

## Valutazione della ricerca dell'RNA messaggero dell'Antigene Prostatico Specifico di Membrana nel sangue periferico di pazienti affetti da Carcinoma Prostatico

Gabriella Priolo<sup>1</sup>, Nicola Faraone<sup>2</sup>, Giuseppe Aimò<sup>1</sup>, Carlo Terrone<sup>2</sup>, Gianni Pelucelli<sup>2</sup>, Teresa Zaccaria<sup>1</sup>, Eleonora Ciocia<sup>1</sup>, Salvatore Rocca Rossetti<sup>2</sup>, Roberto Pagni<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O.A. Laboratorio Centrale di Chimica Clinica "Baldi e Riberi"

<sup>2</sup>U.O.A.D.U. Clinica Urologica dell'Università di Torino - Azienda Sanitaria Ospedaliera San Giovanni Battista di Torino - Ospedale "Molinetto" - C.so Bramante, 88 - 10126 Torino

### ABSTRACT

#### Evaluation of mRNA for Prostate Specific Membrane Antigen (mRNA-PSM) assay in peripheral blood from patients with Prostate Carcinoma

In order to verify the clinical value of the mRNA-PSM detection with RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) in the management of prostate carcinoma we performed the assay in peripheral blood samples from patients with different stage prostate cancer (48 cases) in comparison with patients affected by benign urological diseases (42 cases) and healthy volunteers (18 cases). We did not obtain false positive results neither in healthy volunteers, males and females, nor in benign non prostatic diseases. Also in benign prostate hypertrophy (BPH) the specificity was very high (91.7%). The sensitivity of the assay was 100% both in metastatic cancer and in a group of clinically confined prostate cancer before radical prostatectomy. The assay was positive in 65.2% (15/23) of the patients after radical prostatectomy with no clinical evidence of recurrence at the moment of the blood sampling. According to the most diffused opinion in the literature our study did not demonstrate, although in a limited number of cases, any significant statistical correlation between the result of the test and the staging or the Gleason score of the cancer. In conclusion, the results don't allow to assign to the test a sufficient clinical value to introduce it in the decisional process for the management of the prostate carcinoma

### RIASSUNTO

Al fine di verificare l'applicabilità clinica della ricerca nel sangue periferico dell'mRNA-PSM nella gestione del carcinoma prostatico abbiamo eseguito il test, con la tecnica RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction), in pazienti con carcinoma prostatico in differente stadio (48 casi), a confronto con pazienti affetti da patologie urologiche benigne (42 casi) e con soggetti sani (18 casi). Non abbiamo ottenuto falsi positivi in soggetti sani, sia maschi che femmine, né in pazienti affetti da patologie urologiche benigne non prostatiche, ed anche nelle iperplasie prostatiche benigne (IPB) la specificità della ricerca è risultata molto alta (91.7%). La sensibilità del test è stata del 100% sia nei tumori metastatizzati che in un gruppo di tumori di varia stadiazione pre prostatectomia radicale. Il test è risultato positivo nel 65.2% (15/23) dei pazienti in follow-up dopo chirurgia radicale, senza che vi fosse evidenza clinica di ripresa della malattia al momento del prelievo. Non è stata evidenziata alcuna correlazione statisticamente significativa tra il risultato del test, la stadiazione del tumore ed il Gleason score, confermando in tal modo, seppure su un numero limitato di casi, l'opinione più accreditata in letteratura. In conclusione i risultati ottenuti non permettono di attribuire al test un valore clinico sufficiente per introdurlo nel processo decisionale del trattamento del carcinoma prostatico.

### INTRODUZIONE

Le metodiche di biologia molecolare quali la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e la RT-PCR (*Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*) sono utilizzate come potenti mezzi di indagine in svariati campi della medicina, dalla diagnosi prenatale delle malattie genetiche a quella eziologica di diverse malattie infettive di natura virale, dai metodi di identificazione in medicina legale al monitoraggio clinico di pazienti affetti da neoplasie. Esse, infatti, consentono di raggiungere, nelle migliori

condizioni operative, livelli di sensibilità dell'ordine di 1-2 cellule per 10<sup>6</sup> - 10<sup>8</sup> cellule nucleate presenti nel campione esaminato.

Fin dal 1988, grazie a questa elevata sensibilità, la sola PCR è stata correntemente utilizzata per il rilevamento di malattia minima residua in pazienti trattati per tumori ematologici (1,2,3,4). In questi casi le cellule tumorali sono identificate poiché hanno un riarrangiamento anomalo del gene mutato, non presente nelle cellule sane. L'amplificazione, mediante PCR, del DNA della regione genomica coinvolta nella cancerogenesi permette l'identificazione

delle cellule anomale anche qualora queste siano molto diluite all'interno di una popolazione di cellule sane. La trascrizione inversa dell'RNA messaggero (mRNA) nel DNA complementare (cDNA) attraverso RT-PCR, consente l'individuazione, nella popolazione cellulare, di marcatori tessuto-specifici senza la necessità di una specifica mutazione o di un riarrangiamento genico nella cellula tumorale (5,6).

Il carcinoma della prostata ha rappresentato un terreno fertile per questo tipo di indagine e numerosi sono ormai i lavori sull'impiego della RT-PCR nella ricerca di cellule che esprimono mRNA specifici per antigeni prostatici in diversi distretti (sangue, linfonodi, midollo, margini chirurgici di prostatectomia radicale). Come è noto, infatti, vi sono due proteine che sono altamente espresse dall'epitelio prostatico e quasi solamente da esso: l'Antigene Prostatico Specifico (PSA) e, di più recente identificazione, l'Antigene Prostatico Specifico di Membrana (PSM), una glicoproteina di membrana di 100 kDa. L'individuazione nel sangue di cellule veicolanti mRNA per una od entrambe le proteine è fortemente indicativa della presenza di cellule prostatiche circolanti, verosimilmente tumorali e, potenzialmente, metastatizzanti. Nel 1990 Vessella e coll. (7) hanno evidenziato il rilevamento di cellule prostatiche mediante RT-PCR per il PSA in campioni di linfonodi e midollo osseo prelevati da pazienti con neoplasia prostatica metastatica. Nel 1992 Moreno e coll. (8) hanno utilizzato l'RT-PCR per rivelare la presenza di mRNA del PSA nel sangue periferico di pazienti con neoplasia metastatica. Da allora numerosi studi hanno riportato l'impiego di queste metodiche per la ricerca di cellule prostatiche principalmente nel sangue, nei linfonodi e nel midollo osseo di pazienti affetti da neoplasia (9-14), con l'intento di verificare se la biologia molecolare potesse fornire informazioni clinicamente rilevanti per lo studio del carcinoma prostatico.

Poiché il PSA rappresenta il principale marcatore tumorale per il carcinoma della prostata, per alcuni anni il suo mRNA è stato intensamente ricercato nel sangue periferico; attualmente è la ricerca del mRNA per il PSM ad aver assunto maggior importanza. Infatti è stato dimostrato che il PSM permette di ottenere una sensibilità superiore, e questo potrebbe legato ad un forte aumento dell'espressione genica del suo RNA messaggero nelle cellule metastatiche della prostata rispetto a cellule prostatiche normali (15,16). Inoltre, l'espressione genica del PSA è stimolata dagli androgeni ed inibita dal trattamento ormonosoppressivo utilizzato in caso di malattia metastatica, mentre l'espressione del PSM è regolata in senso inverso ovvero inibita dagli androgeni (specialmente Testosterone e Diidrotestosterone). Questa caratteristica rende il PSM un attraente bersaglio della RT-PCR nei pazienti trattati con soppressione ormonale in cui l'espressione del PSM verrebbe indotta mentre quella del PSA potrebbe essere soppressa. Il PSA ed il PSM sono prodotti sia dal normale epitelio prostatico che dalle cellule prostatiche maligne ma, mentre l'espressione del PSA può diminuire od annullarsi in tumori molto indifferenziati, l'espressione del PSM sembra essere conservata (17).

Scopo di questo lavoro è lo studio del PSM e del suo mRNA in una popolazione di soggetti affetti da carcinoma prostatico in diverso stadio ed in soggetti sani o portatori di patologie urologiche benigne prostatiche e non prostatiche, al fine di determinare la sensibilità e la specificità del metodo.

## PAZIENTI E METODI

La popolazione in studio è così ripartita:

Gruppo I: popolazione di controllo (60 casi)

1. 25 maschi giudicati liberi da affezioni prostatiche (7 volontari sani e 18 pazienti con patologie urologiche non prostatiche benigne; età compresa tra 20 e 71 anni, media 45.9)

2. 11 femmine (età compresa tra 26 e 72 anni, media 53.9)

3. 24 maschi portatori di Iperplasia Prostatica Benigna (IPB) (età compresa tra 50 e 81 anni, media 67.1)

Gruppo II: popolazione affetta da carcinoma prostatico (48 pazienti)

1. 8 pazienti in attesa di intervento chirurgico radicale (età compresa tra 59 e 75 anni, media 66.3)

2. 23 pazienti in *follow up* post prostatectomia radicale e giudicati liberi da malattia a distanza di anni dall'intervento (età compresa tra 62 e 75 anni, media 67.2)

3. 17 pazienti con malattia metastatica (età compresa tra 52 ed 86 anni, media 73.8).

I pazienti, afferenti alla Clinica Urologia dell'Università di Torino tra il Novembre '97 ed il Novembre '98, sono stati sottoposti, in regime di ricovero in vista di un intervento chirurgico o durante una visita di controllo ambulatoriale, ad un prelievo di sangue periferico. Il prelievo, previo consenso informato del paziente, è stato eseguito in provette per sangue intero da 7 mL con EDTA, prima di un eventuale esame digito-rettale ed almeno due settimane dopo un'eventuale biopsia prostatica. I pazienti candidati alla prostatectomia radicale sono stati sottoposti al prelievo prima dell'intervento chirurgico. Il campione è stato inviato al Laboratorio per il successivo trattamento.

Dal momento che le cellule epiteliali prostatiche possiedono un peso specifico simile a quello dei leucociti, il processo di separazione linfo-monocitaria è stato condotto previa diluizione del sangue intero 1:2 con soluzione fisiologica (0.9% di NaCl), mediante stratificazione su gradienti di *Lymphoprep* (Ficoll 700, ditta Sigma) e centrifugazione a 2000 g per 20 minuti a temperatura ambiente per ottenere l'anello linfo-monocitario. Le cellule sono state lavate due volte con soluzione fisiologica e, dopo aver rimosso il surnatante, l'RNA totale è stato isolato mediante estrazione con guanidin-tiocianato/fenolo/cloroformio seguendo il metodo descritto da Chomczynski (18). Il "fondello" di RNA ottenuto dopo precipitazione con isopropanolo e lavaggio con etanolo è stato asciugato all'aria e risospeso in 20 µl di acqua deionizzata.

Per la ricerca dell'RNA messaggero del PSM (mRNA-PSM) si è utilizzato un *kit* fornito dalla ditta Alphagenics Diaco Biotechnologies (Trieste, Italia), che permette l'evi-

denziamento del cDNA mediante ibridazione e rivelazione su micropiastra. L'efficacia della procedura è verificata retro-trascrivendo, amplificando e rivelando in parallelo, negli stessi campioni, l'mRNA della  $\beta$ -actina.

A differenza di altre procedure di rivelazione il *kit* non fa ricorso ad una *nested*-PCR per elevare il grado di sensibilità della metodica bensì si basa sulla reazione di *reverse* seguita da una sola PCR.

Seguendo le istruzioni fornite dal *kit*, 5  $\mu$ l di RNA precedentemente estratto sono retrotrascritti mediante l'azione della trascrittasi inversa MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase). Per ogni campione è preparata una *mix* con 200  $\mu$ M di ciascun dinucleotide, 2.0 U MMLV-RT, 2.0  $\mu$ l di oligo dT, 1  $\mu$ l di inibitore delle ribonucleasi, 4  $\mu$ l di tampone 5x per la trascrittasi inversa. Ad essa sono aggiunti i 5  $\mu$ l di RNA ricavato dall'estrazione. Successivamente si procede con reazione di *reverse* incubando dapprima a 37° C per 50 minuti e poi a 95° C per 3 minuti. La reazione viene bloccata ponendo i campioni in ghiaccio.

I *primer* specifici per le singole reazioni di PCR sono stati marcati con digossigenina; ciò permette la successiva evidenziazione su micropiastra. Il tipo di *primer* scelti e le concentrazioni dei singoli componenti della *mix* di lavoro (tampone per la polimerasi, Taq DNA polimerasi, dinucleotidi, MgCl<sub>2</sub>), sono stati predisposti dalla ditta Alphagenics Diaco Biotechnologies facendo riferimento ai lavori di Israeli (15) e Loric (19).

Il profilo termico seguito per l'amplificazione è il seguente:

- denaturazione: 94° C per 2 minuti;
- 40 cicli polimerasici: 94° C per 45 secondi, 62° C per 45 secondi, 72° C per 60 secondi;
- estensione: 72° C per 7 minuti.

Il cDNA così amplificato viene evidenziato mediante rivelazione su micropiastra. Dopo lavaggi ripetuti per allontanare il materiale che non ha reagito, si procede alla fase finale di rivelazione con l'aggiunta di un anticorpo anti-digossigenina legato con perossidasi. L'assorbanza è misurata mediante un lettore di micropiastre a 405 nm di lunghezza d'onda, con filtro di riferimento di 492 nm. I risultati ottenuti sono confrontati con quelli di un controllo negativo e di un controllo positivo. Il valore *cut-off* di assorbanza suggerito dalla ditta produttrice è 0.160. Nel nostro laboratorio sono, comunque, stati ripetuti tutti i campioni con valori di Assorbanza *border-line* (0.140-0.170).

Si può evidenziare, pertanto, che il *kit* da noi utilizzato fornisce solamente un risultato qualitativo: le variazioni di assorbanza non possono essere associabili a variazioni di concentrazione dell'RNA messaggero circolante. I pozzi relativi alla  $\beta$ -actina debbono risultare sempre positivi se si è partiti da campioni idonei, ovvero se l'mRNA è stato opportunamente estratto e retro-trascritto, e rappresentano un controllo sulla correttezza dell'intera procedura.

La sensibilità del metodo dichiarata dalla Ditta produttrice del *kit*, verificata mediante l'utilizzo di una linea cellulare da carcinoma prostatico (cellule LNCaP), risulta es-

sere, nelle migliori condizioni operative, pari a 10 cellule metastatiche circolanti/mL.

## RISULTATI

La RT-PCR per la ricerca del mRNA-PSM eseguita sia sui campioni di 25 soggetti di sesso maschile liberi da affezioni prostatiche (7 volontari sani e 18 pazienti con patologie urologiche non prostatiche benigne) che sugli 11 soggetti sani di sesso femminile ha dato risultato negativo nel 100% (36/36) dei casi.

I 24 pazienti con IPB secondo la storia clinica al momento del prelievo erano così suddivisi:

1. 5 pazienti con IPB documentabile istologicamente perché sottoposti a pregressi interventi di resezione endoscopica della prostata (TURP) od adenomec-tomia;

2. 7 pazienti con diagnosi clinica di IPB e non sospetto clinico di neoplasia prostatica sulla base della determinazione del PSA sierico e della DRE;

3. 12 pazienti nel pre-operatorio di TURP o adenomec-tomia, il cui esame istologico è successivamente risultato per tutti negativo per presenza di neoplasia.

La ricerca del mRNA-PSM è risultata negativa in 22 dei 24 pazienti (91.7%). Tre dei pazienti con IPB erano stati precedentemente sottoposti, una o più volte, a biopsie prostatiche, avendo evidenziato livelli di PSA sierico elevati (da 9 a 23 ng/mL). L'esito delle biopsie era risultato negativo, ed anche la ricerca del mRNA-PSM ha dato esito negativo in tutti e tre i casi.

Nel 100% (17/17) dei pazienti con tumore della prostata metastatico la ricerca ha dato esito positivo. La popolazione di pazienti era rappresentata, al momento del prelievo, da 3 soggetti in blocco androgenico rispondenti alla terapia; 2 pazienti non ancora in trattamento e 12 in stadio D3 (refrattari alla terapia ormonale).

La RT-PCR per il PSM condotta pre-operatoriamente in 8 pazienti candidati alla prostatectomia radicale (2 pT0, 4 pT2a, 1 pT3b e 1 pT4), su campione di sangue periferico prelevato nei giorni immediatamente precedenti l'intervento, ha dato esito positivo nel 100% dei casi. La positività del test molecolare è stata riscontrata per tutti gli stadi della malattia, anche per i 4 che presentavano un tumore intracapsulare alla stadiazione anatomopatologica. I pazienti con riscontro di stadio pT0 erano stati sotto-posti pre-operatoriamente a blocco androgenico ed al momento dell'intervento avevano livelli di PSA sierico inferiori a 0.1 ng/mL.

Per 7 di questi 8 pazienti è stata ripetuta la ricerca del mRNA-PSM nell'immediato post-operatorio, in genere una settimana dopo l'intervento. In 1 soggetto si è assistito alla conversione del test, con esito negativo, mentre nei restanti 6 casi la ricerca del mRNA-PSM è rimasta positiva. Nel *follow-up* a breve termine successivo, per 2 di questi pazienti si è assistito ad una ripresa di malattia.

Il test è stato eseguito anche su 23 pazienti già trattati da 1 a 5 anni prima con chirurgia radicale per carcinoma clinicamente localizzato. Tutti questi pazienti non presentavano, al momento della determinazione, evidenza di malattia residua (PSA sierico indosabile, nessun segno

obiettivo o radiologico di recidiva). La ricerca del mRNA-PSM è risultata positiva in 15 dei 23 casi (65.2%). La positività si è riscontrata in 4 su 6 pazienti che presentavano malattia extra-capsulare (pT3), in 2 su 2 pazienti con metastasi ai linfonodi regionali ed in 9 su 15 pazienti che presentavano malattia confinata all'organo (pT2).

Considerando globalmente i pazienti con carcinoma della prostata ed il loro Gleason *score* istopatologico, non si sono rilevate differenze statisticamente significative tra i pazienti positivi (Gleason *score* medio 6.9) e quelli negativi al test (Gleason *score* medio 7.0).

## DISCUSSIONE

Le metodiche di biologia molecolare basate sul principio della RT-PCR dimostrano un'elevata sensibilità nell'identificare cellule che esprimono mRNA per il PSM, verosimilmente di origine dall'epitelio ghiandolare prostatico.

Nel nostro studio non abbiamo trovato una positività al test in nessuno dei controlli di sesso femminile né in quelli di sesso maschile liberi da affezioni prostatiche. Risultato positivo, invece, è stato riscontrato nell'8.3% di pazienti affetti da IPB e senza evidenza clinica di neoplasia prostatica. Il test è risultato positivo nel 100% dei casi di malattia francamente metastatica.

Valutando la capacità del test RT-PCR per il PSM nel discriminare tra pazienti con IPB e pazienti con carcinoma prostatico in stadio avanzato, si evidenzia una sensibilità del 100% ed una specificità del 91.7%. La specificità aumenta se includiamo nella popolazione di controllo anche pazienti affetti da patologie benigne non prostatiche, ed ancor di più se includiamo tra i controlli anche i soggetti sani (Tab. 1). Questi risultati pongono in risalto l'importanza critica della scelta dei controlli negativi per stabilire l'accuratezza della metodica, sottolineando come vi sia un limite alla sensibilità dell'RT-PCR, in quanto aumenti di sensibilità si accompagnano ad una riduzione della specificità. Per questo motivo nel nostro lavoro è stata preferita una metodica che non comprendesse una fase di amplificazione *nested*. Infatti, utilizzando questo metodo in grado di potenziare ulteriormente la sensibilità del test, già peraltro ottimale, si assiste ad una significativa riduzione della specificità, tale da ridurre l'accuratezza della metodica nel rilevamento delle micrometastasi. Poiché un possibile obiettivo del test potrebbe essere quello di escludere da terapie locali (prostatectomia radicale, radioterapia radicale) pazienti con rilevamento di micrometastasi ovvero con

malattia disseminata, è chiaro come qualsiasi riduzione della specificità comprometta l'utilità del test. Con questa finalità è senz'altro da preferire un test meno sensibile ma altamente specifico.

Alcuni autori hanno dimostrato l'esistenza di una correlazione tra i risultati della RT-PCR per il PSM, la stadiazione clinica del carcinoma prostatico e l'evoluzione clinica dopo intervento chirurgico. In tal senso è stato prospettato un possibile utilizzo della metodica come ausilio nella stadiazione e nella formulazione della prognosi (20, 21,22,23). Altri autori, invece, hanno ottenuto risultati discordanti (24,25,26).

Nel nostro studio non è emersa, innanzitutto, alcuna correlazione statisticamente significativa tra i risultati del test, i livelli sierici di PSA ed il grado istopatologico della malattia secondo Gleason. Inoltre, la RT-PCR per il PSM condotta su un singolo campione di sangue prelevato pre-operatoriamente non sembra poter essere correlata con l'estensione locale della malattia. Il test non sembra essere in grado di distinguere - e ciò sarebbe stato di grande utilità - tra malattia extra-capsulare e neoplasia confinata alla prostata. In ogni caso, il numero ridotto di pazienti non permette di trarre conclusioni definitive.

E' stata altresì indicata la possibilità che la ricerca del mRNA-PSM possa essere impiegata a scopo prognostico (27,28). Nella nostra casistica, seguendo il *follow-up* dei pazienti in cui il saggio era stato condotto nell'immediato periodo pre-operatorio, si sono verificati due casi di progressione della malattia, entrambi con test positivo. Molti pazienti positivi al test hanno, invece, presentato un *follow-up* a breve termine negativo per ripresa di malattia. Studiando, infine, il comportamento della RT-PCR per il PSM nei pazienti senza evidenza di malattia nel *follow-up* a lungo termine dopo prostatectomia radicale, abbiamo riscontrato, con un singolo prelievo, un'alta percentuale di positività sia nei pazienti che avevano una malattia extra-prostatica, sia in quelli con carcinoma localizzato alla stadiazione anatomopatologica. Diversi Autori riportano risultati altrettanto contraddittori. In genere casi inizialmente positivi rimangono tali o si convertono in negativi tra 6 e 12 mesi dall'intervento, i casi inizialmente negativi rimangono generalmente tali, ma occasionalmente si convertono a positivi pur in assenza di malattia clinicamente dimostrabile. Il significato di questi dati dovrà essere riesaminato alla luce di un numero maggiore di pazienti e di un *follow-up* sufficientemente prolungato per chiarire se i pazienti in cui la ricerca del mRNA-PSM non si converte a negativa o si positivizza nel *follow-up* siano realmente a

**TABELLA 1**

Specificità del test mRNA-PSM in funzione del gruppo di controllo

POPOLAZIONE DI CONTROLLO	POSITIVITA'	SPECIFICITA'
24 Ipertrofia Prostatica Benigna (IPB)	2/24	91.7%
24 IPB + 18 Patologie urologiche benigne	2/42	95.2%
24 IPB + 18 Patologie urologiche benigne + 7 Volontari sani maschi	2/49	95.9%
24 IPB + 18 Patologie urologiche benigne + 7 Uomini sani + 11 Donne sane	2/60	96.7%
18 Patologie urologiche benigne + 7 Uomini sani + 11 Donne sane	0/36	100.0%

rischio di ripresa di malattia.

La maggior parte degli Autori riporta che né la prostatectomia radicale né la biopsia prostatica incrementano apprezzabilmente la positività al test (29,30,31). Il nostro lavoro sembra confermare i dati della letteratura: nell'immediato post-operatorio non abbiamo avuto alcuna positività nei pazienti precedentemente negativi, mentre i pazienti che erano stati individuati come positivi sono rimasti tali o si sono negativizzati.

## CONCLUSIONI

Il test mRNA-PSM è una metodica di biologia molecolare estremamente sensibile nel rilevare cellule prostatiche circolanti potenzialmente metastatizzanti e si trova, allo stato attuale, al centro di importanti controversie circa la possibilità che esso possa essere impiegato nella valutazione clinica del carcinoma prostatico. I risultati presentati di recente in diverse pubblicazioni indicano come il test abbia un elevato valore predittivo positivo per l'estensione extracapsulare della malattia neoplastica, e possa essere pertanto impiegato con efficacia nella stadiazione del tumore prostatico e nell'impostazione della terapia (20, 21,25,26).

Sfortunatamente altri studi, tra cui il presente, non hanno confermato queste impressioni, indicando come la decisione di praticare o meno l'intervento chirurgico radicale non possa essere basata solo su questi dati. Esiste un cauto consenso sulla correlazione tra i risultati del test eseguito nell'immediato pre-operatorio e l'eventuale ripresa di malattia in pazienti con carcinoma prostatico clinicamente localizzato sottoposti a terapia chirurgica radicale. Alcuni studi indicherebbero un possibile impiego della metodica nel prevedere gli insuccessi di tale terapia. I risultati di questo studio non permettono, al momento, un giudizio in merito.

Un altro potenziale utilizzo del test concerne il monitoraggio di un'eventuale ripresa di malattia nel *follow-up* a lungo termine di pazienti sottoposti a chirurgia con intento radicale. In questa valutazione, una persistente positività del test (ovvero mancata eliminazione di cellule circolanti esprimenti PSM) sarebbe potenzialmente un indice precoce di presenza di malattia residua. Nella nostra ed in altre casistiche non si è riscontrata questa correlazione. Sebbene si osservi una discreta variabilità di risultati, la maggior parte dei pazienti positivi al test non mostrava al momento del prelievo evidenza clinica di ripresa di malattia.

E' stato ipotizzato che la disseminazione di cellule tumorali possa essere un fenomeno intermittente: in accordo con questa ipotesi è la variabilità di risultati, riportati da alcuni autori, nei pazienti in cui si effettuano multiple determinazioni del test su prelievi seriati. Si è quindi ipotizzato che le cellule vengano sequestrate nel midollo osseo con meccanismo ignoto e che, pertanto, possano essere rilevate mediante aspirato anche nei casi in cui siano evidenziate nel sangue periferico soltanto in modo intermittente.

In riferimento all'estrema variabilità dei risultati tra i diversi studi sinora pubblicati c'è infine da osservare che parte delle discrepanze osservate vanno senz'altro ricondotte a differenze metodologiche. L'esecuzione della RT-PCR è molto complessa e passibile di numerose varianti, legate alla procedura stessa e principalmente alla scelta dei *primer*, alla loro lunghezza ed all'utilizzo o meno della variante *nested*-PCR. Il Molecular Biological Technology Committee dell'American Urological Association sta attualmente valutando i risultati di molti lavori e si è formato un gruppo collaborativo per confrontare tecniche e risultati e per chiarire i punti controversi.

In conclusione, al momento attuale, se da un lato si può affermare che la metodica di biologia molecolare è in grado di fornire informazioni utili sulle caratteristiche biologiche di una neoplasia, gli studi fino ad ora condotti non permettono di attribuire al test un valore clinico sufficiente per introdurlo nel processo decisionale del trattamento del carcinoma prostatico. Sono senz'altro necessari ulteriori ricerche per valutare se, in futuro, la metodica potrà svolgere un auspicabile ruolo nello studio e nella gestione clinica di questa neoplasia.

## BIBLIOGRAFIA

1. Fey MF, Kulozik AK, Hansen-Hagge TE et al. The polymerase chain reaction: A new tool for the detection of minimal residual disease in hematologic malignancies. *Eur J Cancer* 1991; 27:89
2. Lee MS, Chang KS, Cabanillas F et al. Detection of minimal residual cells carrying the t(14:18) by DNA sequence amplification. *Science* 1988; 237:175
3. Miyomura M, Tanimoto Y, Morishima K, et al. Detection of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemias by polymerase chain reaction: possible eradication of minimal residual disease by marrow transplantation. *Blood* 1992;79:1366
4. Tycko B, Palmer JD, Link MP et al. Polymerase chain reaction amplification of rearranged antigen receptor genes using junction-specific oligonucleotides: possible application for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cells* 1989; 7:47
5. Niato H, Kuzumaki N, Uchino J et al. Detection of tyrosine hydroxylase mRNA and minimal neuroblastoma cells by the reverse transcription-polymerase chain reaction. *Eur J Cancer* 1991;27:762
6. Smith B, Selby P, Southgate J et al. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet* 1991;338:1227
7. Vessella RL, Blouke KA, Blageard C, Stray JE et al. The use of the polymerase chain reaction to detect metastatic prostate cancer in lymph nodes and bone marrow. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 1992;33:2367
8. Moreno JG, Croce CM, Fischer R et al. Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* 1992; 52:6110
9. Katz AE, Olsson C, Raffo AJ et al. Molecular staging of prostate cancer with the use of an enhanced reverse transcriptase-PCR assay. *Urology* 1994;43:765
10. Smith MR, Biggar S, Hussein M. Prostate specific antigen messenger RNA is expressed in non-prostate cells: implication for detection of micrometastasis. *Cancer Res* 1995;55:2640

11. Oefelein MG, Kaul K, Herz B et al. Molecular detection of prostate epithelial cells from the surgical field and peripheral circulating during radical prostatectomy. *J Urol* 1996; 155:238
12. Hamdy FC, Lawry J, Anderson JB et al. Circulating prostate specific antigen cells correlate with metastatic prostate cancer. *Br J Uro* 1992;69:392
13. Takahashi T, Hoshi S, Orikasa S. Genetic diagnosis of pelvic lymphonode metastasis in prostate cancer. *Urol* 1996;155:378A
14. Wood DP, Banks ER, Humphries S et al. Identification of bone marrow micrometastases in patients with prostate cancer. *Cancer Res* 1994;74:2533
15. Israeli RS, Miller WH, Su SL et al. Sensitive nested reverse transcription polymerase chain reaction detection of circulating prostatic tumor cells: comparison of prostate-specific membrane antigen and prostate-specific antigen-based assays. *Cancer Res* 1994;54:6306
16. Murphy G, Raagde H, Kenny G et al. Comparison of prostate-specific membrane antigen and prostate-specific antigen levels in prostate cancer patients. *Anticancer Res* 1995;15: 1473
17. Wright GL, Grob BM, Schellhammer PF, et al. Prostate specific membrane antigen (PSMA) is upregulated following hormone-deprivation therapy. *J Urol* 1996;155:692A
18. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 1993;15:532-536
19. Loric S, Dumas F, Eschwege P et al. Enhanced detection of hematogenous circulating prostatic cells in patients with prostate adenocarcinoma by using nested reverse transcription polymerase chain reaction assay based on prostate-specific membrane antigen. *Clin Chem* 1995;41:1698.
20. Katz AE, De Viries GM, Begg M et al. Enhanced reverse transcriptase-polymerase chain reaction for prostate specific antigen as an indicator of true pathologic stage in patients with prostate cancer. *Cancer* 1995 ;75:1642
21. Olsson CA, De Vries GM, Raffo AJ et al. Preoperative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for prostate-specific antigen predicts treatment failure following radical prostatectomy. *J Urol* 1996;155:552A
22. Jaakkola S, Vornanen T, Leinonen J et al. Detection of prostatic cells in peripheral blood: correlation with serum concentration of prostate-specific antigen. *Clin Chem* 1995;41:182
23. Ghossein RA, Scher HI, Gerald WL et al. Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: clinical implication. *J Clin Oncol* 1995; 13:1195
24. Seiden MV, Kantoff PW, Krithivas K et al. Detection of circulating tumor cells in men with localized prostate cancer. *J Clin Oncol* 1994;12:2634
25. Sokoloff MH, Cho-Lea T, Kaboo R et al. Quantitative polymerase chain reaction does not improve prostate cancer staging: a clinical-pathologic-molecular analysis of 121 patients. *J Urol* 1996;155:417A
26. Ignatoff JM, Oefelin MG, Herz B et al. Prostate specific antigen (PSA) reverse transcriptase polymerase chain reaction assay in preoperative staging of prostate cancer. *J Urol* 1996; 155:1560.
27. Edelstein RA, Zietman AL, De Las Morenas A et al. Implication of the prostatic micrometastases to the pelvic lymphonodes: first report of an archival tissue gene expression study. *J Urol* 1996;155:50S
28. De Vries GM, Olsson C.A, Benson MC, et al. Quantative and qualitative RT-PCR for PSA: molecular staging of prostate cancer. *J Urol* 1996;155:417A
29. Moreno JG, Long JP, O'Hara M et al. Surgical prostatic instrumentation causes showering of prostate cells into the circulation as determined by RT-PCR of PSA. *J Urol* 1996; 155:553A
30. Oefelein MG, Herz B, Ignatoff JM et al. Longitudinal assessment by prostate specific antigen (PSA) reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) of circulating prostate epithelial cells following radical prostatectomy (RRP). *J Urol* 1996;155:552A
31. Sokoloff MH, Patel A, Cho-Lea T et al. Surgical manipulation does not result in hematogenous dissemination of prostate cancer cells. *J Urol* 1996;155:528A