

CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI E CANCRO PROSTATICO

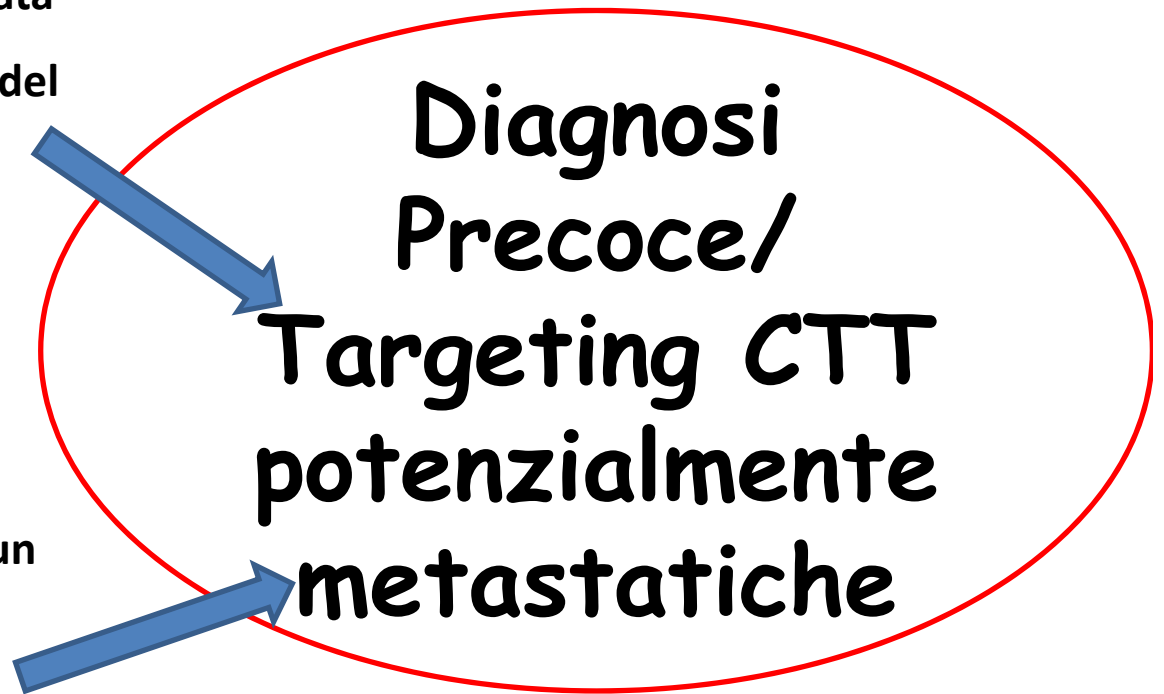
Prof Federico Licastro

Dipartimento di Medicina Specialistica Diagnostica e
Sperimentale, Università di Bologna. ITALY

Il cancro alla prostata (PCa) è il tumore più frequentemente diagnosticato nell'uomo ed è la principale causa di morbidità e mortalità negli uomini dopo i 50 anni.

Nei pazienti con tumore alla prostata (confinato) l'incidenza di morte è del 20.7% a 15 anni

I soggetti che invece sviluppano metastasi dopo l'intervento hanno un rischio di morte del 42% a 5 anni



Brockman J., et al Eur. Urol., September 2014

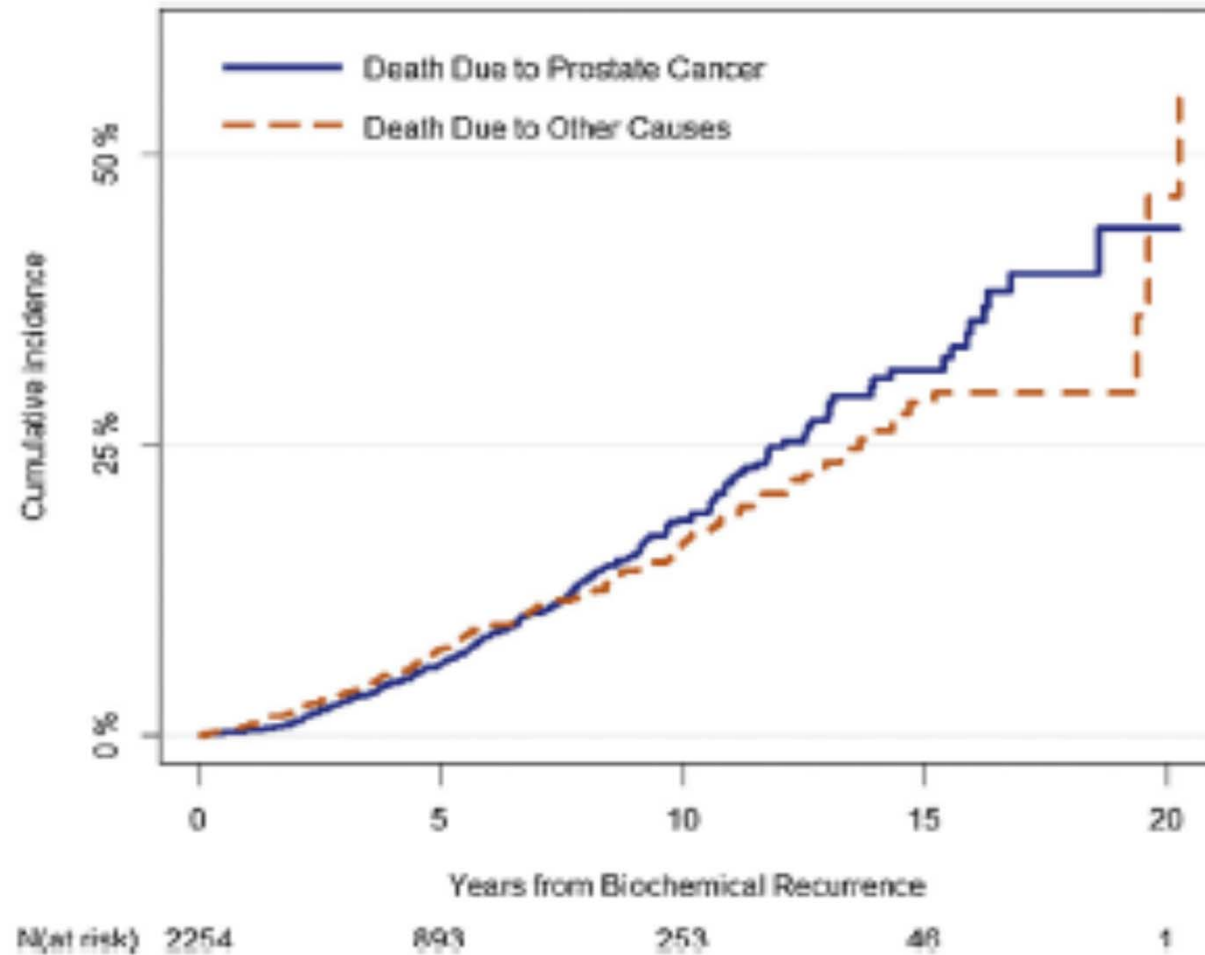


Fig. 1 – Prostate cancer-specific mortality and competing-causes mortality among 2254 men with biochemical recurrence of prostate cancer after radical prostatectomy.

Dal Maso L. et al. Ann. Oncol. Agosto 2014

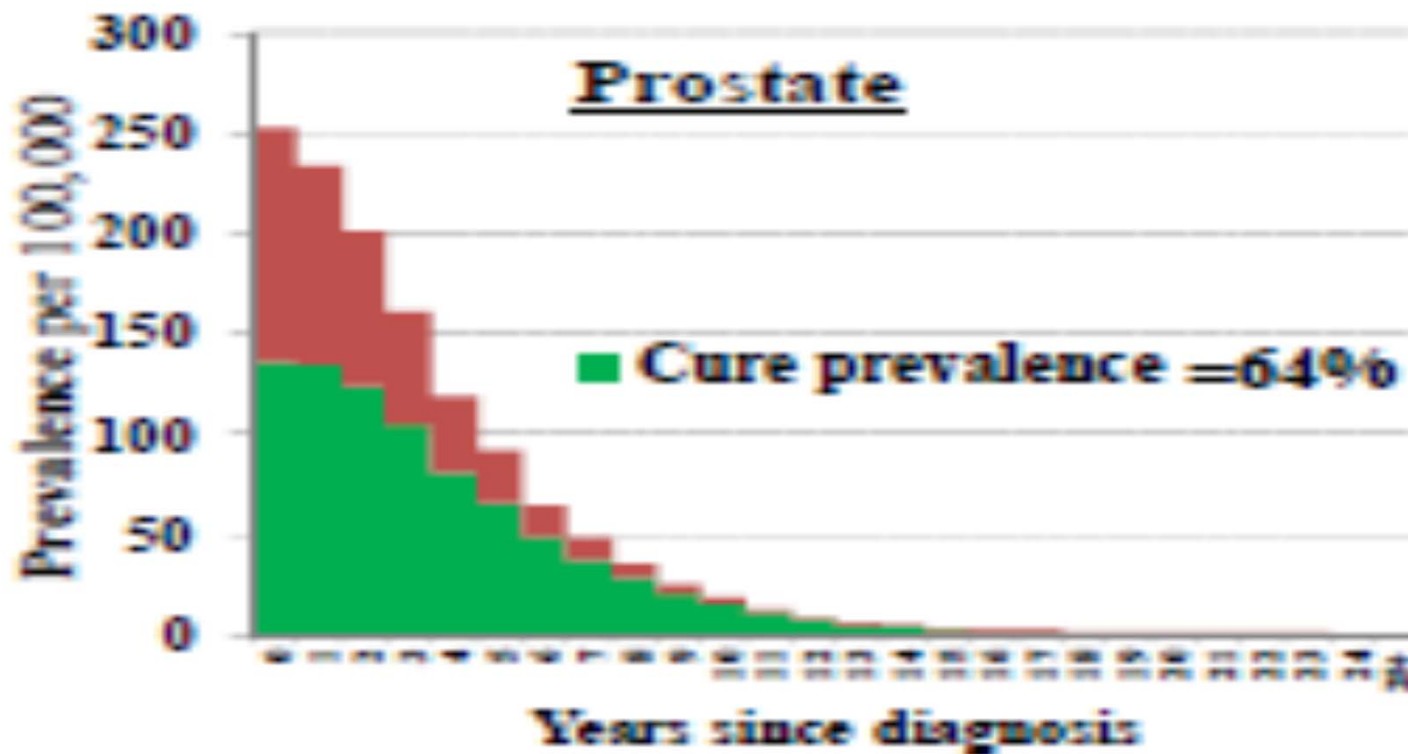
Table 1. Estimated cure fraction by cancer type, sex, and age at diagnosis. ¹ Italy 1985-2005

Cancer type, ICD10	Cure fraction (%)							
	Men				Women			
	age (years)				age (years)			
	15-44	45-54	55-64	65-74	15-44	45-54	55-64	65-74
Oral cavity, C01-14	42	27	19	13	60	45	37	29
Oesophagus, C15	16	9	6	4	10	9	8	8
Stomach, C16	44	31	25	19	42	35	31	28
Colon and rectum, C18-21	54	50	48	45	57	53	51	49
Liver, C22	7	3	2	1	12	6	4	2
Gallbladder, C23-24	26	15	11	7	18	12	9	7
Pancreas, C25	6	4	3	2	17	7	4	2
Larynx, C32	49	39	34	29	49	39	34	29
Lung, C33-34	17	11	8	6	30	16	11	7
Skin melanoma, C43	77	67	61	54	85	78	73	68
Connective tissue, C47,C49	67	54	47	39	60	52	47	43
Breast, C50					40	60	54	56
Vagina and vulva, C51-52					75	60	51	41
Cervix uteri, C53					77	64	56	46
Corpus uteri, C54					91	83	76	66
Ovary, C56					62	40	28	17
Prostate, C61	47	49	50	50				
Testis, C62	94	90	86	83				
Kidney, C64-66,68	65	51	43	35	75	62	55	46
Bladder, C67, D09.0, D30.3, D41.4	81	63	50	35	89	75	63	48
Brain, C70-72	35	12	5	2	41	15	7	2
Thyroid, C73	95	75	60	43	99	94	84	65
Hodgkin lymphoma, C81	80	63	38	35	79	74	50	33
Non-Hodgkin lymphoma, C82-85,96	45	35	30	26	56	40	31	22
Multiple myeloma, C88-90	20	11	12	11	35	23	9	12
Leukaemia, C91-95	18	12	9	7	18	12	9	7

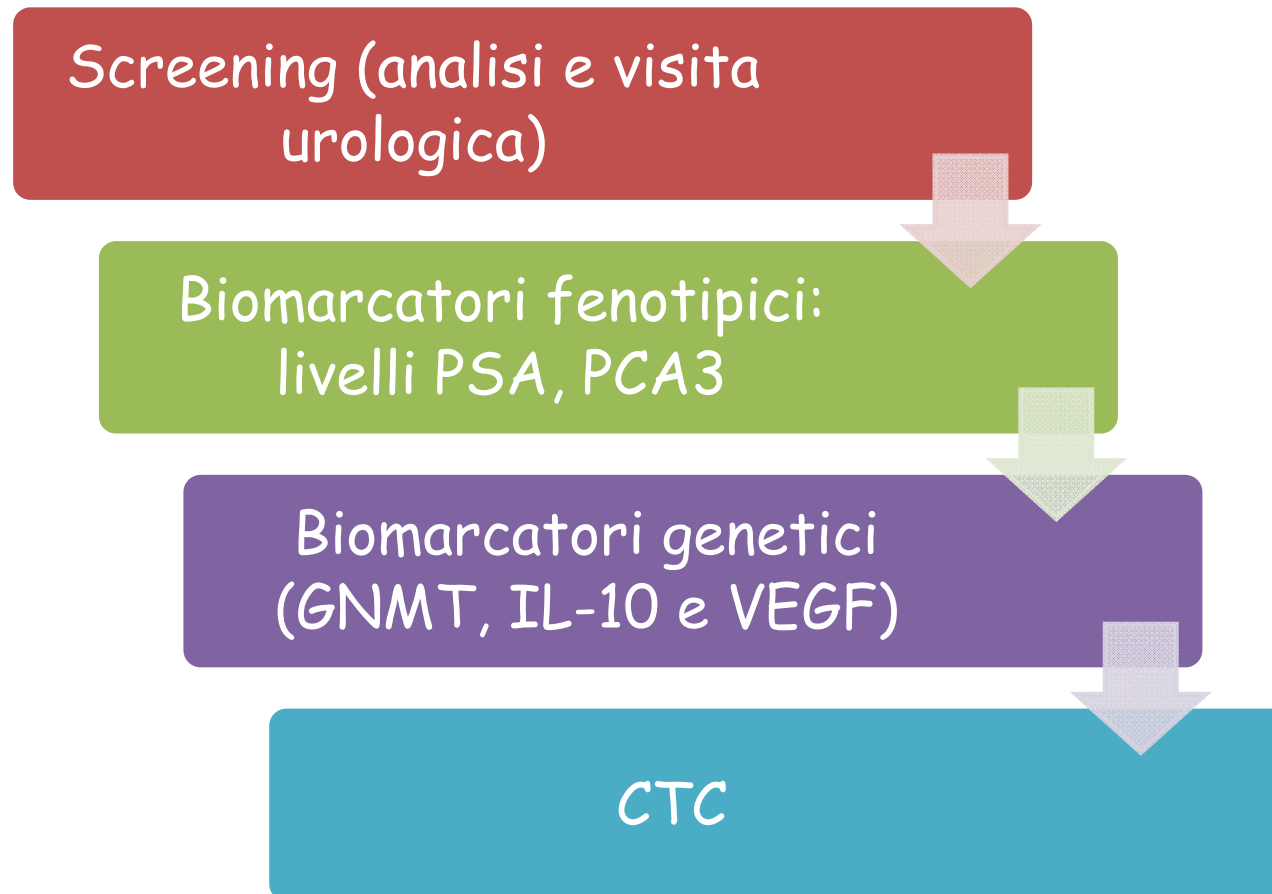
¹ Age 15-74 years.

Sopravvivenza a lungo termine

Dal Maso L. et al. Ann. Oncol. Agosto 2014



Diagnosi precoce (passato-presente-futuro)



In 7.5 ml di
sangue
interno

Quante sono le CTC???

	# pat	≥1	≥5	≥10	≥50	≥100	≥500	≥1000
Normal	295	3.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Benign	255	7.5	0.4	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0
Breast	177	70.6	49.7	38.4	20.9	15.8	3.4	2.8
Colorectal	413	47.5	18.2	11.6	2.4	1.0	0.0	0.0
Prostate	218	77.5%	57.3	45.0	20.6	13.8	3.7	2.3

Miller CM et al, Journal of Oncology 2010

**Questo studio è stato
effettuato con il Search
Cell**

In 30 ml di sangue
possiamo trovare 200
cellule tumorali circolanti

Selezione pazienti

Pazienti scelti:

Pazienti sottoposti a prostatectomia radicale con alto rischio di sviluppare metastasi

Materiale da prelevare:

Circa 35-50 cc di sangue venoso periferico in provette con EDTA.

Parametri di inclusione per l'arruolamento:

Gleason Score > 7 (4+4, 5+4, 5+5)

> 2 cores biotici positivi con più del 10% di tessuto tumorale

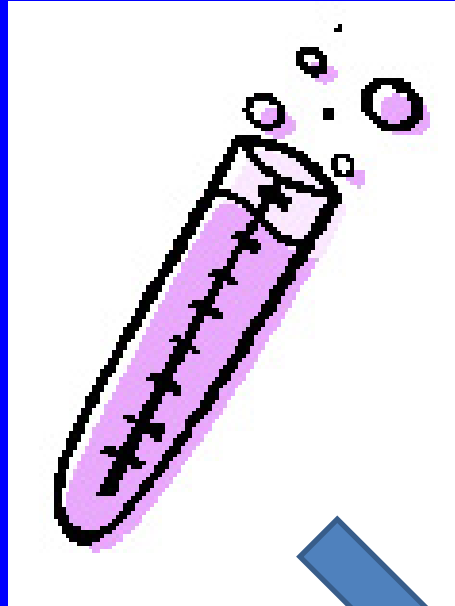
PSA > 10 ng/mL

Stadio Clinico cT2-cT3

Follow-up dei pazienti per monitorare il loro andamento clinico e per segnalare eventuali terapie adiuvanti nel database.

Protocollo operativo

30-40ml di
sangue



Circa 5-10ml sono stati
utilizzati per estrarre RNA
dai leucociti (da utilizzare
come controllo)

I rimanenti 25-30 ml sono
stati utilizzati per purificare
le CTC e estrarre gli RNA

Esperimenti preliminari sulle CTC

Purificazione delle cellule con Oncoquick un kit commerciale

Estrazione dell'RNA

Verifica delle CTC attraverso PCR specifica e attraverso metodiche sofisticate di analisi cellulare (DepArray)

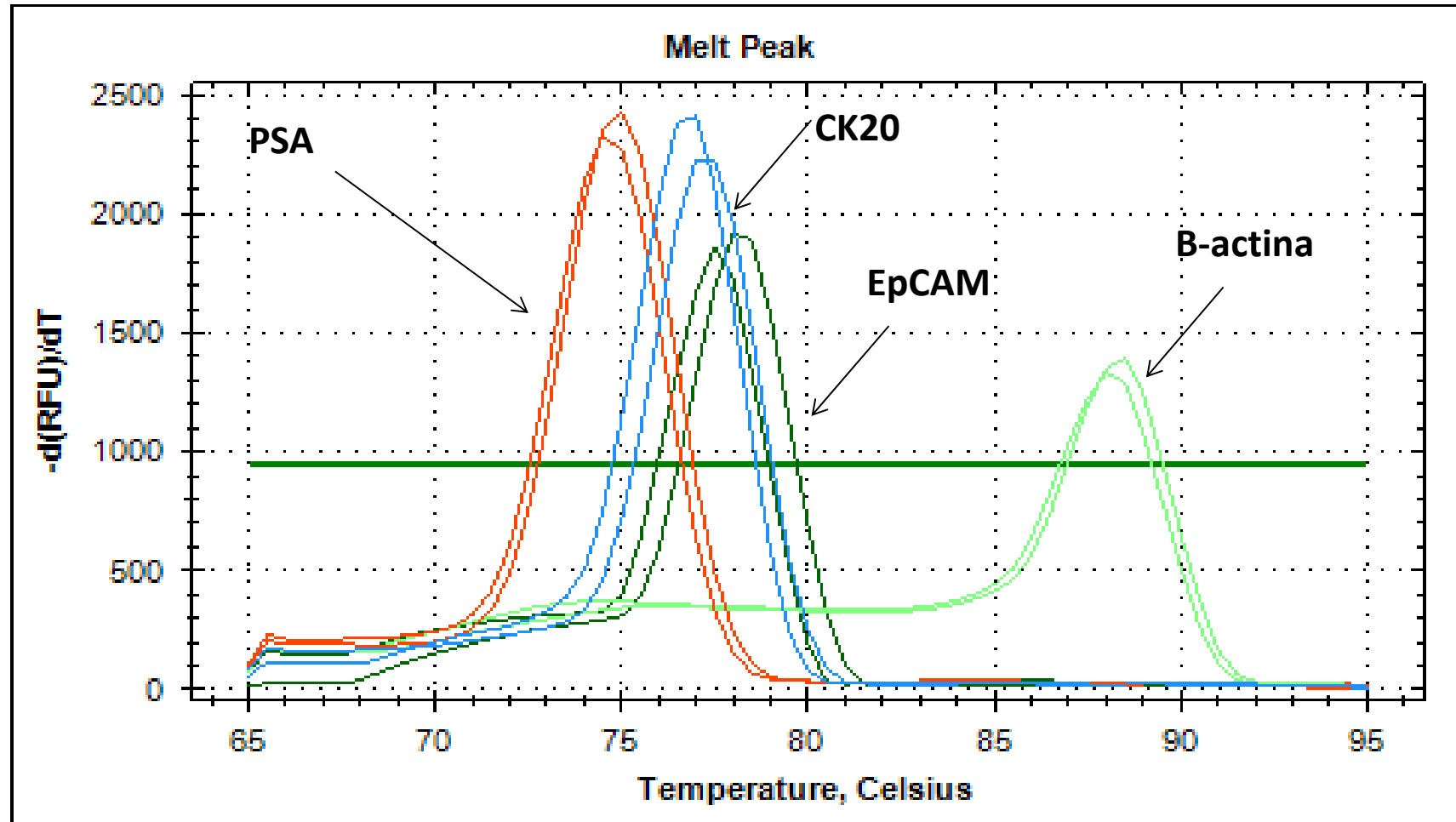
Principali marcatori delle CTC nel CA prostatico

PSMA (PSA di membrana)

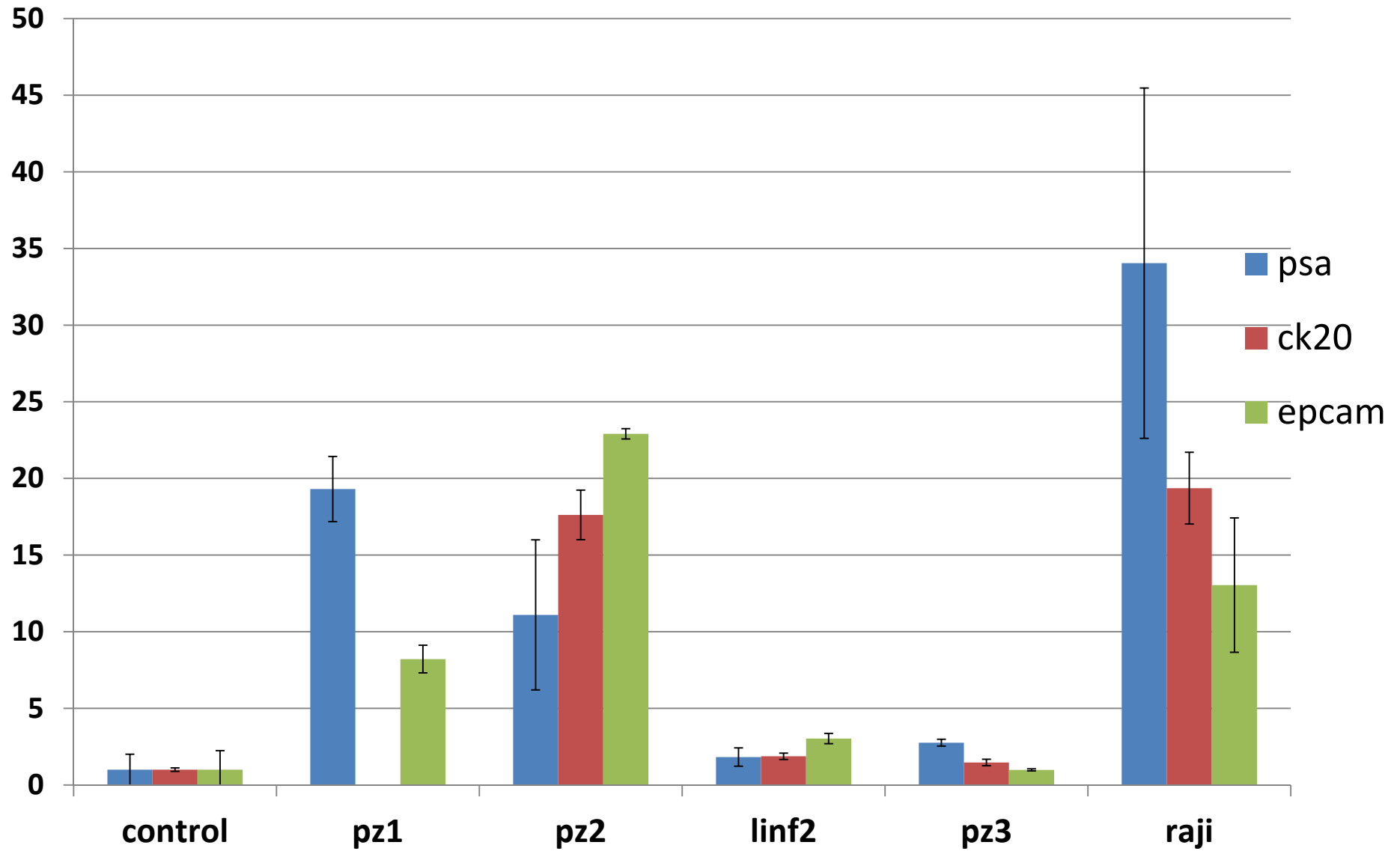
- EpCAM
- PCA3
- PSCA (Prostate stem cell antigen)
- hK2 (human kallicreina 2)
- CK (citocheratina)

Il limite di questo tipo di approccio metodologico è la scelta del marcatore. Per avere maggior sicurezza vanno scelti almeno 2 o 3 marcatori che devono avere un'espressione più alta dei controlli.

Curve di Melting dei geni analizzati (Real Time PCR)



Espressione di marcatori epiteliali specifici mediante real time PCR in Pazienti PCa e controlli



Determinazione CTC su sangue periferico mediante piattaforma DEEP-Array

	Group	dapi_0	dapi_pe_a pc_1	pe_2	apc_3	dapi_pe_4	dapi_apc_5	dapi_fitc_6	dapi_brig htfield_7
cell_id = 480 row_num = 1	L								
cell_id = 433 row_num = 2	L								
cell_id = 395 row_num = 3	L								
cell_id = 172 row_num = 4	L								
cell_id = 90 row_num = 5	L								
cell_id = 41 row_num = 6	L								
cell_id = 534 row_num = 7	L								

**Citocheratine /
EpCAM = PE
(segnale giallo)**
**CD45 = APC (segnale
rosso)**
**CD14 = FITC (segnale
verde)**
**Nucleo = Dapi
(segnale bianco/blu)**

CONCLUSIONI

- Le cellule CTC sono difficili da isolare.
- Le tecniche derivate dalla biologia molecolare sono molto utili nella tipizzazione dei campioni cellulari isolati.
- L'espansione in vitro è indispensabile per la ricerca di nuovi marcatori, la conseguente cattura dal sangue periferico di cellule positive e l'analisi del profilo di mRNA specifici per CTC.

Ringraziamenti

- Dr. Elisa Porcellini, PhD, DIMES, Bologna.
- Dr. Alessandro Bertaccini, urologo, DIMES, Policlinico Bologna.
- Prof. Giuseppe Martorana, urologo, DIMES, Policlinico Bologna.
- Dr. Wainer Zoli, Ist. Oncologico Romagnolo