



Università degli Studi di Sassari

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

Identificazione delle Cellule Tumoriali Circolanti
nell'Epatocarcinoma

Relatore:

Prof. Roberto Manetti

Correlatrice:

Dott.ssa Grazia Galleri

Tesi di Laurea di:

Leonardo Agate

Anno Accademico 2015-2016

INDICE

Cellule Tumorali Circolanti (CTC)	1
Neoplasie e cellule tumorali in transito (CTC)	3
Metodiche per lo studio delle CTC	4
Tipizzazione molecolare e genetica delle CTC	14
Applicazioni cliniche dell'isolamento delle CTC	17
Carcinoma Epatocellulare.....	24
Epatocarcinoma e CTC.....	28
Materiali e metodi.....	33
Reclutamento Pazienti.....	33
Metodiche	34
Anticorpi Utilizzati	36
Citofluorimetria	45
Risultati	49
Discussione e prospettive future.....	54
Bibliografia	57

CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI (CTC)

Definizione: la prima descrizione in letteratura della presenza delle cellule tumorali circolanti (CTC) nel sangue periferico dei pazienti oncologici fu riportata nel 1869.

Esse vengono definite come cellule tumorali che originano sia dal tumore primitivo o dalla metastasi e circolano liberamente nel sangue periferico, midollo osseo o nei vasi linfatici; queste cellule hanno una grande potenzialità di dare metastasi a distanza, circolando nel torrente circolatorio e viaggiando nei tessuti di vari organi.

Inoltre, sono estremamente rare nella popolazione sana (6,9).

Fisiopatologia (1,2)

l'invasione tumorale e le metastasi sono il risultato di complesse interazioni tra le cellule neoplastiche e lo stroma dei normali tessuti e costituiscono la più importante causa di morbidità e mortalità correlata alla malattia tumorale.

I principali eventi che determinano l'invasione neoplastica e generano le *cellule tumorali circolanti* nel sangue e le metastasi sono:

- **distacco** delle cellule tumorali dalla massa neoplastica principale attraverso alterazioni delle molecole di adesione intercellulare come l'E-caderina (glicoproteina transmembranaria della famiglia delle caderine) che nel tessuto normale è la molecola responsabile dell'adesione e della trasmissione di segnali tra le cellule
- **degradazione** della matrice extracellulare (membrana basale e tessuto connettivo interstiziale): le cellule tumorali secernono

enzimi proteolitici e inducono le cellule stromali (fibroblasti, cellule infiammatorie) ad elaborare proteasi (metalloproteine della matrice, catepsina D, urokinase attivatore del plasminogeno).

I prodotti di degradazione del collagene e dei proteoglicani hanno effetti chemio tattici, angiogenetici e di fattori di crescita

- **alterazioni dei recettori** (integrine) delle cellule tumorali per la laminina ed il collagene della membrana basale (nei tessuti normali l'interazione tra le integrine cellulari e la laminina ed il collagene della membrana basale è responsabile della polarizzazione cellulare e mantiene le cellule in stato di riposo e le preserva dall'apoptosi): comporta la perdita della polarizzazione cellulare e la mobilità delle cellule tumorali
- **contrazioni dell'actina del citoscheletro** indotte dalle citochine tumorali (fattori di motilità autocrine), dai prodotti di degradazione della matrice extracellulare (collagene, laminina), dai fattori di crescita cellulare e da promotori paracrini della mobilità cellulare prodotti dalle cellule stromali (fattore di crescita epatocitario)
- **accesso al circolo sanguigno** attraverso l'adesione all'endotelio, la penetrazione della membrana basale vascolare e la creazione di una breccia.

Tutti questi eventi, tuttavia, sono controbilanciati da sistemi di protezione omeostatica che rende difficile la loro attuazione completa ed in breve tempo.

Recenti ricerche, infatti, hanno dimostrato che l'infiltrazione neoplastica del tessuto di origine e l'invasione stromale e vascolare sono eventi precoci nella tumorigenesi, ma il meccanismo di propagazione a distanza procede attraverso fasi patogenetiche che risultano "inefficienti" e sottoposte a severi controlli immunomediati, ai quali, con notevole frequenza, la cellula tumorale non sopravvive.

Studi sperimentali hanno evidenziato che ogni giorno, dal tumore primario, vengono immesse in circolo milioni di cellule tumorali (1 milione di cellule tumorali/grammo di tumore), tuttavia la quantità di cellule neoplastiche che sopravvive è scarsa (l'85% delle cellule tumorali in circolo scompare dopo 5 min. dall'immissione nel sangue periferico) ed il numero di metastasi che esse generano è molto basso (il 2,5% delle CTC genera micrometastasi e lo 0,01% genera macrometastasi).

Neoplasie e cellule tumorali in transito (CTC)

In letteratura sono riportati studi su CTC (nel sangue) derivate da neoplasie di pazienti con malattia tumorale metastatica.

Le neoplasie oggetto di questi studi sono:

- tumori polmonari
- carcinomi prostatici
- carcinomi pancreatici

- carcinomi della mammella
- carcinomi del grosso intestino
- epatocarcinomi

In queste neoplasie le CTC sono state **isolate** con diverse tecniche e sono state **contate**.

In alcuni pazienti con tumori metastatici, trattati con chemioterapici, la quantità di CTC nel sangue ha subito una variazione temporale che si correlava bene con il decorso clinico della malattia (4).

In alcuni studi le CTC sono state isolate in pazienti con malattia tumorale in stadio precoce (3,4).

Metodiche per lo studio delle CTC

Varie metodiche sono state utilizzate per lo studio delle CTC nel sangue con il fine di ottenere una concentrazione (arricchimento) della popolazione cellulare in studio e la loro esatta identificazione (6):

- ***Tecniche di isolamento delle CTC in base alla morfologia:***
 - ISET ("Isolation by size of epithelial tumor cells): sono microfiltri che isolano le cellule in base alle loro dimensioni
 - Isolamento delle cellule in base al gradiente di densità; si utilizzano
 - anche anticorpi con doppi "domain" che legano cellule indesiderate del

- sangue periferico agli eritrociti formando immunorosette eliminabili per
- la densità maggiore acquisita
- **Immunoistochimica:** impiego di anticorpi che marcano le cellule epiteliali tumorali (EpCAM, Citocheratine di vario peso molecolare) o marker tumorali specifici (alfa-fetoproteina, Her2-neu, MUC1/MUC2, mammaglobulina e CEA) (6) in associazione ad anticorpi che marcano le cellule nucleate del sangue (CD45RB).

L'osservazione al microscopio consente l'individuazione delle CTC (es. EpCAM positive/CD45RB negative) tra le cellule ematiche (CD45RB positive/EpCAM negative).

L'immunoistochimica si è rivelata utile anche nell'isolare e tipizzare le cellule neoplastiche nei tessuti: dalle sezioni tissutali tumorali ottenute da frammenti di tumore inclusi in paraffina (utilizzati di routine per le indagini istopatologiche).

Con tale metodica si è potuto comparare le caratteristiche morfologiche ed immunofenotipiche delle CTC con le cellule componenti il tumore primitivo e le metastasi

- **Immunofluorescenza:** si utilizzano anticorpi che legano antigeni epiteliali (Ep-CAM) previa coniugazione con un fluorocromo: la cellula neoplastica circolante nel sangue, marcata dall'anticorpo fluorescinato, viene evidenziata dalla sua fluorescenza visibile al microscopio dedicato.
- **Tecniche di biologia molecolare**

-- ibridazione in situ: consente di rivelare sequenze specifiche di acidi nucleici (RNA, DNA) nelle cellule morfologicamente conservate, mediante l'impiego di sonde geniche, marcate con traccianti di diversa natura.

Con questa tecnica si possono evidenziare (mediante le apposite sonde) le alterazioni geniche presenti nelle cellule tumorali (5).

-- PCR (reazione polimerasica a catena): permette di evidenziare e studiare piccolissime quantità di acidi nucleici e si tratta di un metodo di amplificazione del DNA che permette di ottenere quantità di acido nucleico misurabile, identificabile e con caratteristiche sempre migliori nei cicli di copiatura (5).

L'impiego di tali tecniche di biologia molecolare nello studio dell'CTC ha permesso di evidenziare le alterazioni geniche più frequenti ad esse associate ed in alcuni casi (epatocarcinoma) anche la loro eterogeneità genica che rende ragione delle notevoli difficoltà riscontrate nella tipizzazione immunofenotipica e nella conta numerica nel sangue periferico. Tuttavia, la scoperta dell'eterogeneità genetica delle CTC nel sangue e nella massa tumorale primitiva e secondaria (metastasi) ha fornito dati importanti sulla selezione di cloni cellulari neoplastici più aggressivi e capaci di colonizzare organi diversi da quello da cui trae origine il tumore primitivo

--RT-PCR (Reverse Transcriptase/trascrittasi inversa)-PCR: è una tecnica che consente di amplificare una molecola di DNA partendo da un pool di RNA di tipo cellulare: valgono le stesse

regole della PCR, in più ci sono differenze dovute alla trasformazione (retro trascrizione) del mRNA in cDNA.

La trascrittasi inversa-PCR quantitativa “real-time” (qRT-PCR) è una tecnica più nuova che riduce notevolmente i risultati falsi positivi, utilizzando delle sonde interne e aumenta la specificità della PCR.

qRT-PCR migliora la specificità per le CTC poiché consente di stabilire un valore di “cutoff” per l’espressione di marcatori genici nel sangue periferico sopra il quale viene considerato un “segnale reale” di CTC.

Inoltre, grazie alla misurazione continua del segnale amplificato, i risultati falsi positivi possono essere facilmente identificati e rimossi.

Xi et al. (6) hanno individuato ottimi marcatori per sei diversi tumori:

-melanoma:TYR

-carcinoma mammario: MGB2

-carcinoma del colon: TM4SF3

-carcinoma esofageo: CK19

-carcinoma della testa/collo: EGFR

-carcinoma polmonare: SFTPB

- ***Citometria a flusso***

Si avvale di un’apparecchiatura che aspira in una camera a flusso le cellule comprese in un mezzo (es: sangue), le diluisce e le allinea tramite un sistema fluido a flusso laminare.

Le cellule che interessano vengono marcate da anticorpi monoclonali coniugati a molecole fluorescenti che legano antigeni specifici presenti nella stessa cellula (es: EpCAM legano selettivamente CTC).

Le cellule vengono singolarmente attraversate da un fascio laser che eccita i fluorocromi ed il segnale luminoso viene captato da un rivelatore.

Quest'ultimo trasduce il segnale analogico in segnale digitale ed elabora un diagramma che, letto dagli addetti al lavoro, fornisce diversi dati qualitativi e quantitativi relativi al campione cellulare indagato:

- informazioni statistiche di alta precisione

- quantifica le varie sottopopolazioni cellulari contenute nel mezzo

- isola la popolazione cellulare da studiare

Inoltre possiede alta specificità per la capacità di effettuare, rapidamente ed anche per singole cellule, simultanee analisi multiparametriche: contenuto del DNA, dimensioni cellulari, vitalità cellulare e marker intra-extracellulari.

Lo svantaggio della tecnica è la bassa sensibilità (1 CTC/10⁴-10⁵ cellule ematiche) rispetto alla RT-PCR (1 CTC/10⁶ cellule ematiche)

- ***Tecniche immunoenzimatiche***

- Epitelial immunospot (EPISPOT): tecnologia basata su immunospot test legati ad enzimi.

Evidenzia le CTC mediante l'individuazione di specifiche proteine (Citocheratine, MUC, PSA etc.) da loro secrete.

Questa tecnica può evidenziare solo cellule vitali, poiché le cellule necrotiche non secernono proteine in quantità adeguata per essere individuate.

Nella valutazione della CK19, rilasciata dalle cellule tumorali, la sensibilità dell'EPISPOT è due volte superiore a quello dell'ELISA.

Nei lavori di ricerca, le CTC sono state indagate mediante le tecniche di laboratorio sopra riportate, usate singolarmente o combinate tra loro (6); in alcuni casi le metodiche utilizzate (nuova generazione) sono state esse stesse oggetto di ricerca e sono state perfezionate tecnicamente al fine di isolare con maggiore precisione le cellule neoplastiche presenti nel sangue e di evitare falsi positivi e falsi negativi (3,4,6):

- **CellSearch System** (Veridex LLC, Raritan, New Jersey, U.S.A.) (3): *combinazione di tecnica immunoistochimica e fisica (tecnica immunomagnetica).*

E' l'unica tecnica di separazione immunomagnetica, automatizzata, all'avanguardia, autorizzata dalla FDA per la routine clinica dell'isolamento delle CTC in pazienti con carcinoma della mammella metastatizzato, carcinoma del grosso intestino e carcinoma prostatico.

E' una tecnica che utilizza anticorpi (EpCAM) coniugati con microscopiche particelle di ferro (nanoparticelle ferro fluide);

l'anticorpo marcato si lega alle cellule epiteliali neoplastiche con alta specificità e sensibilità.

Il sangue che contiene le CTC legate all'anticorpo/ferro fluido viene sottoposto all'azione di un potente magnete (generatore di un campo magnetico) che estrae le sole CTC marcate ("purificazione immunomagnetica").

Una successiva triplice marcatura con CK8/18/19, DAPI e CD45 permette di selezionare con assoluta precisione le CTC (CK8/18/19pos e CD45neg.) scartando i leucociti del sangue (CK8/18/19neg e CD45pos.)

Con questa tecnica si può:

- ottenere un campione di sole cellule neoplastiche per la conta
- numerica/volume di sangue intero
- arricchire i campioni per studi morfologici, molecolari e farmacologici
- individuare negli stadi precoci della malattia neoplastica la presenza di CTC circolanti potenzialmente metastatizzanti (rappresenta il futuro della diagnostica).

La valutazione qualitativa e/o quantitativa delle cellule EpCAM/ferro fluido positive viene effettuata dopo colorazione delle stesse con metodiche chimiche e/o biomolecolari e con l'ausilio di particolari sistemi o strumenti (es. microscopi elettronici).

In uno studio multicentrico, Rethdorf et al. hanno verificato che il CellSerch System possiede un'alta percentuale di recupero pari

all'82%, un'alta specificità e riproducibilità di astrazione delle CTC nelle pazienti con carcinoma mammario metastatico.

- **“microfluid system” (“CTC-chip”)**: dispositivo complesso (tecnologia con microchip) che utilizza:
 - “micro post” resi funzionali mediante legame con anticorpi anti molecole di adesione cellulare epiteliale (Ep-CAM) che legano selettivamente le CTC
 - “microfluidic chip” (circuiti integrati incisi nel silicone)
 - sistema di pompe pneumatiche

L'apparecchiatura tecnicamente complessa, isola le CTC vitali tenendo in considerazione due importanti parametri:

- -la *velocità di flusso*: influenza la durata del contatto delle “cell- micropost” (CTC marcate) con lo strumento
- -la *forza di deformazione* delle cellule: che deve essere sufficientemente bassa per assicurare la massima adesione delle “cell-micropost”

Il sangue viene pompato attraverso i chip a velocità e forza di deformazione strettamente controllate; i “micro post” coniugati all'anticorpo anti Ep-CAM permettono la cattura delle CTC direttamente; successivamente le CTC vengono confermate dalla loro positività ad anticorpi anti citocheratine (CAM 5.2); i leucociti CD45posit./CK neg. vengono scartati.

Questa tecnica ha mostrato una sensibilità (99.1%) ed una specificità (100%) altissima per le CTC di carcinomi polmonari, colon-rettali, prostatici, mammari e pancreatici.

- **AdnaTest (AdnaGen):** mediante anticorpi epitelio-specifici ed anticorpi tumore-specifici, coniugati con microparticelle magnetiche, vengono isolate le CTC che vengono, successivamente, sottoposte ad una analisi con PCR-RT multipla e così si facilita il riconoscimento mediante i loro geni “tumore associati”.
- **Fiber-optic Array Scanning Tecnology (FAST):** è un rapido ed accurato sistema citometrico di localizzazione delle CTC, corredato di un campo visivo eccezionalmente ampio (50,341 mm) che rende possibile l’osservazione di CTC marcati con anticorpi coniugati con molecole fluorescenti e raccolte su di un supporto di vetro (come il vetrino portaoggetto) e consente una percentuale di scansione 500 volte più veloce del convenzionale microscopio digitale automatizzato (ADM) consentendo al FAST di intercettare le CTC senza procedure di arricchimento.

Per evitare i risultati falsi positivi il sistema è dotato di un database con falsi e veri positivi che ottimizza le immagini filtrate.

In un lavoro di ricerca con un limitato numero di casi (5 pazienti), in tutti i pazienti con carcinoma colon-rettale furono individuate CTC mediante FAST: da 12 a 282 CTC/ml di sangue.

Inoltre, nei pazienti con malattia tumorale in progressione furono individuate più CTC dei pazienti con malattia stabile.

Bisogna tenere presente che l'esiguo numero di CTC nel sangue circolante (rare cellule: 1CTC/106-107 cellule mononucleate) ha reso, e tuttora rende complicata la loro estrazione dal sangue periferico.

Inoltre, gli anticorpi anti-citocheratine di vario peso molecolare e gli anticorpi che marcano le cellule epiteliali, possono legarsi a cellule non tumorali mediante siti antigenici specifici o non specifici; e di contro, le CTC a causa della loro eterogeneità genetica ed antigenica (le cellule tumorali durante il viaggio verso il sito dove genereranno la metastasi, possono subire una trasformazione epitelio-mesenchimale, perdendo l'espressione delle Ep-CAM e CK ed esprimendo marcatori antigenici mesenchimali (10): vimentina, N-caderina) possono non esprimere un dato determinante antigenico rendendosi "invisibili" immunofenotpicamente: Antolovic et al (11) sottolinea l'importanza del clone di Ep-CAM da scegliere per la selezione ed arricchimento immunomagnetico delle CTC, a causa della eterogeneità fenotipica delle cellule tumorali circolanti nel sangue.

Tutto ciò crea rispettivamente falsi positivi e falsi negativi.

Quindi la ricerca di nuove metodiche e tecniche di isolamento ed arricchimento del campione cellulare neoplastico circolante è fondamentale e di assoluta necessità e rappresenta un'importante sfida scientifica ancora aperta.

Tipizzazione molecolare e genetica delle CTC

Le CTC sono cellule ad elevata eterogeneità genetica ed immunofenotipica e spesso presentano caratteristiche antigeniche e biomolecolari differenti dalla neoplasia primitiva da cui esse derivano. Le tecniche che sono state più utilizzate per lo studio del loro profilo genetico-biomolecolare ed immunologico sono: l'ibridizzazione in situ con fluorescenza (FISH), l'ibridizzazione genomica comparativa (CGH), le tecniche basate su PCR e l'immunofluorescenza per i biomarker.

Nel CTC del **carcinoma prostatico** si sono evidenziati:

- Amplificazione cromosomiale del recettore per androgeni (AR)
- Riarrangiamenti del gene EGR
- Perdita del gene PTEN
- Acquisizione del gene MYC
- Traslocazione genica cancro-prostatico specifica TMPRSS2-ERG

Inoltre, si è potuto osservare uno shift molecolare bidirezionale tra il tumore primitivo e le CTC: tumore primitivo HER-2neg rilascia in circolo CTC HER-2pos.

Nel **carcinoma mammario**:

- le CTC hanno mostrato una eterogeneità genica ed una instabilità genomica importante
- è stata osservata una discordanza nell'espressione dell' HER-2, PR (recettore progesterone) e ER (recettore estrogeno) tra CTC e tumore primitivo in pazienti metastatiche

- l'espressione immunofenotipica di marker responsabili dell'angiogenesi tumorale (VEGF, VEGF2 e HIF-1alfa) è stata trovata nelle CTC delle pazienti con carcinoma mammario (rispettivamente con una frequenza del 62%, 47% e 76%); la presenza, nelle CTC, di molecole correlate all'angiogenesi potrebbe spiegare la sottrazione delle stesse all'apoptosi, l'aumento del potenziale metastatico e la resistenza alla terapia endocrina.

Nel **tumore polmonare**, analizzando nelle CTC la mutazione dell'allele T790M del gene EGFR, si è scoperto che la mutazione attivante il gene EGFR era presente nel:

- 92% dei pazienti
- 33% dei pazienti che avevano risposto agli inibitori della tirosinocinasi
- 64% in progressione clinica

Ciò ha consentito di dedurre che la mutazione del T790M è di grande importanza nel predire la farmacoresistenza nei pazienti con mutazione dell'EGFR trattati con inibitori della tirosinocinasi e si correla con la sopravvivenza libera da progressione di malattia

Nei pazienti con **carcinoma del grosso intestino**, alcuni autori hanno evidenziato che le CTC mostravano un profilo antigenico differente quando indagate prima e dopo la chemioterapia:

- alta espressione del CEA e bassa espressione dell'EGFR (prima della chemioterapia)

- bassa espressione del CEA ed alta espressione dell'EGFR (dopo terapia)

Recentemente lo studio del gene di microRNA (miRNA) nelle CTC ha aperto nuove prospettive: l'alterata espressione di specifici geni del miRNA contribuisce all'iniziazione e progressione del tumore.

Il gene coinvolto potrebbe rappresentare il bersaglio di una nuova terapia genica dei tumori.

Inoltre, la scoperta della c.d. "transizione epiteliale mesenchimale" (EMT) a cui possono andare incontro le CTC (con l'acquisizione di marcatori tipici delle stem-cell e proprietà quali la quiescenza, la capacità di auto rinnovarsi, la resistenza multi- farmaco etc.) ha indotto gli studiosi ad indagare fattori di trascrizione relativi alla EMT. Questi ricercatori hanno isolato un set di fattori di trascrizione (Snail, Slug, Twist1, dEF1, SIP1, OXC2, TGFbeta) che reprimono l'espressione di molecole di adesione cellulare (E-caderina, claudina, occludina) e che possono up-regolare la produzione di diverse metalloproteine e di fattori del sistema plasminogeno, responsabili della degradazione della matrice extracellulare nel tumore primario.

Tutti questi dati, in futuro, potranno servire ai fini clinico-terapeutici.

Applicazioni cliniche dell'isolamento delle CTC

Carcinoma della mammella

I vari studi effettuati hanno portato alle seguenti conclusioni in alcuni casi non sempre concordanti:

- nei pazienti con malattia tumorale metastatica la presenza di >5 CTC alla scoperta del tumore o al primo follow-up, la mediana della sopravvivenza libera da progressione (PFS) e la sopravvivenza globale (OS) è più bassa delle pazienti con <5 CTC. Quindi la conta delle CTC possono predire la progressione della malattia e la sopravvivenza più precocemente delle tradizionali metodiche di diagnosi

- pazienti con persistente elevato numero di CTC o con >5 CTC hanno avuto una prognosi infausta
- pazienti con <5 CTC hanno dimostrato una maggiore sensibilità alla terapia e ne hanno tratto maggiore beneficio
- si sono evidenziati due cutoff utili a predire la prognosi delle pazienti metastatiche in trattamento:
 - 2 CTC/7,5ml di sangue per la presenza di metastasi (sensibilità 50%, specificità 96,7%)
 - 5 CTC/7,5ml di sangue per selezionare le pazienti con metastasi e prognosi più favorevole (<5 CTC: PFS e OS significativamente più lunghe) e le pazienti con metastasi e prognosi meno favorevole
- Botteri et al. analizzando le CTC come fattore predittivo continuo prognostico non ha evidenziato un incremento lineare

di rischio di progressione e di morte nelle pazienti con crescente numero di CTC

Carcinoma della prostata

I risultati ottenuti dallo studio delle CTC del carcinoma prostatico sono:

- Il potere predittivo prognostico delle CTC in pazienti con carcinoma prostatico in metastasi è superiore a quello dei parametri clinici sino ad oggi valutati (valori sierici del PSA, Gleason score, staging clinico)
- La mediana della OS dei pazienti con < 5 CTC tende ad essere più lunga di quella dei pazienti con >5 CTC.
Questa differenza è valida anche per i pazienti con carcinoma refrattario all'ormonoterapia
- Nei pazienti con metastasi ossee la conta delle CTC è più elevata di quella dei pazienti senza metastasi ossee; questa differenza è valida anche per i pazienti in trattamento chemioterapico rispetto a quelli non trattati con chemioterapia
- Non è stato ricavato un cutoff numerico di CTC (come invece si ha per il carcinoma della mammella) per distinguere il gruppo di pazienti con carcinoma prostatico metastatico a prognosi favorevole da quello a prognosi sfavorevole
- Alcuni autori hanno riportato in letteratura che la soglia di 4 CTC/7,5ml di sangue è un ottimo punto di cutoff, validato

statisticamente nei pazienti con carcinoma prostatico progressivamente resistente

- La conta di <4 CTC non solo è un potente predittore di sopravvivenza indipendente ma ha anche una specificità del 100% come indice di malattia metastatica radiologicamente diagnosticabile
- in pazienti con malattia localizzata non è stata osservata alcuna correlazione tra la conta delle CTC ed il volume del tumore, lo stadio patologico, il Gleason score

Carcinoma colon-rettale

I risultati ottenuti sono i seguenti:

- pazienti con >3 CTC hanno una più bassa mediana di PFS e di OS rispetto ai pazienti con <3 CTC
- l'espressione di quattro mRNA marker (c-MET, MAGEA3, GalNAc-T e CK20) si correla significativamente con una più breve sopravvivenza libera da malattia (DSF)
- nei pazienti con carcinoma in fase avanzata le CTC presentavano una espressione immunofenotipica ridotta del CEA ed una espressione più elevata delle EGFR
- dopo colectomia, i pazienti che durante il follow-up avevano persistente presenza di CTC, presentavano anche più alta incidenza di ricadute ed una peggiore percentuale di sopravvivenza libera da ricadute

- un panel di geni (CEA/CK/CD133) è stato oggetto di studio nel sangue periferico.

I dati ottenuti suggeriscono che il suddetto panel ha un valore prognostico superiore a quello degli attuali fattori di rischio in pazienti con stadio B e C di Duke

- l'applicazione delle indagini quantitative e qualitative dell CTC nel carcinoma rettale fornisce importantissimi dati per la prognosi, la somministrazione di terapie personalizzate e per predire eventuali recidive di malattia

Carcinomi polmonari

I lavori di ricerca hanno evidenziato:

- il 36% dei pazienti con carcinoma polmonare presentavano CTC ed il punto di cutoff di 1 CTC/7,5 ml di sangue permette di distinguere i pazienti neoplastici da pazienti con patologie benigne.
- il numero di CTC è un forte fattore prognostico utile a predire la presenza di metastasi a distanza (il CEA non ha lo stesso valore prognostico) ed inoltre è correlato con lo stadio clinico e patologico
- stabilendo una soglia di 2 CTC/7,5ml di sangue i carcinomi di prima osservazione presentavano una percentuale di positività per CTC che variava dal 46% al 78% contro l'83% dei pazienti con recidiva tumorale

- correlazione tra il numero di CTC e la risposta radiografica dopo due cicli di terapia
- nei pazienti con small cell carcinoma si osservava una riduzione del numero delle CTC dopo il primo ciclo di terapia
- I pazienti con > 2 CTC alla scoperta della neoplasia nel 32% dei casi avevano metastasi; i pazienti con >5 CTC alla scoperta della neoplasia o dopo chemioterapia presentavano un decorso clinico sfavorevole
- Pazienti con >50 CTC presentavano una pessima prognosi indipendentemente dallo stadio della malattia

Carcinoma uroteliale

Risultati riportati in letteratura:

- Nei pazienti con carcinomi uroteliali metastatici si è osservato un elevato numero di CTC rispetto ai pazienti con malattia tumorale localizzata
- Non si è osservata alcuna correlazione statistica tra lo status delle CTC e lo stadio finale della malattia tumorale: studi hanno dimostrato che il numero delle CTC non consente di predire la presenza o l'assenza di localizzazione tumorale extravescale e linfonodale prima della cistectomia radicale (ciò potrebbe dipendere dallo scarso numero di pazienti studiati)

Carcinoma renale

Alcuni studi hanno messo in evidenza i seguenti risultati:

- Nel 53% dei pazienti con carcinoma renale si sono evidenziate CTC
- In uno studio, il 37% dei pazienti con carcinoma renale, prima e dopo nefrectomia o durante l'immunoterapia adiuvante, presentavano mediamente 5 CTC nel sangue periferico.
Si è osservato una correlazione tra presenza delle CTC e lo stadio tumorale avanzato.
Il 72% dei pazienti con CTC svilupparono metastasi singole o multiple o morirono della malattia entro 2 anni

Carcinoma gastrico

Dati riportati in letteratura:

- La percentuale di CTC positiva al CEA mRNA correla bene con recidive post-intervento, le dimensioni del tumore, l'invasione vascolare, la profondità dell'invasione tumorale, le metastasi linfonodali e lo stadio del TNM
- Tra i geni correlati con CTC nel sangue periferico (Survivina, CK19, CEA e VEGF) la Survivina si comporta come un fattore prognostico indipendente in riferimento al comportamento clinico del tumore ed è un marker biologico di notevole importanza correlato con la classificazione di Lauren, lo stadio patologico del tumore, lo stadio del TNM, il grado di differenziazione della neoplasia, il grado di penetrazione nel tessuto e le metastasi linfonodali: essa aggiunge un significativo valore prognostico all'attuale TNM staging system

- I livelli di miRNA-106a e del miRNA-17 presentano una significativa correlazione con il numero di CTC
- In uno studio prospettico pazienti con < di 4 CTC/7,5 ml di sangue a 2-4 settimane dall'inizio della chemioterapia presentano una più lunga OS e PSF comparati con i pazienti con > 4 CTC/7,5 ml
- Alla scoperta della neoplasia lo status delle CTC non presenta associazioni statisticamente valide con il decorso clinico della malattia tumorale.

CARCINOMA EPATOCELLULARE (HCC)

Aspetti clinici (7, 9, 10)

Epidemiologia: è il più comune tumore primitivo maligno del fegato.

A livello mondiale occupa il 5° posto tra i tumori più frequenti nel sesso maschile e l'8° posto tra quelli più frequenti nel sesso femminile.

Ogni anno, nel mondo, vengono diagnosticati più di 500.000 nuovi casi.

L'incidenza varia a seconda dell'area geografica:

- 2-7 casi per 100.000 in Europa Nord America
- 30 casi per 100.000 in Taiwan, sud-est Cina e Africa sub-Saharaniana

Negli Stati Uniti, in questi ultimi 25 anni, l'incidenza è più che raddoppiata.

Rapporto uomo:donna è di 3:1.

Terza causa di morte per tumore nel mondo.

La sopravvivenza per i pazienti con HCC e non cirrotici è del 40% a 5 anni e del 26% a 10 anni.

I pazienti cirrotici con HCC hanno una sopravvivenza più bassa; tuttavia una sopravvivenza a 5 anni del 33-44% viene riportata per pazienti con tumore < 5cm e senza invasione vascolare umorale o localizzazione extraepatica e stato funzionale buono.

I pazienti sono asintomatici o presentano dolore addominale.

La perdita di peso, malessere, febbre, ittero ed ascite sono presenti in meno del 10% dei pazienti e si presentano negli stadi avanzati di malattia.

Laboratorio: alti livelli sierici di alfa-Fetoproteina (>1000 ng/mL) si osservano in quasi i 2/3 di pazienti con voluminosi epatocarcinomi (i tumori di 2-3 cm non si associano ad elevati valori alfa-Fetoproteina). Elevazione dei valori dell' alfa-Fetoproteina > di 500 ng/mL si possono osservare in diverse patologie epatiche.

Valori compresi tra 500 e 1000 ng/mL sono sospetti ma non specifici per HCC.

L'alfa-Fetoproteina (AFP) è utile nel monitoraggio della risposta alla terapia e per svelare recidive; si conoscono tre glicoforme e la frazione AFP-L3 è un marker sierologico di HCC di alta sensibilità essendo sierologicamente presente nel 45% dei pazienti con tumori di dimensioni < 2cm e nel 90% dei pazienti con tumori > 5 cm.

Altri marker sierologici usati in associazione all'AFP (aumentano la sensibilità per HCC) sono: descarboxiprotrombina (PIVKA-II), GPC-3, alfa-L-fucosidase e l'antigene del carcinoma a cellule squamose.

Diagnosi strumentali: Ecografia, TC trifasica, Risonanza magnetica e biopsia epatica sono metodiche accurate per la diagnosi del tumore.

E' noto che un buona parte degli epatocarcinomi insorgono nei fegati cirrotici; quindi i fattori eziogenetici della cirrosi possono causare la neoplasia: virus dell'epatite B e C, alcool (>50 gr/die può indurre la cirrosi e quindi l'HCC), disordini metabolici (emocromatosi ereditaria, deficit dell'alfa1antitripsina, malattia di Wilson), droghe, sostanze

chimiche (es. Thorotrast impiegato come mezzo di contrasto negli esami radiologici), tossine (aflatossina è una tossina prodotta dall'Aspergillus Flavus che può contaminare cibi), sostanze ormonali (androgeni e progestinici).

Istotipi:

La World Health Organization (WHO) ha descritto diversi pattern istologici della neoplasia:

- Epatocarcinoma trabecolare
- Epatocarcinoma pseudo ghiandolare ed acinare
- Epatocarcinoma scirroso
- Epatocarcinoma fibrolamellare
- Carcinoma indifferenziato

Gli epatocarcinomi, in relazione al grado di differenziazione vengono distinti in

- Epatocarcinomi ben differenziati
- Epatocarcinomi moderatamente differenziati
- Epatocarcinomi scarsamente differenziati
- Epatocarcinomi indifferenziati

Diagnosi immunoistochimica e molecolare:

l'epatocarcinoma esprime determinanti antigenici che possono essere evidenziati mediante tecniche di immunoistochimica e di biologia molecolare.

Immunofenotipo:

- Hep Par 1 positivo (l'anticorpo ha elevata sensibilità e specificità, ma può essere negativo negli HCC scarsamente differenziati)
- CEA policlonale (CEAp: alta sensibilità specie in HCC scarsamente differenziati)
- Glipycan-3 (alta sensibilità specie in HCC scarsamente differenziati)
- AFP (specifica ma bassa sensibilità: 30-50%)
- MOC31 (solitamente negativo)
- Citocheratine (HCC positivo per la CAM5.2 o CK 8/18 e negativo per CK7, CK19, CK20)

Ibridizzazione in situ: l'espressione del marker albumina è specifica per la differenziazione epatocellulare (sensibilità >90%)

Terapia (7, 10):

- Non chirurgica: Terapia termoablativa laser, alcolizzazione, radiofrequenza, chemioterapici.
- chirurgica: nei casi senza invasione vascolare e metastasi e controindicato per tumori di diametro superiore a 5 cm
- trapianto : nei casi di HCC associato a cirrosi

EPATOCARCINOMA E CTC

L'epatocarcinoma rappresenta la terza causa di morte nel mondo per cancro e a dispetto della sua larga diffusione nella popolazione mondiale, le tecniche di diagnosi per immagine, ancora oggi, sono imprecise e talvolta sottostimano le dimensioni reali della neoplasia.

In alcuni casi l'invasione vascolare e le lesioni multifocali vengono scoperte occasionalmente.

L'utilizzo di tecniche invasive (ago biopsia, biopsia etc.) non sempre possono essere utilizzate per la diagnosi (condizioni cliniche del pz) e non sono scevre da complicanze.

Tutto ciò spinge verso un'urgente necessità di disporre di biomarkers ematici per una diagnosi precisa ed in fase precoce (6).

In questi anni un interesse sempre crescente hanno avuto le CTC, ossia le cellule tumorali circolanti che originano dall'epatocarcinoma primitivo.

Esse sono state indagate con varie metodiche e con strumentazioni complesse e di alta ingegneria:

- CellSearch System
- Tecniche di arricchimento di CTC con metodiche immunoistochimiche (IE/FACS)
- Tecniche di amplificazione genica
- Tecniche di biologia molecolare
- Tecnologia con microchip

Con alcune di queste tecniche (CellSearch System e Ie/FACS) si è visto che le CTC dell'HCC legano l'anticorpo anti Ep-CAM e la loro conta nel sangue periferico si correla con i valori dell'AFP (alti valori di AFP) e con la presenza di invasione vascolare.

Inoltre le cellule Ep-CAM positive sono rare nei pazienti con malattie epatiche non tumorali.

La presenza di CTC in pazienti con HCC (6, 10) ed il loro numero è correlato con la presenza di tumori multifocali, trombosi portale e con la classe B/C Child-Pugh.

I pazienti con 4 o più di 4 CTC hanno avuto una significativa ridotta sopravvivenza.

In uno studio (8) effettuato con una tecnica di isolamento e conta delle CTC che si avvale di:

- un sistema di separazione magnetica (raccolge le CTC) che utilizza il recettore per le asialoglicoproteine (ASGPR: recettore proteico transmembranario esclusivamente espresso sulla superficie degli epatociti e presente nelle CTC dell'HCC), coniugato con il suo ligando, una molecola biotinilata
- un sistema di identificazione (delle CTC) immunocistochimica che utilizza l'anticorpo anti HEP Par 1

I risultati ottenuti hanno portato alle seguenti conclusioni:

- nessuna CTC è stata evidenziata nel sangue di volontari sani o da pazienti cirrotici o con epatite cronica B o con epatite acuta A (ciò dimostra che i risultati non sono stati inficiati da patologie epatiche non tumorali)

- nell'80% dei pazienti con HCC in diverso stadio (anche precoce) e anche con tumore < 2cm, possono isolarsi CTC
- per più di un decennio i criteri di Milan sono stati alla base della selezione dei pazienti candidati al trapianto di fegato.
Nei pazienti con assenza dei criteri minimi di Milan per il trapianto si è scoperto un alto numero di CTC (talvolta superiore a quelli dei pz con criteri di Milan soddisfatti) suggerendo che l'isolamento e la conta delle CTC può avere applicazione nel selezionare pazienti con HCC da sottoporre a trapianto
- il numero delle CTC è correlato con la differenziazione del tumore come definito dai criteri del grading di Edmondson-Steiner (largamente utilizzato in istopatologia)
- l'alto numero di CTC presenti in pazienti con trombosi tumorale nella vena porta rispetto a quelli senza trombosi tumorale portale, suggerisce che il trombo tumorale può essere la sorgente della diffusione sistemica delle CTC
- la correlazione tra la quantità delle CTC e l'estensione del tumore suggerisce la specificità del sistema utilizzato

In alcuni pazienti affetti da HCC e con elevato numero di CTC è stata osservata l'amplificazione del gene HER-2 (raramente si osserva tale amplificazione nell'HCC primitivo): tale gene potrebbe divenire un potenziale bersaglio farmacologico per la terapia dell'HCC.

In uno studio si è osservata la presenza di una triploidia del cromosoma 17 e in tutti i cromosomi il gene TP53 (gene soppressore tumorale che regola la trascrizione di geni cruciali per la crescita cellulare che

controllano la progressione del ciclo cellulare e la divisione cellulare) era deleto: ciò dimostra l'importanza del gene TP53 nel mantenimento della stabilità cromosomica (8).

Alcuni autori hanno condotto uno studio di meta-analisi su 23 lavori riportati in letteratura (9) e la conclusione è:

- gli studi pubblicati sono viziati di eterogeneità dei dati:
 - eterogeneità di dati demografici
 - eterogeneità di dati clinico epidemiologici (sesso, razza, etc)
 - eterogeneità di dati eziopatogenetici (HBV, HCV, alcool, epatiti
 - autoimmuni etc.)

Lo studio su campioni di pazienti più omogenei potrà fornire dati più accurati che predicono la risposta tumorale

- il valore di cutoff numerico delle CTC nella separazione di gruppi di pazienti con diversa prognosi è diverso nei vari lavori scientifici pubblicati
- la presenza di CTC nel sangue periferico è associato a significativamente con la prognosi (la presenza di CTC indica una cattiva prognosi) e con parametri clinico patologici negativi

In un lavoro (10) riportato in letteratura vengono studiate popolazione eterogenee di CTC mediante immunofluorescenza:

- CTC epiteliali panCK+/EpCAM-/CD45- (CD45 è un marcatore delle cellule ematiche della serie bianca)
- CTC epiteliali panCK+/Ep-CAM+/CD45-

- CTC mesenchimali vimentina+/N-caderina+ (espressione dell'EMT)
- CTC miste (esprimono marcatori epiteliali e marcatori mesenchimali e probabilmente rappresentano stadi intermedi della EMT)

Il lavoro conclude che le CTC che esprimono marker mesenchimali sono correlate ad una prognosi peggiore e l'incremento delle CTC epiteliali si correla con una peggiore risposta al trattamento.

Inoltre sono state individuate CTC panCK+/CD45+ o panCK+/Ep-CAM+/CD45+: l'antigene CD45, marcatore dei leucociti e linfociti, potrebbe essere stato acquisito durante la fase "dormiente" nel midollo osseo o per trasferimento di proteine di membrana.

MATERIALI E METODI

Reclutamento Pazienti

In questo lavoro per la ricerca delle cellule tumorali circolanti sono stati arruolati 14 pazienti con diagnosi di HCC non metastatici, alcuni di questi erano ricoverati presso i reparti di Clinica Medica e Patologia Medica dell'Università di Sassari mentre altri erano pazienti esterni, e 12 controlli sani. Di questi 14 pazienti, 11 sono di sesso maschile e di 3 di sesso femminile. L'età media dei pazienti è di 67 anni.

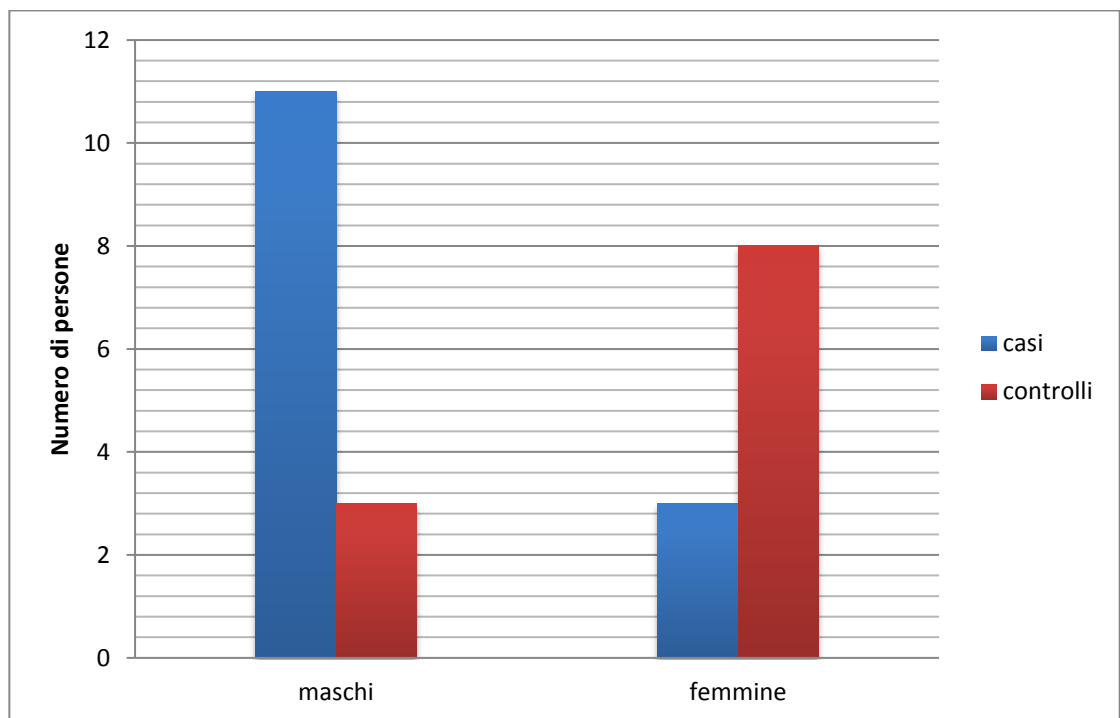


Grafico 1: Grafico sui casi e i controlli che hanno partecipato allo studio.

Tutti i pazienti sono stati seguiti dal Servizio di Ecografia della Clinica Medica, dove sono stati raccolti i dati clinico-anamnestici ed effettuavano l'indagine ecografica necessaria per il monitoraggio della patologia in corso. Su tutti questi pazienti e sui controlli sani è stato fatto un prelievo di sangue periferico in una provetta da siero e una da emocromo per effettuare la ricerca delle CTC.

Metodiche

Identificazione Cellule Tumoriali Circolanti

Il prelievo di sangue va eseguito in provette con K2 EDTA; 3 provette per paziente di cui una da utilizzare per l'emocromo le altre due per la ricerca delle CTC in Citofluorimetria.

- Preparare 2 provette da 50 ml per singolo paziente e controllo sano.
- Dispensare in ciascuna provetta un volume di sangue corrispondente a circa 20×10^6 di leucociti: è preferibile non superare mai i 4 ml di sangue per ciascun campione.
- Aggiungere 40 ml di soluzione lisante, BD PHARME LYSE 10 X da diluire con acqua, indipendentemente dai ml di sangue (max 4 ml).
- Incubazione 15 minuti in agitazione meccanica.
- Centrifugare a 400 g (1500 rpm) per 10 minuti.

- Eliminare il surnatante (senza portare a secco).
- Sospendere il pellet in 2 ml di soluzione di lavaggio, STAIN BUFFER con BSA,
- Riunire i pellet dello stesso campione per uniformare eventuali differenze di lisi.
- Separare in due provette da citofluorimetria.
- Centrifugare i campioni a 400 g (1500 rpm) per 10 minuti.
- Eliminare il surnatante.
- Aggiungere 100/200 ul di STAIN BUFFER con BSA
- Preparare la marcatura per ciascun campione in esame (paziente e controllo sano) con i seguenti anticorpi:
 - CD45 in APC CY7
 - 7AAD in PerCP
 - CD34 PE in CY7
 - CD 105 in ALEXA 647
 - EPCAM in PE
 - CD 324 in PE
 - CD 325 in ALEXA 647
 - SYTO 16 FITC
- Incubazione per 30 minuti al buio
- Terminata l'incubazione aggiungere 2 ml STAIN BUFFER con BSA per lavare
- Centrifugare a 400 g (1500 rpm) 10 minuti
- Eliminare il surnatante
- Sospendere il pellet in 1 ml di FACS FLOW

- Filtrare ogni campione solo prima dell'acquisizione al Citofluorimetro.

Anticorpi Utilizzati

-CD45 APC CY7:

- Anticorpo anti CD45.1 (topo o murino), APC-Cy7, Clone A20
- *Sinonimo:* CD45, LCA, Antigene Comune Leucocitario, Ly-5, Antigene Linfocitario 5, recettore tipo-tirosina-proteina fosfatasi C, T200
- *Caratteristiche immunologiche dell'antigene:* l'anticorpo A20 lega l'antigene murino (di topo) CD 45.1, anche conosciuto come Ly5.1, che è una forma allelica "specie" specifica dell'LCA (CD45 Antigene Comune Leucocitario). Dal punto di vista funzionale, il CD45 è una proteina tirosina fosfatasi con ampia distribuzione nelle varie popolazioni cellulari; ciò rende conto del ruolo critico che riveste in molte funzioni leucocitarie ed in particolare nella regolazione del segnale di trasduzione e di attivazione cellulare associato al recettore del linfociti T e linfociti B.
L'anticorpo A20 è utilizzato elettivamente come marker leucocitario nel genere murino Ly5.1.

L'anticorpo è specifico per l'antigene CD45.1 e non cross-regisce con le cellule che esprimono l'antigene CD45.2.

- Caratteristiche fisiche: anticorpo murino monoclonale purificato dal supernatante di colture tissutali mediante cromatografia, in condizioni ottimali, con un colorante senza capacità reattiva e rimosso per la preparazione.

L'anticorpo A 20 è compreso in un "buffer" contenente 10 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 0,1% di gelatina, pH 7.2 e sodio azide > 0,1%

- Applicazioni: Ip (immunoperossidasi), IHC (immunoistochimica), citofluorimetria, per l'individuazione dell'Ag CD45.1

-7AAD PerCp (7-Aminoactinomicina D) (13): è una molecola fluorescente di interposizione che legandosi al DNA va incontro ad un cambiamento di spettro luminoso.

Il complesso 7-AAD/DNA può essere eccitato dal laser 488 nm ed ha una emissione massima di 647 nm (546/647): questa colorazione acido nucleica è utile per lo studio mediante citofluorimetria e microscopia a fluorescenza multicolor.

7-AAD sembra essere generalmente esclusa dalle cellule vitali, ma può essere utilizzata con cellule fissate e permeabilizzate.

7-AAD viene utilizzata per lo studio del ciclo cellulare mediante citofluorimetria: essa lega selettivamente le regioni GC del DNA

producendo un distinto pattern di bandeggio in nei cromosomi e cromatina e permettendo lo studio dei cromosomi mediante bandeggio.

Consente di studiare l'apoptosi cellulare.

-CD34 PE CY7: (14)

- *Sinonimo:* gp105-120, My10
- *Caratteristiche immunologiche dell'antigene:* è una glicofosfoproteina simil-sialomucina di I tipo con un peso molecolare approssimativo i 105-120 kD.

L'antigene CD34 è espresso selettivamente dalla maggior parte delle cellule ematopoietiche staminali/progenitrici, cellule stromali del midollo osseo, cellule endoteliali dei capillari, fibroblasti embrionali ed alcune cellule del tessuto nervoso.

In riferimento alla differente sensibilità al "cleavage" enzimatico, sono stati descritti quattro gruppi di epitopi CD34.

CD34 media l'adesione cellulare e l'"homming" dei linfociti mediante il legame con i ligandi L-selectina ed E-selectina

- *Struttura:* 105-120 kD; glicoproteina simil- mucina a singola catena
- *Funzione:* adesione cellulare (i ligandi sono L-selectina ed E-selectina)

-CD 105 ALEXA 647: (15)

- *Sinonimo*: endogлина
- *Caratteristiche immunologiche dell'antigene*: è una glicoproteina transmembranaria di tipo II dal peso di 90 kDa, espressa sulla superficie di cellule endoteliali come omodimero disulfide-coniugato, nel sincizio-trofoblasto della placenta nelle cellule U937, nei macrofagi attivati e nelle cellule staminali mesenchimali; debolmente espresso nei fibroblasti stromali. CD105 è uno dei diversi recettori che legano le varie isoforme di TGF che fa parte di una famiglia di proteine interessate nella regolazione della differenziazione cellulare, della migrazione cellulare e nel controllo della risposta immune. In particolare il CD105 è un componente del sistema di recettori TGF-Beta nelle cellule endoteliali delle vene ombelicali e lega con alta affinità il TGF-Beta1 e TGF-Beta3 ma non lega il TGF-Beta2. L'espressione del CD105 è incrementata nell'endotelio attivato dei tessuti sede di angiogenesi come i tumori o tessuti sede di ferite in fase di guarigione o infiammazioni dermiche.
- *anticorpo anti CD105 Alexa Fluor 647 Murino anti CD105 umano*: anticorpo murino (Balb/c) IgG,k preparato mediante utilizzo di antigene isolato dalla membrana cellulare da pazienti con leucemia linfoblastica acuta non-

T/non B (ALL non-T/non B) o da cellule endoteliali delle vene ombelicali umane.

- *applicazioni*: citofluorimetria (sorgente di eccitamento: red 633 nm; eccitazione massima: 650 nm, emissione massima 668 nm), immunoistochimica con sezioni congelate o in paraffina, immunocitochimica, immunoprecipitazione, immunoblotting non-Reducing, purificazione.

-EPCAM PE: (16)

- *sinonimi*: CD326, DIAR5, EGP314, EGP40 etc.
- *caratteristiche immunologiche dell'antigene*: è un antigene di differenziazione epiteliale che è espresso in quasi tutti i carcinomi. Strettamente legato al sistema Caderina- catenina poiché responsabile della trasmissione di segnali intracellulari e della polarità cellulare.

L'EP-CAM (Molecola di Adesione Cellulare Epiteliale) viene considerato un marker tumorale per le terapie "bersaglio" ed ha stimolato interessi come fattore prognostico nel carcinoma della mammella.

- *anticorpo*: anticorpo monoclonale murino anti CD326-PE (16)

-CD324 PE: (17)

- *Sinonimo*: E-caderina, Caderina-1, CDH1, UVO
- *Caratteristiche immunologiche dell'antigene*: è una glicoproteina transmembranaria (composta da quattro caderine extracellulari ripetute e da una regione-coda citoplasmatica altamente conservata) che è localizzata nelle "adherens junctions" delle cellule epiteliali, interagisce con il citoscheletro attraverso l'associazione con la proteina "catenina" (l'associazione E-caderina-catenina è necessaria per l'adesione cellula-cellula). E' una molecola di adesione calcio dipendente e regola, quindi, la formazione delle giunzioni tra le cellule (il complesso E-caderina-catenina è associato con i fascicoli di actina corticale sia nella zonula "adherens", sia nelle placche di adesione laterale).

La fosforilazione tirosinica può distruggere il complesso E-caderina-catenina comportando modifiche nell'adesione cellulare.

L'espressione dell'E-caderina è "down" regolata nei tumori maligni altamente invasivi e scarsamente differenziati (carcinomi): l'incrementata espressione di E-caderina, in questi tumori, riduce l'invasività. Così la perdita dell'espressione dell'E-caderina sembra una fase importante nella progressione tumorale. Cellule staminali pluripotenti esprimono l'E-caderina.

Nella differenziazione, la transizione epiteliale-mesenchimale comporta la perdita dell'espressione dell'E-caderina e l'acquisizione dell'espressione dell'N-caderina. E' espressa nelle cellule epiteliali del colon, utero, fegato, cheratinociti, cervello, cuore, muscolo, rene, pancreas ed eritrociti.

Il "domain"extracellulare del CD324 media l'adesione batterica alle cellule mammarie, mentre il "domain" citoplasmatico è richiesto per l'internalizzazione.

- anticorpo: anticorpo monoclonale murino (BALB/c; IgG,k) 67A4 ottenuto con immunogeno da linea cellulare di tumore mammario umano.

L'anticorpo monoclonale viene purificato dal soprannatante della coltura tissutale o da liquido ascitico mediante cromatografia

Il ligando: alfa Ebeta7 integrina.

Interagisce con una grande varietà di proteine: erbina, ezrina, caspase-3, caspase-8, EGF recettore, Beta-catenna, prenesilina-1, caseina chinase II, etc.

- *applicazioni*: citofluorimetria

-CD 325 ALEXA 647

Alexa Fluor 647 Mouse Anti-Human CD146 Clone P1H12 (RUO)

-sinonimo: MCAM, MELCM, MUC18, Gicerin; Melanoma cell adhesion molecule

- *Caratteristiche immunologiche dell'antigene:* si lega al CD146 una glicoproteina transmembranaria anche conosciuta come MCAM, MELCM, MUC18; è un membro della superfamiglia di immunoglobuline e viene espressa dagli angioblasti, dalle cellule staminali mesenchimali, cellule endoteliali dei vasi sanguigni, cellule muscolari lisce, cellule del melanoma, cellule del trofoblasto intermedio e da una sottopopolazione di linfociti T attivati.
- L'anticorpo P1H12 (anticorpo murino IgG1, k isotipo) è un anticorpo monoclonale che blocca l'adesione delle cellule endoteliali (che si osserva negli stadi precoci dell'embriogenesi); è utile nello studio della vasculogenesi embrionale
- Applicazioni: citofluorimetria, immunoistochimica di sezioni tissutali fissate in acetone e per uso al congelatore (esame estemporaneo), immunoprecipitazione, immunofluorescenza ed ELISA.

-SYTO 16 FITC (18)

Le colorazioni SYTO a fluorescenza verde per la colorazione degli acidi nucleici, sono colorazioni “cell-permeant” (a penetrazione attraverso le membrane cellulari) per gli acidi nucleici che mostrano un ampio potenziamento di emissione fluorescente quando si lega agli acidi nucleici: colora RNA e DNA sia nelle cellule eucariotiche vive che morte.

Inoltre, colora batteri Gram-positivi e Gram-negativi.

Le colorazioni che si possono avere in immunofluorescenza sono: blu, verde, arancio e rosso.

Varietà dei SYTO:

- SYTO 9
- SYTO 11, 13, 14, 21, 24
- SYTO 12
- **SYTO 16**
- SYTO BC dye mixture

Le colorazioni SYTO differiscono l'uno dall'altro, in più caratteristiche: permeabilità cellulare, potenziamento della fluorescenza dopo legame con DNA/RNA,, eccitazione ed emissione di spettro, DNA/RNA selettività ed affinità di legame.

I SYTO sono compatibili con una varietà di strumenti ad applicazione per fluorescenza che utilizzano eccitazione laser o sorgenti luminose a larga banda convenzionali (lampade al mercurio, xenon-arc).

Applicazioni:

- Colorazione del DNA “spotted” o “microarray” (cellule vive e fissate)
- Colorazione citoplasmatica
- Colorazione mitocondriale

Il SYTO 16 è ottimo per differenziare le cellule COS-7 mediante citometro a scansione laser.

Citofluorimetria

Il principio di funzionamento di un citometro a flusso consiste nell'analizzare le singole cellule presenti all'interno una sospensione di sangue periferico, aspirato midollare o agoaspirati di diversa natura provenienti da tessuti solidi dissociati, mediante l'utilizzo di un sistema fluidico di trasporto e di uno o più fasci laser focalizzati. Quando il raggio di luce intercetta il flusso cellulare, vengono generati dei segnali legati alle caratteristiche fisiche della particella: diametro, rapporto nucleo/citoplasma, granularità, rugosità di membrana. I segnali una volta emessi, sono raccolti da un sistema di lenti, specchi diecrici e filtri ottici, e inviati ai rispettivi sensori noti come fotodiodi e fotomoltiplicatori, che ne misurano l'intensità. Questi segnali elettrici provenienti da ogni sensore, opportunamente amplificati e digitalizzati, sono inviati a un analizzatore/elaboratore di dati che

provvede alla presentazione su un monitor dei medesimi e alla loro elaborazione statistica.

Un citometro a flusso è la combinazione di un sistema di dispensazione di un campione liquido con uno spettrofluorimetro ed un fotometro a light scatter. Partendo da un campione (sospensione cellulare o di altre particelle) il sistema di dispensazione del campione liquido fornisce un mezzo efficiente per presentare individualmente le cellule del campione alla stazione di misura (flow cell). La sospensione cellulare è trasportata dal sistema di distribuzione alla cella a flusso, qui viene iniettata attraverso un piccolo ago (sample injection tube, SIT). In essa si realizzano alcune condizioni idrodinamiche necessarie per la misurazione. La focalizzazione idrodinamica consiste nel fare in modo che ogni singola cellula attraversi il punto di intersezione con un raggio di luce, in modo lineare. In pratica, se il regime fluidico è di tipo laminare si creano due flussi coassiali: quello interno contiene le cellule (core flow) e quello esterno mantiene queste ultime lungo l'asse ideale di flusso (sheath fluid). Agendo sul sistema pneumatico di trasporto che controlla la differenza di pressione tra core flow e sheath fluid si regola la velocità di efflusso delle cellule (flow rate), normalmente valutata in numero di "eventi" al secondo, ossia numero di "particelle" che hanno incontrato lo spot luminoso nell'unità di tempo. E' logico pertanto evitare la formazione di aggregati di grosse dimensioni (43). Le cellule del campione di nostro interesse sono marcate con specifici fluorocromi. I laser eccitano i fluorocromi i quali prima salgono a un livello superiore della nuvola elettronica e,

successivamente, rilasciano energia emettendo lunghezze d'onda maggiori rispetto a quelle a cui vengono eccitati. Esistono diversi fluorocromi che emettono a lunghezze d'onda differenti, tra i più comuni possiamo citare: Fluoresceine Isothiocyanate (FITC), Phycoerytherin (PE), Phycoerytherin Cyanine 7, (PE CY7), Peridin clorophylla protein (PerCP), Allophyco (APC) e Allophyco Cyanine 7 (APC CY7). Il citofluorimetro utilizzato nel corso di questo nostro studio è stato il BD FACSC CANTO. I pazienti arruolati in questo studio sono 15, tutti provenienti dall'istituto di Clinica Medica Servizio di Ecografia dell'Università di Sassari. I pazienti sono stati selezionati sulla base della presenza di epatocarcinoma con diversi noduli epatici. Il prelievo di sangue veniva loro eseguito prima d'esser sottoposti a qualsiasi tipo di trattamento sia di tipo chirurgico come ad esempio la chemioembolizzazione epatica (TACE), termoablazione a radio frequenza, crioablazione o l'alcolizzazione che di tipo farmacologico come il Sorafenib.

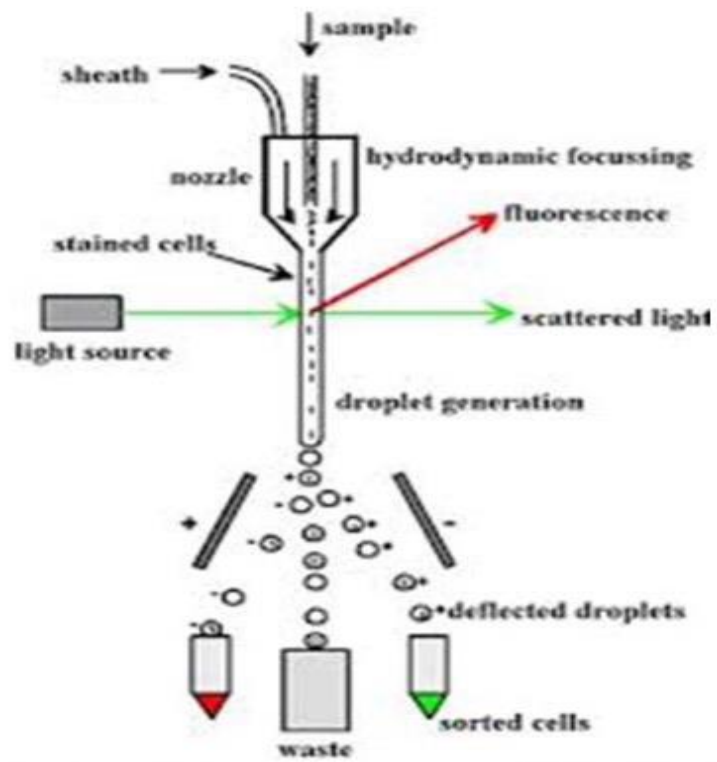


Figura 1. Principio di funzionamento della citofluorimetria a flusso

RISULTATI

Come detto in precedenza, per questa indagine sono stati esaminati 14 pazienti con HCC non in metastasi e non trattati durante il prelievo, confrontati con 12 controlli sani.

Il risultato ottenuto, di assoluto rilievo, è che il numero delle CTC è decisamente più elevato nei pazienti rispetto ai controlli.

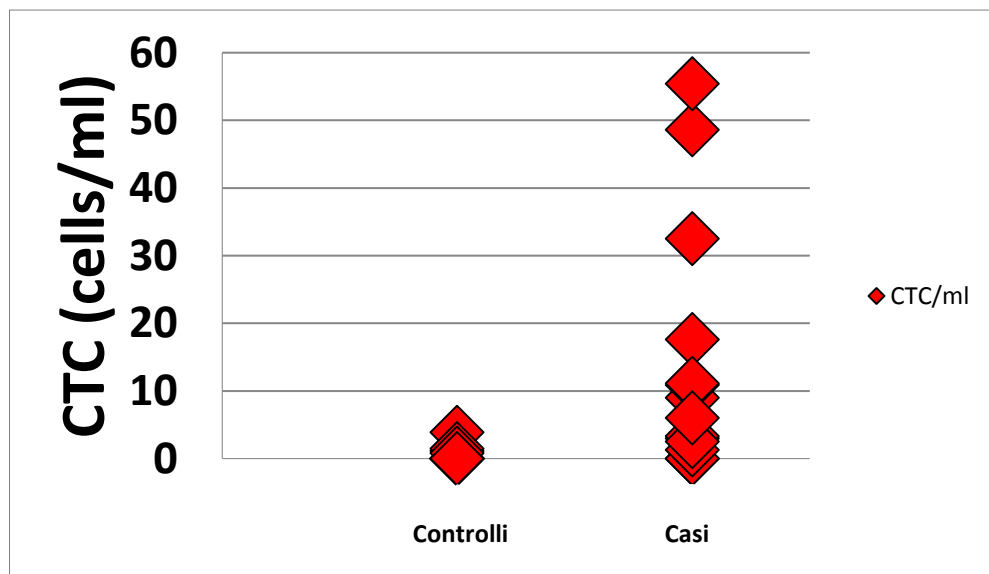


Grafico 2: Questo grafico mette in evidenza la differenza tra i valori di CTC nei controlli (a sinistra), rispetto ai pazienti (a destra).

Questo risultato è emerso dall'analisi dei citogrammi ottenuti dalla lettura al Citofluorimetro.

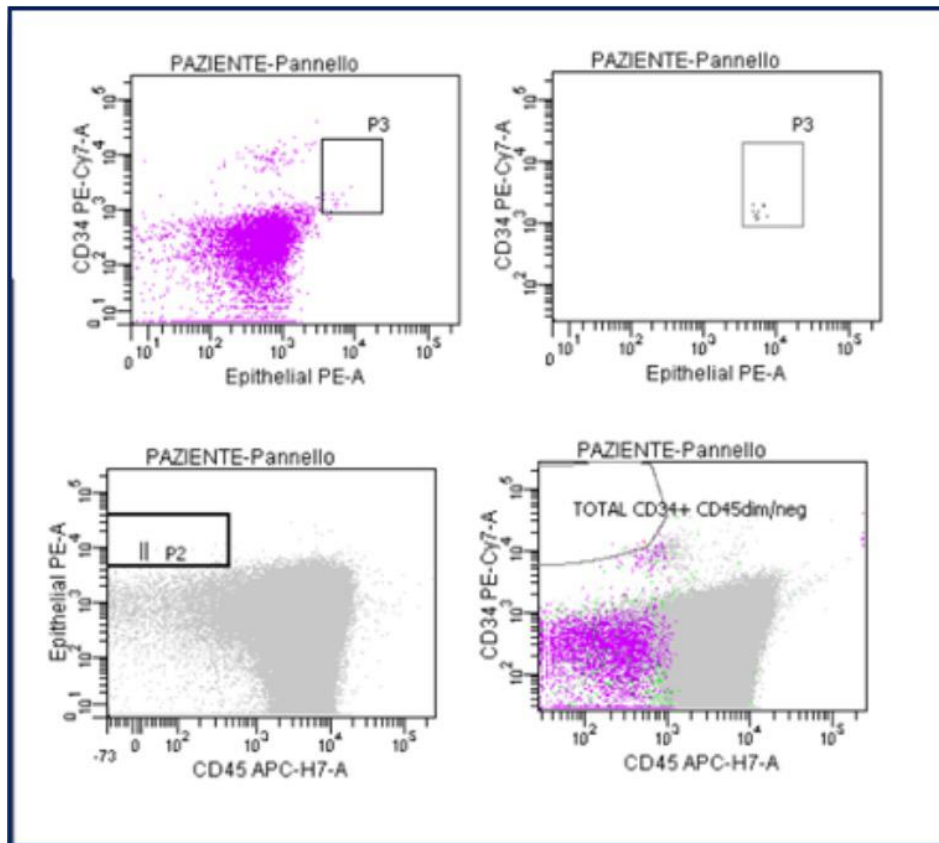


Figura 2. Esempio di citogramma ottenuto dal campione marcato con specifici anticorpi per selezionare le cellule tumorali circolanti

Possiamo inoltre affermare che un numero uguale o maggiore di 5 CTC/ ml di sangue è sicuramente un indice di malattia in corso.

Questo cut-off è assolutamente in linea con i dati presenti in letteratura.

Un valore uguale o superiore al cut-off potrebbe quindi essere utilizzato come marker diagnostico.

Tutti i pazienti che sono stati selezionati per il nostro studio soffrono di cirrosi, principalmente correlata ad HCV, presentano una

ipertensione portale senza trombosi e mostrano la presenza di almeno due noduli.

Analizzando il numero di CTC e ponendolo in rapporto con i dati raccolti durante l'anamnesi e durante vari esami, possiamo affermare che non esiste relazione alcuna tra il numero di CTC e il numero dei noduli, tra CTC e il volume dei noduli, o tra CTC e l'età dei pazienti.

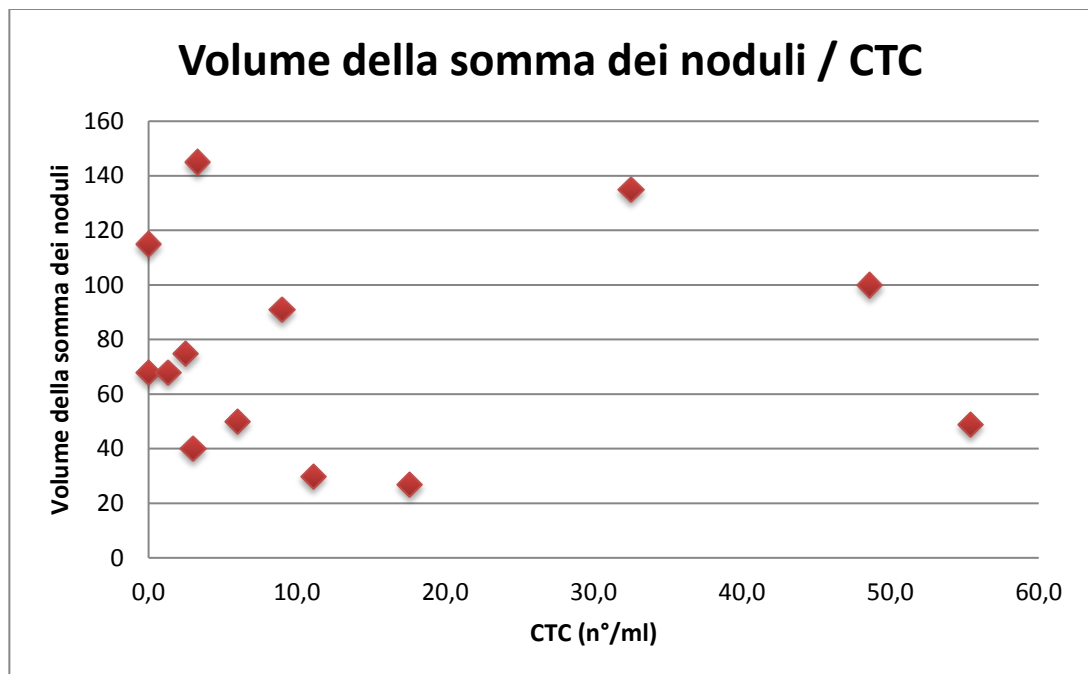


Grafico 3: Rapporto tra la somma dei volumi dei noduli e la conta delle cellule tumorali circolanti.

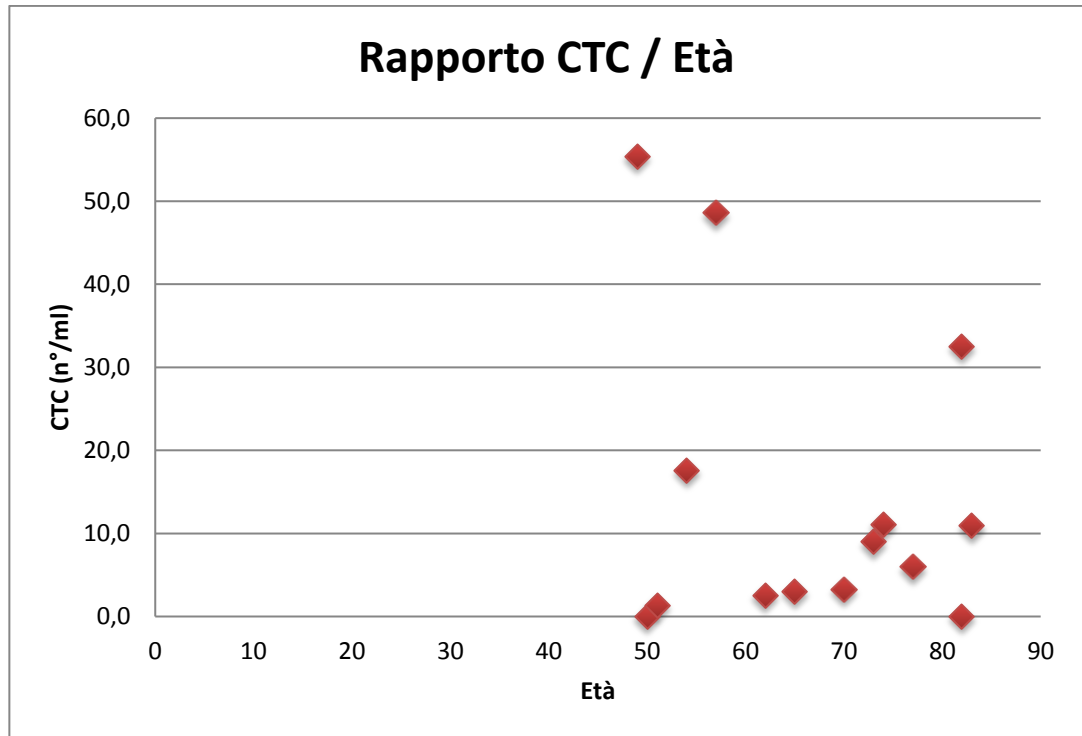


Grafico 4: Rapporto tra età dei casi e la conta delle cellule tumorali circolanti

Mentre sembra che i valori di CTC più alti siano presenti nei soggetti di sesso maschile, ma dato che il campione dei casi è troppo esiguo (soprattutto i casi di sesso femminile), non possiamo avanzare nessuna ipotesi di correlazione.

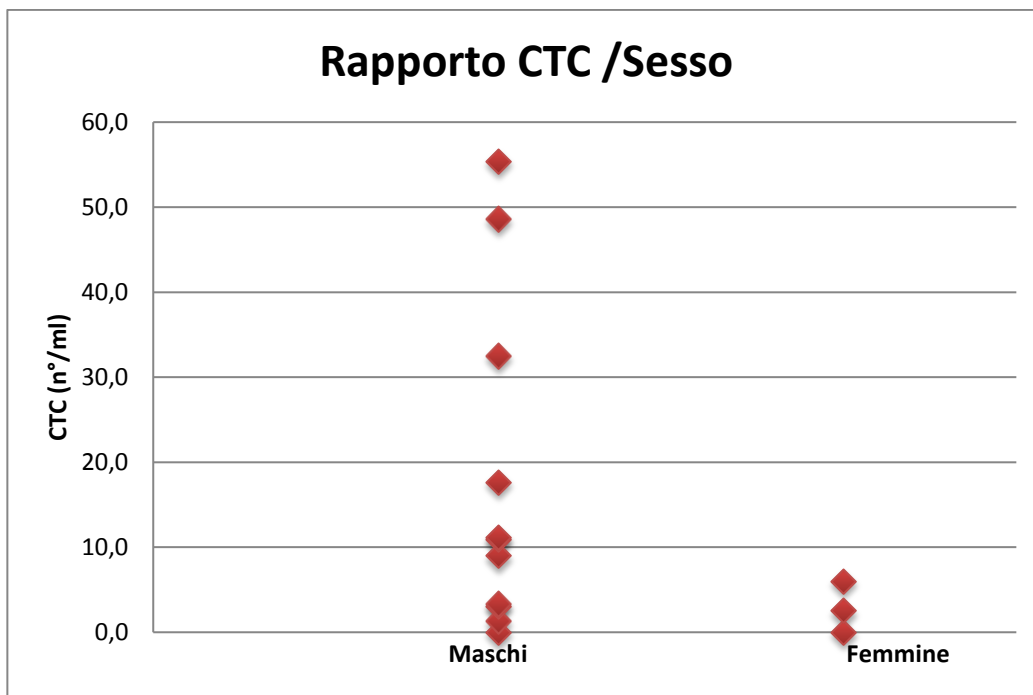


Grafico 5: Rapporto tra il sesso dei casi e numero di cellule tumorali circolanti.

È sicuramente vero che il numero dei casi va ampliato e che le ricerche sono ancora in corso, ragion per cui è difficile poter analizzare un eventuale rapporto tra il numero delle CTC e i dati che abbiamo a disposizione.

DISCUSSIONE E PROSPETTIVE FUTURE

Sicuramente i dati che abbiamo analizzato ci permettono anche qualche spunto di riflessione.

Se è accertato che un numero elevato di CTC è presente soltanto nei pazienti con HCC, ancora non è chiaro come mai in alcuni pazienti il numero di CTC è nettamente più elevato rispetto agli altri.

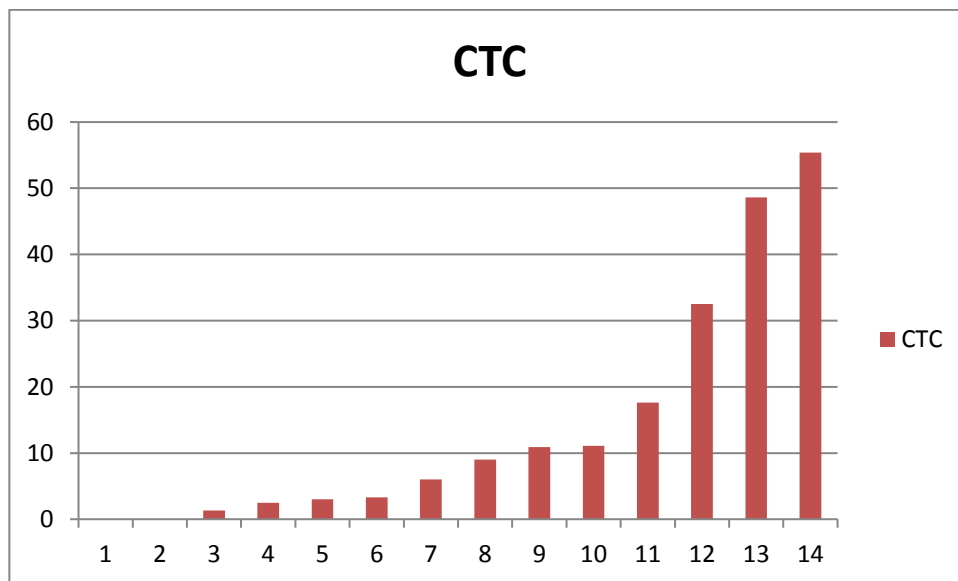


Grafico 6: Grafico ottenuto dalla conta delle cellule tumorali circolanti per ciascun paziente con HCC non metastatico.

Ricordando che tutti i pazienti hanno la stessa stadiazione e che ancora non sono stati sottoposti a nessun trattamento di natura

farmacologica o chirurgica, tutto ciò ci porta a pensare che la conta delle cellule tumorali circolanti, in un futuro prossimo, potrà essere utilizzata non solo come marker diagnostico non invasivo, ma potrà essere utile anche per un eventuale sub-classificazione nell'epatocarcinoma e anche in altri tipi di tumori.

Attualmente l'uso delle CTC come maker clinico-prognostico tumorale non può entrare nella routine diagnostica e clinica a causa dei costi, delle difficoltà tecniche e della incompletezza e della difficoltà di riproducibilità dei dati scientifici acquisiti (12).

Anche se in alcune neoplasie più studiate (tumori mammari e tumori colon-rettali) si sono effettuate modifiche nel trattamento terapeutico dei pazienti in riferimento alla variazione della conta delle CTC, tuttavia i dati riportati in letteratura sono ancora insufficienti e siamo ancora lontani dal poter effettuare una terapia personalizzata in riferimento alla valutazione qualitativa e quantitativa delle cellule neoplastiche nel sangue periferico.

Nonostante ciò le ricerche sulle CTC avranno implicazioni importanti in un prossimo futuro, perchè oltre a svelare e spiegare con precisione i meccanismi fisiopatologici e molecolari della malattia tumorale in fase precoce ed in fase metastatica, forniscono anche dati fondamentali per la ricerca clinico-farmacologica (offrendo ai pazienti neoplastici la possibilità di un monitoraggio in tempi reali dell'efficacia del trattamento chemio/immunoterapico) e per il "management" clinico del paziente e inoltre, le metodiche utilizzate per l'isolamento, lo studio e la conta delle CTC sicuramente modificheranno o

contribuiranno a modificare le attuali tecniche di diagnosi invasiva (biopsie, ago biopsie, asportazione della neoplasia etc.) e di monitoraggio della malattia tumorale riducendo le complicanze e aumentando la compliance del paziente (2,4).

Bibliografia

- 1) V. Kumar, A. K. Abbas, J C. Aster. Molecular basis of cancer. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease: 306-310; Elsevier Saunders; 9th edition, 2015
- 2) Y. Park, T. Kithahara, T. Urita, Y. Yosida, R. Kato. Expected clinical applications of circulating tumor cells in breast cancer. World J Clin Oncol 2011; 2 (8): 303-310
- 3) R. K. Kelley et al. Circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: a pilot study of detection, enumeration, and next-generation sequencing in case and controls. BMC Cancer 2015; 15:206
- 4) S. Nagrath et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. Nature 2007; vol. 450:1235
- 5) M.R Cardillo. Nozioni di tecniche diagnostiche di Anatomia Patologica. Antonio Delfino Editore; 2009
- 6) Yun-Fan Su et al. Circulating tumor cells: avances in detection methods, biological issues, and clinical relevance. J Cancer Res Clin Oncol 2011; 137:1151-1173
- 7) Christopher D. M. Fletcher. Diagnostic Histopathology of Tumors: 485-496. Elsevier Saunders; 4th edition, 2013

- 8) W. Xu, L. Cao, L Chen et al. Isolation of circulating Tumor Cells in Patients with Hepatocellular Carcinoma Using a Novel Cell Separation Strategy. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 3783-3793
- 9) Jun-Li Fan, Yi-Fei Yang, Chun-Hui Yuan Hao Chen Fu-Bing Wang. Circulating Tumor Cells for Predicting the Prognostic of Patients with Hepatocellular Carcinoma: a Meta Analysis. *Cell Physiol Biochem* 2015; 37:629-640
- 10) I. Nel, H.A. Baba et al. Individual Profiling of Circulating Tumor Cell Composition and Therapeutic Outcome in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Translational Oncology* 2013; 6:420-428
- 11) D. Antolovic, L. Galindo et al. Heterogeneous detection of circulating tumor cells in patients with colorectal cancer by immunomagnetic enrichment using different Ep-CAM-specific antibodies. *BMC Biotechnology* 2010; 10: 35
- 12) Y. Park, T. Kitahara, TT. Urita, Y. Yoshida, R. Kto. Expected clinical application of circulating tumor cells in breast cancer. *World J Clin Oncol* 2011; 10; 2 (8): 303-310
- 13) 3,3', 4,4' Tetrachlorobiphenyl inhibits proliferation of immature thymocytes in fetal thymus organ culture. Lai ZW, Kremer J, Gleichmann E, Esser C. *Scand J Immunol* (1994). 39:480-488

- 7-Amino-actinomycin D as a cytochemical probe. I. Spectral properties. Gill JE, Jotz MM, Young SG, Modest EJ, Sengupta SK. *J Histochem Cytochem* (1975) 23:793-799
- 14) Egeland T, Tjonnfjord G, Steen R, Gaudernack G, Thorsby E. Positive selection of bone marrow-derived CD34 positive cells for possible stem cell transplantation. *Transplant Proc.* 1993; 25(1):1261-1263. (Biology)
- Kishimoto T, von dem Borne AEG, Goyert SM, et al., ed. *Leucocyte Typing VI: White Cell Differentiation Antigens.* London: Garland Publishing; 1997. (Biology)
- Felschow DM, et al. 2001. *Blood* 97:3768.
- 15) Haruta Y, Seon BK. Distinct human leukemia-associated cell surface glycoprotein GP160 defined by monoclonal antibody SN6. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986;83:7898-902.
- Toi H, Tsujie M, Haruta Y, Fujita K, Duzen J, Seon BK. Facilitation of endoglin-targeting cancer therapy by development/utilization of a novel genetically engineered mouse model expressing humanized endoglin (CD 105). *Int J Cancer*, 2014 May 28. Doi: 10.1002/ijc. 28994. (ICH-FS).
- 16) Linnenbach et al, 1993, *Mol Cell Biol* 13 (3): 1507-15
- Akita H, et al, 2011, *Oncogene*
- 17) Perl AK, et al. 1998. *Nature* 392:190.
- Overduin M, et al. 1995. *Science* 267:386.

Beherens J, Vakaet L, Friis R, et al. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol.* 1993; 120(3):757-766. (Biology)

Cepek KL, Shaw SK, Parker CM, et al. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the α Eb7 integrin. *Nature.* 1994; 372:190-193. (Biology)

18) *Nucl Acids Res* 29, e41 (2001); *Cell* 82, 631 (1995); *J Neuroscience* 16, 7812 (1996); *Nature* 377,20 (1995)