicce P, Boneschi V, Berti E, Villa ML. "Quantitative and functional defects of dendritic cells in classic Kaposi's sarcoma", *Clin Immunol*, Vol. 119, no. 3, 2006, pp. 317-29.

195. Mori Y, Nishimoto N, Ohno M, Inagi R, Dhepakson P, Amou K, Yoshizaki K, Yamanishi K. "Human herpesvirus 8-encoded interleukin-6 homologue (viral IL-6) induces endogenous human IL-6 secretion", *J Med Virol*, Vol. 61, no. 3, 2000, pp. 332-5.
196. Speciale L, Biffi R, Mancuso R, Borghi E, Mazziotti R, Ferrante P. "Big endothelin-1 and interleukin-6 modulation in human microvascular endothelial cells after human herpesvirus 8 infection", *Exp Biol Med*, Vol. 231, no. 6, 2006, pp. 1171-5.
197. Dezube B.J., Zambela M., Sage D.R., Wang J.-F., Fingerroth J. "Characterization of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 infection of human vascular endothelial cells: early events", *Hem Thromb Vasc Biol*, Vol. 100, 2002, pp. 888-896
198. Lagunoff M, Bechtel J, Venetsanakos E, Roy AM, Abbey N, Herndier B, McMahon M, Ganem D. "De novo infection and serial transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured endothelial cells", *J Virol*, Vol. 76, no. 5, 2002, pp. 2440-8.
199. Moses, A. V., Fish, K. N., Ruhl, R., Smith, P. P., Strussenberg, J. G., Zhu, L., et al. "Long-term infection and transformation of dermal microvascular endothelial cells by human herpesvirus 8", *J. Virol*, Vol. 73, 1999, pp. 6892-6902.
200. Ciuffo DM, Cannon, JS, Poole, L J, Wu, FY, Murray P, Ambinder, R F. "Spindle cell conversion by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: Formation of colonies and plaques with mixed lytic and latent gene expression in infected primary dermal microvascular endothelial cell cultures", *J. Virol*, Vol. 75, 2001, pp. 5614–5626
201. Ensoli B and Sturzl M. "Kaposi's sarcoma: a result of the interplay among inflammatory cytokines, angiogenic factors and viral agents", *Cytokine Growth Factor Rev*, Vol. 9, 1998, pp. 63–83.
202. Foglieni C, Scabini S, Belloni D, Broccolo F, Lusso P, Malnati MS, Ferrero E. "Productive infection of HUVEC by HHV-8 is associated with changes compatible with angiogenic transformations", *Eur J Histochem*, Vol. 49, no. 3, 2005, pp. 273-84.
203. Sharma-Walia N., Paul A.G., Bottero V., Sadagopan S., Veettil V. M., Kerur N., Chandran B. "Kaposi's sarcoma associated herpes virus (KSHV) induced COX-2: a key factor in latency, inflammation, angiogenesis, cell survival and invasion", *Plos Pathogens*, Vol. 6, 2010.
204. Burgdorf WH, Mukai K, Rosai J. "Immunohistochemical identification of factor VIII-related antigen in endothelial cells of cutaneous lesions of alleged vascular nature", *Am J Clin Pathol*, Vol. 75, no. 2, 1981, pp. 167-71.
205. Russell Jones R, Orchard G, Zelger B, Wilson Jones E. "Immunostaining for CD31 and CD34 in Kaposi sarcoma", *J Clin Pathol*, Vol. 48, no. 11, 1995, pp. 1011-6.