

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Oncologiche e Chirurgiche

Direttore: Prof. Donato Nitti

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA E ONCOLOGIA CHIRURGICA
XXIII ciclo

TESI DI DOTTORATO

**Analisi delle Cellule Tumorali Circolanti nel carcinoma
gastrico e nelle metastasi epatiche da cancro del
colon-retto: ruolo di Survivin e CD133
come fattori prognostici.**

Direttore della Scuola: Ch.ma Prof.ssa Paola Zanovello

Supervisore: Ch.mo Dr. Simone Mocellin

Dottorando: Loris Bertazza

Indice

1. RIASSUNTO	5
1.1. PRESUPPOSTI DELLO STUDIO.....	5
1.2. SCOPO DELLO STUDIO.....	5
1.3. PAZIENTI, MATERIALI E METODI.....	5
1.4. RISULTATI.....	6
1.5. CONCLUSIONI.....	6
2. ABSTRACT	7
2.1. BACKGROUND.....	7
2.2. AIM OF THE STUDY.....	7
2.3. PATIENTS, MATERIALS AND METHODS.....	7
2.4. RESULTS.....	8
2.5. CONCLUDING REMARKS.....	8
3. INTRODUZIONE	9
3.1. IL CARCINOMA GASTRICO	9
3.1.1. Epidemiologia.....	9
3.1.2. Eziologia del carcinoma gastrico.....	9
3.1.3. Terapia del carcinoma gastrico.....	12
3.1.4. Prognosi del carcinoma gastrico.....	14
3.1.4.1. Fattori prognostici principali.....	14
3.1.4.2. Altri fattori prognostici.....	18
3.1.4.3. Fattori prognostici molecolari e biologia del carcinoma gastrico.....	19
3.1.5. Ricorrenza di malattia.....	20
3.2. METASTASI EPATICHE DA CANCRO COLORETTALE	21
3.2.1. Il carcinoma colorettale.....	21
3.2.1.1. Epidemiologia.....	21
3.2.1.2. Prognosi.....	21
3.2.2. Metastasi epatiche da cancro colorettale.....	23
3.2.2.1. Trattamento chirurgico.....	23
3.2.2.2. Trattamento chemioterapico.....	25
3.2.2.3. Chemioterapia neoadiuvante.....	26
3.3. CELLULE TUMORALI CIRCOLANTI	27
3.3.1. Biologia delle cellule tumorali circolanti.....	27
3.3.2. Rilevamento delle CTC.....	29
3.3.2.1. Metodi basati su PCR.....	29
3.3.2.1.1. DNA come bersaglio della PCR.....	30
3.3.2.1.2. mRNA come bersaglio di PCR.....	30
3.3.2.2. Metodi citometrici.....	31
3.3.2.3. Metodi di arricchimento cellulari.....	32
3.3.3. Considerazioni su CTC e risultati clinici.....	33
3.4. PCR QUANTITATIVA	35
3.4.1. Principi di funzionamento.....	35
3.4.2. Quantificazione relativa: il metodo del $\Delta\Delta C_T$	39
3.5. SIGNIFICATO DEI MARCATORI STUDIATI	41
3.5.1. CarcinoEmbryonic Antigen.....	41
3.5.2. Cytocheratin 19.....	42
3.5.3. Cytocheratin 20.....	43
3.5.4. Vascular Endothelial Growth Factor.....	43
3.5.5. Epidermal Growth Factor Receptor.....	44
3.5.6. Survivin.....	44
3.5.7. CD133 (prominin-1).....	46
4. SCOPO DELLA TESI	47
5. PAZIENTI, MATERIALI E METODI	49
5.1. SELEZIONE DEI PAZIENTI	49

5.1.1.	<i>Carcinoma gastrico</i>	49
5.1.2.	<i>Metastasi epatiche da CRC</i>	52
5.2.	MATERIALI E STRUMENTAZIONI UTILIZZATE	54
5.3.	METODI	56
5.3.1.	<i>Processamento e stoccaggio dei campioni di sangue periferico</i>	56
5.3.2.	<i>Estrazione dell'RNA da buffy coat</i>	56
5.3.3.	<i>Quantificazione e controllo di qualità dell'RNA</i>	57
5.3.4.	<i>Retro trascrizione e RT-qrtPCR</i>	59
5.3.5.	<i>Considerazioni su Calibratori e geni Housekeeping impiegati nello studio</i>	62
5.4.	ANALISI STATISTICHE	63
5.4.1.	<i>Pazienti con carcinoma gastrico</i>	63
5.4.2.	<i>Pazienti con metastasi epatiche da CRC</i>	64
6.	RISULTATI OTTENUTI	65
6.1.	PRIMA PARTE: CTC IN PAZIENTI CON CARCINOMA GASTRICO	65
6.1.1.	<i>Caratteristiche dei pazienti con carcinoma gastrico</i>	65
6.1.2.	<i>Sensibilità della tecnica</i>	65
6.1.3.	<i>Analisi di espressione genica nei pazienti con carcinoma gastrico</i>	68
6.1.4.	<i>Analisi di sopravvivenza</i>	71
6.2.	SECONDA PARTE: CTC NELLE METASTASI EPATICHE DA CRC	75
6.2.1.	<i>Caratteristiche dei pazienti con metastasi epatiche da CRC</i>	75
6.2.2.	<i>Analisi di espressione genica nei pazienti con CRC metastatico</i>	75
6.2.3.	<i>Analisi di sopravvivenza</i>	79
6.2.4.	<i>Analisi dell'espressione di CD133</i>	83
7.	DISCUSSIONE	85
8.	BIBLIOGRAFIA	93

1. Riassunto

1.1. Presupposti dello studio

Attualmente l'unico sistema prognostico utilizzato in clinica per i pazienti con cancro gastrico è la stadiazione TNM, che crea classi di rischio con prognosi significativamente diversa, ma con un'alta variabilità del rischio all'interno delle singole classi, risultando così uno strumento prognostico non ottimale a livello di singolo paziente.

Solo il 10-20% dei pazienti con metastasi epatiche da carcinoma del colon-retto (CRC) risulta resecabile con intento radicale e di questi il 60-70% svilupperà una recidiva nonostante l'intervento potenzialmente curativo.

Entrambe queste classi di pazienti necessitano di trattamenti aggiuntivi alla chirurgia come la chemioterapia adiuvante. Sono quindi necessari fattori prognostici nuovi, che permettano di individuare i pazienti ad alto rischio da indirizzare alla terapia.

1.2. Scopo dello studio

Studiare le cellule tumorali circolanti, attraverso il profilo di espressione genica nel sangue periferico, per individuare fattori prognostici indipendenti, in modo da rendere migliore la stratificazione del rischio e di conseguenza la cura dei pazienti con adenocarcinoma gastrico e con metastasi epatiche da carcinoma del colon-retto, con particolare riguardo alla selezione dei pazienti da trattare con terapia adiuvante.

1.3. Pazienti, materiali e metodi

Nello studio sono stati inclusi 70 pazienti con adenocarcinoma gastrico in diverso stadio TNM sottoposti a gastrectomia con intento radicale e 50 pazienti con metastasi epatiche da CRC sottoposti a chirurgia. Prima dell'intervento chirurgico, a ogni paziente è stato eseguito un prelievo di sangue venoso periferico, se ne è estratto l'RNA totale ed il corrispondente cDNA è stato utilizzato per l'analisi di espressione genica mediante PCR quantitativa. Per i pazienti con carcinoma gastrico sono stati valutati i geni CK19, CEA, VEGF, Survivin; per i pazienti con metastasi epatiche da CRC sono stati valutati i geni CK19, CK20, CEA, VEGF, EGFR, CD133 e Survivin. Per valutare il ruolo

prognostico di ogni marcatore sono state effettuate le analisi di sopravvivenza uni- e multivariata.

1.4. Risultati

All'analisi multivariata secondo Cox della sopravvivenza globale, dopo selezione stepwise, sono risultati fattori prognostici indipendenti per i pazienti con cancro gastrico la stadiazione TNM e l'espressione del gene codificante per Survivin, mentre per i pazienti con CRC metastatico sono risultati fattori prognostici indipendenti la radicalità dell'intervento e l'espressione di CD133 nel sangue periferico. Inoltre Survivin era maggiormente espressa nei pazienti con carcinoma gastrico rispetto al calibratore (ottenuto dal sangue di donatori sani) nel 98.6% dei casi; analogamente CK19 era maggiormente espressa nel 97.1% dei casi. Questi dati supportano la possibilità dell'utilizzo dell'espressione genica nel sangue periferico anche come marcatore diagnostico del carcinoma gastrico.

1.5. Conclusioni

I risultati positivi di queste analisi costituiscono la base per la conduzione di più ampi studi prospettici nelle due patologie considerate, al fine di poter validare il valore prognostico dell'espressione di Survivin e CD133 nel sangue periferico dei pazienti rispettivamente con carcinoma gastrico e con CRC metastatico. Sarebbe inoltre di sicuro interesse confermare il significato diagnostico del profilo genico del sangue periferico nel cancro gastrico.

2. Abstract

2.1. Background

At present the only prognostic system routinely employed for the management of gastric cancer patients is the TNM staging classification, that identifies broad risk categories with a significant prognostic variability within each stage, which makes TNM a suboptimal predictive tool on the single patient basis.

Only 10-20% of patients with liver metastases from colorectal cancer is resectable with radical intent and 60-70% will develop a relapse despite apparently curative surgery.

Both these classes of patients therefore would benefit from additional treatments after surgery such as adjuvant chemotherapy. We need new prognostic factors that can identify patients at high risk to be submitted to treatment.

2.2. Aim of the study

To study circulating tumor cells by gene profiling the peripheral blood in order to identify prognostic biomarkers that add independent prognostic power to the conventional staging systems. This might allow for a better stratification of patients' risk and thus a better therapeutic management of gastric cancer and metastatic colorectal cancer patients, especially in the adjuvant setting.

2.3. Patients, materials and methods

70 patients, affected with gastric adenocarcinoma at different TNM stages of disease who underwent radical surgery and 50 patients undergoing liver resection for metastases from colorectal cancer (stage IV) were enrolled in the study. Immediately before surgery, a sample of peripheral blood was withdrawn from each patient. For each sample, RNA was extracted and utilized for quantitative real time PCR evaluation of the expression of the following genes: CK19, CEA, VEGF, and Survivin for gastric cancer patients; CK19, CK20, CEA, VEGF, EGFR, CD133 and Survivin for colorectal liver metastases patients. Univariate and multivariate survival analysis was performed to investigate on the prognostic role of these biomarkers.

2.4. Results

After stepwise variable selection, Cox multivariate analysis of survival showed a significant association between overall survival and both TNM stage and Survivin gene expression levels in peripheral blood of gastric cancer patients, while multivariate analysis confirmed the statistically significant association between both the radical resection and the transcriptional levels of CD133 and overall survival in colorectal liver metastases patients. In addition, Survivin transcriptional levels were higher in patients with gastric cancer as compared to the calibrator reference (obtained from the peripheral blood of healthy donors) in 98.6% of cases; analogously, CK19 was upregulated in 97.1% of cases. These findings support the hypothesis that the peripheral blood gene profile might be utilized also as a diagnostic marker in gastric cancer.

2.5. Concluding remarks

The positive findings of this pilot study are the basis for larger prospective studies in larger groups of gastric cancer and colorectal liver metastases patients, aimed to validate the prognostic power of Survivin and CD33 expression in peripheral blood of these two groups, respectively. Moreover it would be interesting to further explore also the potential diagnostic value of the peripheral blood gene profile in gastric cancer.

3. Introduzione

3.1. Il carcinoma gastrico

3.1.1. Epidemiologia

Nel 2002 ci sono stati nel mondo 933,937 nuovi casi di cancro gastrico e 700,349 casi di morte [1]. La distribuzione geografica vede come aree ad alto rischio il Giappone, la Corea, la Cina, l'Europa dell'Est e le regioni andine delle Americhe. Le aree a basso rischio sono invece l'Australia, l'Africa le regioni costali delle Americhe e la parte Sud dell'Asia. L'Europa dell'est ed il Nord America fino a pochi decenni fa ad alto rischio oggi sono considerate a basso rischio [2]. Nelle aree a maggiore incidenza, il rischio di sviluppare la neoplasia è più di dieci volte maggiore rispetto a quelle a bassa incidenza e considerando che la frequenza osservata diminuisce in alcune popolazioni, si può dedurre che c'è un forte ruolo eziologico per quanto riguarda i fattori ambientali. È stato dimostrato che la frequenza di incidenza dipendente dall'età è inferiore per ogni nuova generazione rispetto alla precedente [3]. In anni seguenti il fenomeno è stato attribuito all'infezione del batterio *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) in età giovanile [4-5].

3.1.2. Eziologia del carcinoma gastrico

Dopo il report IARC del 1994, il ruolo causativo dell'infezione da *H. pylori* è stato supportato da evidenze di tipo epidemiologico e sperimentale. Studi caso-controllo che hanno esaminato l'associazione tra l'infezione e la diagnosi di cancro gastrico hanno prodotto risultati discordanti. Queste incongruenze sono derivate dal fatto di ignorare la relazione temporale tra l'infezione, che inizia nell'età giovanile e la diagnosi clinica del tumore diverse decadi più tardi. È stato dimostrato che le lesioni gastriche precancerose in stato avanzato come ad esempio l'atrofia estesa e la metaplasia intestinale non sono nicchie favorevoli per la colonizzazione del batterio [6]. Studi caso-controllo condotti per cercare di chiarire il problema temporale dell'infezione, hanno dimostrato che il

rischio di tumore gastrico nei pazienti più giovani e/o la formazione di piccole neoplasie, hanno una chiara associazione con l'infezione da *H. pylori*. Tale associazione non è stata trovata in tumori più ampi o in pazienti più anziani, probabilmente perché in tali casi dopo la presenza del batterio per un lungo periodo di tempo, il microambiente gastrico si è rivelato non più favorevole alla sua colonizzazione [7]. Si è stimato che metà della popolazione mondiale è infettata da *H. pylori*, ma solo una piccolissima parte sviluppa il tumore gastrico, approssimativamente ogni 3 su 10,000 soggetti infettati per anno. Infatti sembra che l'infezione sia la "driving force" della carcinogenesi gastrica, però poi l'esito dell'infezione è modulato dalla suscettibilità genetica dell'individuo infetto e dall'ambiente esterno. Infatti, riassumendo, i vari fattori di rischio sono riportati in *tabella 1*. Alcuni di questi fattori di rischio non sono modificabili, altri sì e da una parte di questi sono dipese in gran misura le variazioni di incidenza occorse durante il secolo scorso [14]. In *figura 1* è presente uno schema del modello di carcinogenesi gastrica, in cui interagiscono forze multiple, che determinano se l'infezione porterà ad una gastrite non atrofica oppure a gastriti atrofiche multifocali, considerate il primo passaggio della cascata precancerosa.

<i>Fattori di rischio</i>		<i>Autori</i>
<p>Fattori ambientali: Infezione di <i>H. pylori</i>: Presente nella maggior parte dei casi di carcinoma di tipo intestinale</p> <p>Dieta: Nitriti derivati dai nitrati (acqua, conservanti alimentari); Cibi ad alto contenuto di sale; Scarso consumo di frutta fresca e verdura; Scarso consumo di vitamine A, C ed E;</p> <p>Basso stato socio-economico; Fumo di sigaretta;</p>		[8-9]
<p>Fattori acquisiti: Gastrite cronica: Ipo-acloridria: favorisce la colonizzazione da parte di <i>H. pylori</i>; La metaplasia intestinale è una condizione premaligna;</p> <p>Gastrectomia parziale: Favorisce il reflusso di fluidi intestinali biliari;</p> <p>Adenomi gastrici: Hanno il rischio di degenerazione maligna e sono considerati lesioni precancerose; Il 30% al momento della diagnosi presenta aree carcinomatose adiacenti;</p> <p>Esofago di Barrett: Aumenta il rischio di tumori della giunzione gastro-esofagea;</p>		[10-11]
<p>Fattori genetici: Rischio leggermente aumentato in pazienti con gruppo sanguigno A; Anemia perniziosa; Sindrome di Li-Fraumeni; Storia familiare di cancro gastrico; Cancro ereditario non poliposico del colon-retto (HNPCC o sindrome di Lynch); Carcinoma gastrico diffuso ereditario (mutazione di caderina-E).</p>		[12-13]

Tabella 1: principali fattori di rischio per lo sviluppo del cancro gastrico.

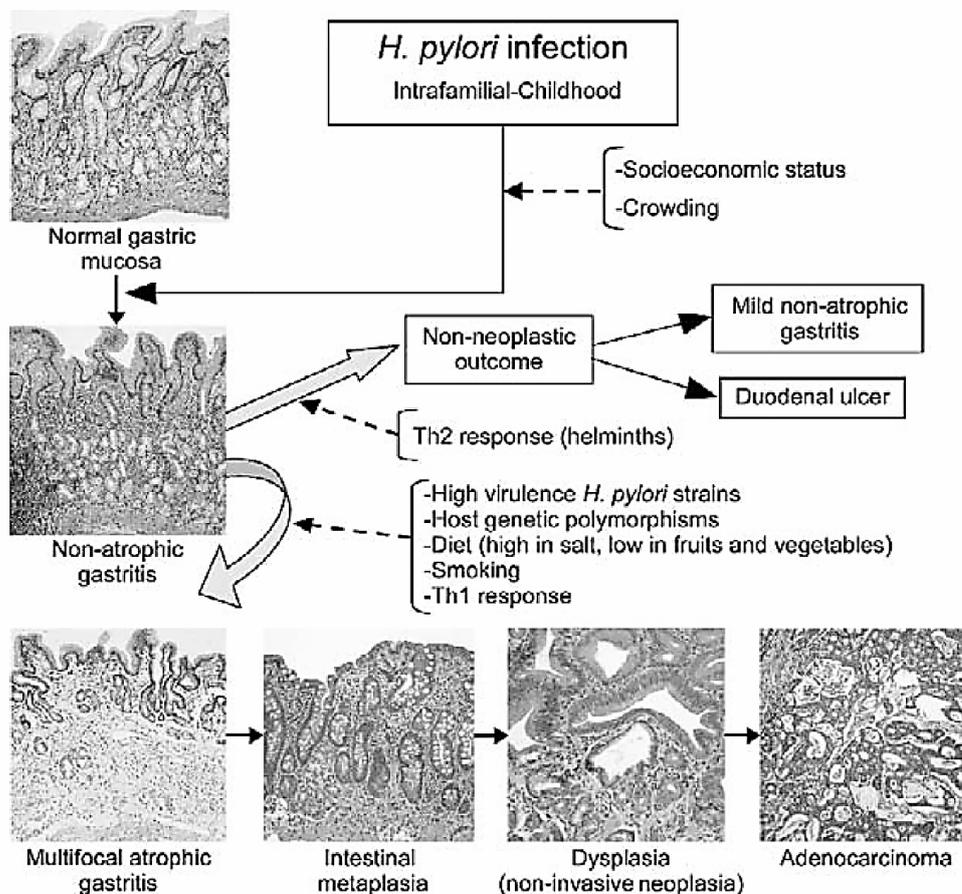


Figura 1: rappresentazione schematica del modello di carcinogenesi gastrica. La “driving force” principale è l’infezione da *Helicobacter pylori*. L’interazione di fattori multipli (umani, batterici e ambientali) determina il tipo di gastrite, sia non atrofica, che non incrementa il rischio di cancro, che atrofica multifocale, che potrebbe rappresentare il primo passaggio della sequenza di carcinogenesi gastrica (metaplasia → displasia → adenocarcinoma).

3.1.3. Terapia del carcinoma gastrico

La chirurgia è la terapia principe nel trattamento del carcinoma gastrico. L’obiettivo di una chirurgia con intento curativo è la completa rimozione del tumore con margini di resezione liberi da malattia. La scelta della procedura dipende dalla grandezza e dalla localizzazione del tumore. I margini di resezione devono essere maggiori di 5cm e questo comporta generalmente una gastrectomia totale o subtotale [15]. Per quanto riguarda la linfadenectomia, l’estensione e l’impatto della stessa è un argomento controverso [16]. Da un lato le scuole giapponesi raccomandano una dissezione linfonodale D3, che ritengono sia alla base dei loro eccellenti risultati. Questa si associa a maggiori complicanze post-operatorie, motivo per cui deve essere eseguita solo da chirurghi esperti, ma

presenta una maggiore sopravvivenza a lungo termine [17]. Dall'altro lato, molti studi occidentali riscontrano nelle resezioni D3 un maggior rischio operatorio che oltrepassa i potenziali benefici di una dissezione estesa (*tabella 2*), raccomandando quindi dissezioni D2.

Autori	Dissezione linfonodale	Numero di pazienti	Mortalità (%)	Morbidità (%)	Sopravvivenza a 5 anni (%)
Bonenkamp [18-19]	D1	380	4	25	45
	D2	331	10	43	47
Cuschieri [20-21]	D1	200	7	28	35
	D2	200	13	46	33
Bozzetti [22-23]	Gastrectomia				
	subtotale	320	1	9	65
	Gastrectomia totale	304	2	13	62

Tabella 2: studi occidentali che hanno confrontato diversi tipi di dissezione linfonodale.

Dal momento che la maggior parte dei pazienti con carcinoma gastrico diagnosticati in occidente sono in stadio III o IV, la sopravvivenza è scarsa. Al fine di migliorare i risultati terapeutici ottenuti con la sola chirurgia sono stati proposti diversi regimi chemio e radioterapici adiuvanti [24]. Come evidenziato da diversi trials, la chemioterapia adiuvante determina un miglioramento sia in termini di sopravvivenza che di qualità di vita. Sono stati proposti diversi regimi in monoterapia o in combinazione ma non si è giunti alla definizione di uno standard terapeutico. Alcuni di questi regimi sono:

- ✓ FAM = fluorouracile + doxorubicina + mitomicina-C;
- ✓ FAP = fluorouracile + doxorubicina + cisplatino;
- ✓ ECF = epirubicina + cisplatino + fluorouracile;
- ✓ ELF = etoposide + fluorouracile + leucovorina;
- ✓ PELF = cisplatino + epidoxorubicina + leucovorina + fluorouracile con glutatione e filgrastima;
- ✓ FAMTX = fluorouracile + doxorubicina + metotrexate;
- ✓ FUP = fluorouracile + cisplatino [25].

Il 5- fluorouracile (5-FU) è uno dei chemioterapici più utilizzati nel carcinoma gastrico ed è il farmaco cardine di diverse combinazioni, il tasso di risposta

(response rate) per le varie combinazioni si aggira intorno al 20-30%, il più elevato registrato è del 45% ed è stato ottenuto con la combinazione ECF [26].

Tuttavia il contributo complessivo della chemioterapia per quanto riguarda la sopravvivenza rimane limitato, aggirandosi intorno al 4% dopo resezione con intento radicale [27].

Anche la radioterapia ha un suo ruolo ed è in genere associata a chirurgia e chemioterapia: il razionale dell'utilizzo della radioterapia deriva dalla forte tendenza del tumore a una recidiva locale [28]. La terapia neoadiuvante, sia essa chemioterapia, radioterapia, immunoterapia o combinazioni terapeutiche e la chemioterapia adiuvante intraperitoneale offrono limitati vantaggi in termini di controllo locale e sistemico della malattia [29].

3.1.4. Prognosi del carcinoma gastrico

La prognosi è fortemente influenzata dallo stadio e dalla possibilità di ottenere una chirurgia con intento curativo. Dal momento che il carcinoma gastrico negli stadi iniziali è spesso asintomatico o paucisintomatico viene più frequentemente diagnosticato negli stadi avanzati. La sopravvivenza a 5 anni rimane scarsa, aggirandosi intorno al 20-30% [30]. Questo è attribuibile, almeno in parte, a una diagnosi tardiva. Infatti solo il 30-60% dei pazienti nei paesi occidentali viene sottoposto a una chirurgia con intento curativo [31]. Al contrario un programma di screening endoscopico permetterebbe una diagnosi precoce: in Giappone questo ha comportato una notevole riduzione nella mortalità [32], tuttavia tale approccio è molto costoso e quindi giustificato solo in paesi ad altissima incidenza.

3.1.4.1. Fattori prognostici principali

Essendo la chirurgia il trattamento più importante per il paziente con carcinoma gastrico, risulta di fondamentale importanza stabilire l'operabilità e la resecabilità del tumore. Per resezione R0 si intende l'assenza di residui tumorali, né macro né microscopici, per resezione R1 la presenza di residui tumorali microscopici, per resezione R2 la presenza di residuo tumorale macroscopico.

Questo fattore prognostico in passato non è sempre stato riportato, rendendo difficile l'interpretazione dei risultati [33].

L'ottenimento di una resezione R0 è il singolo fattore più importante per la sopravvivenza dei pazienti [34] (*figura 2*).

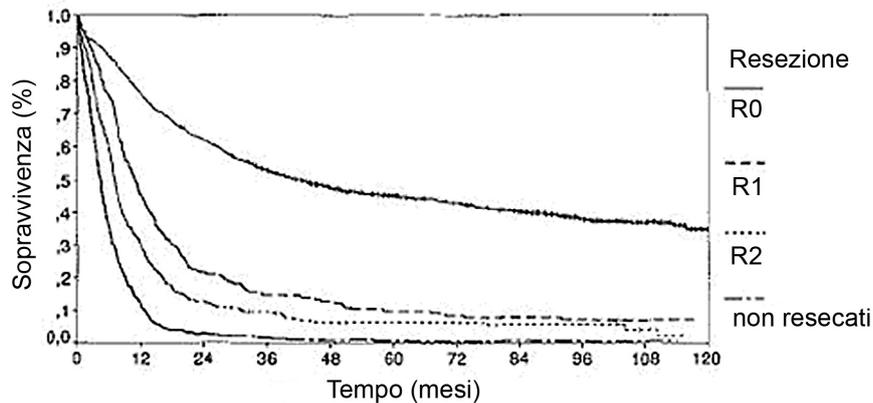


Figura 2: sopravvivenza dei pazienti con cancro gastrico in relazione al tipo di resezione [35].

Tuttavia, nonostante l'ottenimento di una chirurgia apparentemente radicale, la prognosi dei pazienti rimane insoddisfacente a causa dell'eventuale presenza di malattia minima residua.

Al di là dell'operazione, il più importante e universalmente accettato indice prognostico è la stadiazione. Fra diverse stadiazioni proposte il sistema più utilizzato è l' American Joint Committee on Cancer TNM Staging System (*tabella 3*).

T = Tumore primitivo			
Tx	La presenza del tumore primitivo non può essere valutata		
T0	Nessuna evidenza di tumore primitivo		
Tis	Carcinoma in situ senza invasione della lamina propria		
T1	Tumore che invade la lamina propria o la sottomucosa		
T2	Tumore che invade la muscolare propria o la sottosierosa		
T2a	Tumore che invade la muscolare propria		
T2b	Tumore che invade la sottosierosa		
T3	Tumore che invade la sierosa		
T4	Tumore che invade le strutture adiacenti		
N = Stato linfonodale			
Nx	La presenza di linfonodi metastatici non può essere valutata		
N0	Assenza di metastasi nei linfonodi regionali		
N1	Da 1-6 metastasi nei linfonodi regionali		
N2	Da 7-15 metastasi nei linfonodi regionali		
N3	Più di 15 metastasi nei linfonodi regionali		
M = Metastasi a distanza			
Mx	La presenza di metastasi a distanza non può essere valutata		
M0	Assenza di metastasi a distanza		
M1	Presenza di metastasi a distanza		
Stadio TNM			
Stadio 0	Tis	N0	M0
Stadio IA	T1	N0	M0
Stadio IB	T1	N1	M0
	T2a	N0	M0
	T2b	N0	M0
Stadio II	T1	N2	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadio IIIA	T2a	N2	M0
	T2b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
Stadio IIIB	T3	N2	M0
Stadio IV	T4	N1, N2, N3	M0
	T1, T2, T3	N3	M0
	Qualsiasi T	Qualsiasi N	M1

Tabella 3: classificazione del cancro dello stomaco secondo l'American Joint Committee on Cancer (AJCC, 6° Edizione) [36].

I fattori più importanti che influenzano la sopravvivenza di un paziente con cancro gastrico resecabile sono la profondità di invasione della parete gastrica, il numero di linfonodi invasi e la presenza di metastasi a distanza (figura 3). Questi parametri sono alla base di tutti i sistemi di stadiazione [37], anche se non possono essere sempre tutti valutati accuratamente durante una stadiazione preoperatoria [38].

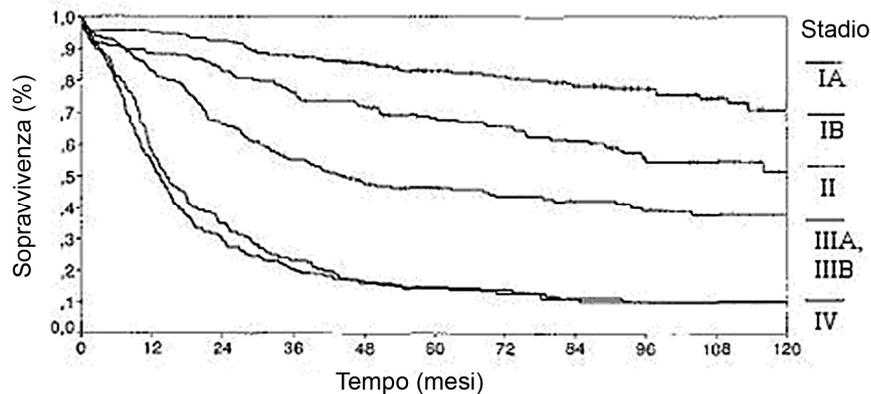


Figura 3: sopravvivenza dei pazienti con cancro gastrico in relazione allo stadio TNM [35].

Sempre più studi sostengono l'importanza della valutazione dell' N-ratio (figura 4) ossia il rapporto fra il numero di linfonodi invasi e il numero di linfonodi asportati (più questo rapporto si avvicina ad uno più la sopravvivenza è bassa). L'N-ratio risulta un fattore prognostico indipendentemente nell'analisi multivariata e diversi autori ritengono che dovrebbe diventare parte integrante della stadiazione TNM ed essere utilizzato di routine [39].

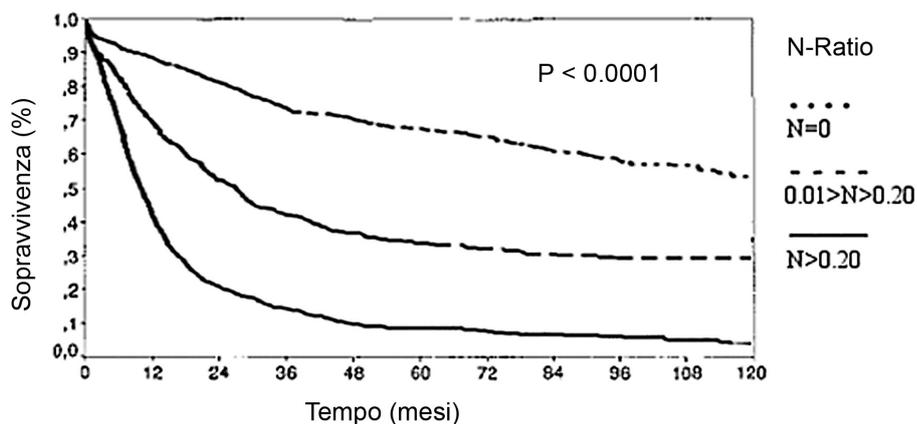


Figura 4: sopravvivenza dei pazienti con cancro gastrico in relazione all'N-Ratio (ossia il rapporto fra il numero di linfonodi invasi e il numero di linfonodi asportati) [40].

3.1.4.2. *Altri fattori prognostici*

Ci sono molti altri fattori prognostici convenzionali di più o meno discussa utilità. Secondo molti studi il tumore a sede prossimale ha una prognosi peggiore di quello a sede distale [41]. Questi due localizzazioni infatti rispecchiano tumori con differenti caratteristiche (*tabella 4*).

	Prossimale	Distale	Autori
Incidenza	Crescente	Decrescente	
Associazione con H.Pylori	Debole	Forte	
Associazione con stato sociale	Alto	Basso	[42-45]
Istologia più frequente	Diffuso	Intestinale	
Contenuto di DNA	Aneuploide	Diploide	
Diffusione	Precoce, ematogena	Tardiva, locoregionale	

Tabella 4: differenze caratteristiche fra tumore a sede prossimale e distale.

Alcuni autori riportano che il cancro gastrico in sede prossimale è più frequentemente associato a cattiva prognosi rispetto a quello in sede distale [46-47]: questo potrebbe essere spiegato dalla più frequente presenza in sede prossimale di tumori in stadio più avanzato [48]. Il volume del tumore sembra avere anch'esso un ruolo prognostico indipendente, con prognosi peggiore in tumori di maggiori dimensioni [49]. Secondo analisi multivariate della sopravvivenza, la classificazione istologica proposta dalla WHO non ha un effetto prognostico indipendente, eccezion fatta per il raro carcinoma a piccole cellule che ha una prognosi peggiore [50]. Altre classificazioni istologiche sono la classificazione di Ming (tipo infiltrante o espansivo) e la classificazione di Lauren (tipo intestinale o diffuso). Generalmente i pazienti con un tumore di tipo diffuso secondo Lauren hanno una prognosi peggiore: questo può essere spiegato dal fatto che generalmente si presentano in uno stadio più avanzato [51]. Il significato prognostico del grading rimane incerto perché i risultati di diversi studi sono controversi [52-54]. L'invasione angio-linfatica, ma anche venosa e perineurale sono considerati fattori a prognosi avversa [50, 55]. I carcinomi insorti in giovane età sembrano essere a prognosi peggiore [56], ma non tutti gli studi concordano su questo [57]. Da un unico studio le donne sono risultate avere una maggiore sopravvivenza ma questi dati non sono stati confermati [58]. La presenza di patologie concomitanti e il performance status del paziente (indice di Karnofsky)

sono predittori di sopravvivenza statisticamente significativi [59]. In passato è stata data importanza al rilievo di marcatori neoplastici sierici [60], ma anche nel succo gastrico [61] e nel lavaggio peritoneale [62]. A tal proposito sono stati indagati: Carcinoembryonic antigen (CEA), Alpha-fetoprotein (AFP), human chorionic gonadotrophin (hCG), carbohydrate antigen 19-9 (CA-19-9), carbohydrate antigen 125 (CA-125), carbohydrate antigen 72-4 (CA 72-4) ed altri, ma il loro ruolo come fattori prognostici indipendenti rimane limitato [63]. Pazienti con CEA, CA19-9 o AFP preoperatori più alti hanno prognosi peggiore: questa relazione può essere dovuta a un maggiore aumento di questi marcatori nei tumori a stadio più avanzato [64]. L'indipendenza in analisi multivariate è stata dimostrata per CEA e CA19-9 [65]. Tuttavia, l'utilizzo di tutte queste informazioni macro e microscopiche ha dei limiti intrinseci e dal punto di vista prognostico, anche messe insieme, raggiungono un plateau che potrebbe essere superato solo aggiungendo informazioni ottenibili da studi di biologia molecolare [66].

3.1.4.3. Fattori prognostici molecolari e biologia del carcinoma gastrico.

Negli ultimi decenni molti studi hanno suggerito che le alterazioni genetiche abbiano un ruolo nello sviluppo e nella progressione del cancro gastrico [67]. Lo studio del tumore primitivo a livello molecolare può essere utile per capire la patogenesi della malattia. Per poter metastatizzare, le cellule cancerogene devono fare un percorso a tappe multiple e devono acquisire proprietà che ne permettano: la perdita dell'inibizione da contatto, l'invasione locale, la motilità, l'angiogenesi, l'invasione vascolare, la sopravvivenza nel torrente circolatorio, l'adesione alle cellule endoteliali, la diapedesi transvasale ed infine la crescita nella nuova sede [66]. L'utilizzo di microarray è una delle possibilità offerte alla biologia molecolare e sta velocizzando la comprensione di questi fenomeni. Inoltre per alcuni di questi fattori biologici sta emergendo un ruolo come fattori prognostici e si ritiene che in un futuro possano essere utilizzati in ambito clinico. In aggiunta, alcuni fattori potrebbero aiutare a indirizzare al meglio le terapie esistenti, ma anche consentire lo sviluppo di nuove terapie molecolari mirate [68]. A livello

prognostico sono state chiamate in causa diverse molecole o fattori; i più importanti di questi sono: l'instabilità dei microsattelliti [69], il bilancio fra metalloproteinasi e inibitori delle stesse che se è alterato può favorire l'invasione [70], il VEGF che promuove l'angiogenesi, l'oncosoppressore p53 [71], la caderina-E che media l'adesione [72] e molti altri. Tuttavia la maggior parte di questi dati derivano da studi su casistiche limitate e sono necessari studi su scala più ampia per poter meglio definire il valore prognostico di questi fattori [73].

3.1.5. Ricorrenza di malattia

Dopo una chirurgia di tipo R0, a livello teorico, se fosse stata asportata ogni singola cellula tumorale, il tasso di recidiva dovrebbe essere zero; potrebbe semmai insorgere un nuovo tumore. Nella realtà invece, dopo un periodo di remissione clinica, circa il 40-60% dei pazienti operati in modo apparentemente curativo svilupperà una recidiva: di questi il 75-80% nel corso di due anni e il 98% nel corso di cinque anni [74-75]. La recidiva può essere solo loco-regionale (nel 23-56%), abbastanza raramente può essere solo a distanza (nel 6% circa), frequentemente può essere sia loco-regionale che a distanza. I pazienti muoiono più frequentemente a causa delle metastasi che delle recidive locali [76]. Il reintervento può avere successo solo in un gruppo limitato di pazienti, in generale quelli che erano stati trattati con una gastrectomia subtotale [77]; alcuni autori hanno studiato un approccio chirurgico con finalità curativa in pazienti con metastasi epatiche, ma i benefici sembrano simili a quelli della chemioterapia sistemica [78-80]. La chemioterapia palliativa rimane il trattamento standard nei pazienti con recidiva.

3.2. Metastasi epatiche da cancro coloretale

3.2.1. Il carcinoma coloretale

3.2.1.1. Epidemiologia

Il cancro coloretale (CRC) è il terzo tumore maligno più comune nel mondo e la seconda causa di morte per cancro nel Nord America e nell'Europa Occidentale [81]. Negli Stati Uniti è il terzo tumore più frequente in entrambi i sessi (dopo prostata e polmone nel maschio e mammella e polmone nella femmina) e rappresenta il 10% di tutte le neoplasie con un'incidenza di 148.810 nuovi casi/anno (nei maschi 77.250 casi/anno, nelle femmine 71.560 casi/anno) e una mortalità di 49.960 casi/anno [82]. In Europa vengono diagnosticati ogni anno circa 250.000 nuovi casi, che corrispondono al 9% di tutti i tumori [42]. In Italia i casi di nuove diagnosi e decessi annui, nel 2005, sono stati, rispettivamente, 46.000 e 16.000; il 58% ha riguardato la popolazione maschile [83]. Il CRC è generalmente un tumore maligno associato agli anziani, con un'età media alla diagnosi di 73 anni; fino all'età di 50 anni gli uomini e le donne presentano tassi di incidenza e mortalità simili, dopo i 50 anni gli uomini sono maggiormente predisposti. All'età di 70 anni, almeno il 50% della popolazione occidentale svilupperà una forma di tumore del colon, che origina a partire da un polipo benigno fino ad arrivare ad un adenocarcinoma invasivo [84]. Negli ultimi 30 anni nei paesi industrializzati c'è stato un lieve decremento dell'incidenza seguito da una più evidente riduzione della mortalità, probabilmente a causa di una crescente efficacia delle terapie [85].

3.2.1.2. Prognosi

Lo stadio patologico rappresenta il più importante fattore prognostico per i pazienti con cancro del colon-retto. Il sistema TNM, come definito dalla AJCC, è il sistema di stadiazione più comunemente usato e si basa su tre parametri: profondità di infiltrazione della parete intestinale (T), grado di coinvolgimento dei linfonodi regionali (N) e presenza di siti di malattia a distanza (M) [86]. Essendo lo stadio della malattia uno dei più importanti fattori prognostici è clinicamente

significativo conoscere l'incidenza relativa per ogni stadio. L'incidenza della malattia dello stadio I negli Stati Uniti è aumentata negli ultimi anni grazie ad una migliore diagnosi precoce ed è attualmente di circa il 30%. Questo è uno sviluppo importante dal momento che l'individuazione della malattia nella fase precoce aumenta le possibilità di resezione radicale R0 e di potenziale cura per il cancro coloretale. L'incidenza della malattia nello stadio II e III è rispettivamente del 27% e del 24%, mentre la malattia nello stadio IV è presente nel 19% dei pazienti negli Stati Uniti. Per i pazienti con neoplasie allo stadio I è prevista una sopravvivenza a 5 anni superiore al 90%, nello stadio II una sopravvivenza del 60-85%, nello stadio III è raggiunta una sopravvivenza del 25-65%, nello stadio IV del 5-7% (tabella 5) [87].

Stadio TNM	TNM	Dukes	sopravvivenza a 5 anni
I	T1 N0 M0 T2 N0 M0	A	>90%
II	T3 N0 M0 T4 N0 M0	B	60-85%
III	ogni T N1 M0 ogni T N2,N3 M0	C	25-65%
IV	ogni T, ogni N, M1	D	5-7%
Tumore primitivo (T) TX: Il tumore primitivo non può essere valutato Tis: Carcinoma in situ T1: Il tumore invade la sottomucosa T2: Il tumore invade la muscularis propria T3: Il tumore penetra la muscularis propria e invade la sottosierosa T4: Il tumore invade direttamente altri organi o strutture o perfora il peritoneo viscerale Linfonodi (N) NX: I linfonodi regionali non possono essere valutati N0: No metastasi nei linfonodi regionali N1: Metastasi in 1-3 linfonodi regionali N2: Metastasi in 4 o più linfonodi regionali Metastasi a distanza (M) MX: La presenza o assenza di metastasi a distanza non può essere determinata M0: Non sono rilevate metastasi a distanza M1: Sono rilevate metastasi a distanza			

Tabella 5: stadiazione e prognosi del carcinoma coloretale.

3.2.2. Metastasi epatiche da cancro coloretale

Il fegato è la sede più comune di metastasi da CRC: dei circa 150.000 casi diagnosticati ogni anno negli Stati Uniti, il 25% si presenta con metastasi epatiche sincrone e un ulteriore 40-50% svilupperà metastasi metacrone in seguito a resezione radicale primaria coloretale [88-89]. Dati autoptici suggeriscono che circa il 50% dei pazienti deceduti a causa di CRC hanno metastasi epatiche, che sono l'unico sito di malattia metastatica in circa il 20-30% dei pazienti e la causa di morte nella maggior parte di questi [90]. Le metastasi epatiche da CRC se non trattate portano a una sopravvivenza mediana di 3-20 mesi, l'uso della chemioterapia solo raramente permette la guarigione o la sopravvivenza a 5 anni. Fattori associati ad uno svantaggio nella sopravvivenza nei non resecati includono [91]:

- L'estensione della malattia epatica
- La presenza di malattia extraepatica
- I livelli del CEA
- L'età del paziente

Autore	Anno	Numero pazienti	Sopravvivenza a 5 anni (%)
Sheele [92]	1991	207	39.0
Sheele [93]	1995	350	39.3
Fong [94]	1999	1001	37.0
Minagawa [95]	2000	235	38.0
Choti [96]	2002	226	40.0
Okano [97]	2002	152	67.9
Abdalla [98]	2004	358	58.0
Fernandez [99]	2004	100	58.0
Pawlik [100]	2005	557	58.0
Tanaka [101]	2008	277	45.7

Tabella 6: tasso di sopravvivenza a 5 anni dopo resezione epatica con intento curativo.

3.2.2.1. Trattamento chirurgico

Il trattamento curativo standard nei pazienti con metastasi epatiche da CRC è la resezione epatica, con un tasso di sopravvivenza a 5 anni dopo resezione compreso tra il 37% e il 68% (tabella 6). Se una malattia potenzialmente resecabile è lasciata non trattata, la sopravvivenza a 5 anni è

virtualmente zero [102-103]. La resezione chirurgica delle metastasi epatiche può avvenire in modo sicuro nella maggior parte dei pazienti e la mortalità mediana postoperatoria a 30 giorni è del 2,8%. Le cause più comuni segnalate di morte postoperatoria includono l'insufficienza epatica, l'emorragia postoperatoria e la sepsi [104].

Nell'80-90% dei pazienti le metastasi risultano non resecabili al momento della diagnosi [105]. La storia naturale dei pazienti con malattia non resecabile è quasi uniformemente fatale con sopravvivenza mediana che va dai 14 ai 21 mesi [106]. Attualmente con le innovazioni nell'approccio terapeutico, il tasso di resecabilità è aumentato. Più studi hanno dimostrato che la chemioterapia neoadiuvante (NC) consente al 12.5-38% dei pazienti precedentemente considerati non resecabili di essere sottostadiati e di beneficiare della resezione epatica con tassi di sopravvivenza globale a 5 anni simili a quelli dei pazienti che hanno subito la resezione primaria [105] (*figura 5*). Anche quando la resezione epatica è eseguita con intento curativo, il 60-70% dei pazienti svilupperà una recidiva locale, regionale o a distanza. L'80% di tutte le recidive si verificano entro 2 anni, il tempo mediano della recidiva è di 10 mesi. La ricorrenza avviene ugualmente in sede epatica ed extraepatica, la metà di tutte le ricorrenze coinvolgono il fegato e in un terzo dei casi il coinvolgimento epatico è esclusivo. La sopravvivenza mediana della malattia ricorrente, in assenza di trattamento è di 8-10 mesi. Resezioni ripetitive sono possibili nel 10-15% dei casi di malattia ricorrente e si può ottenere una sopravvivenza del 15-40% in pazienti selezionati [91]. La sopravvivenza a 5 anni dipende da fattori prognostici come scarsa differenziazione del tumore, elevate dimensioni, numero di metastasi, staging di Duke, presenza di metastasi extra-epatiche, elevati livelli del CEA e linfonodi positivi [103].

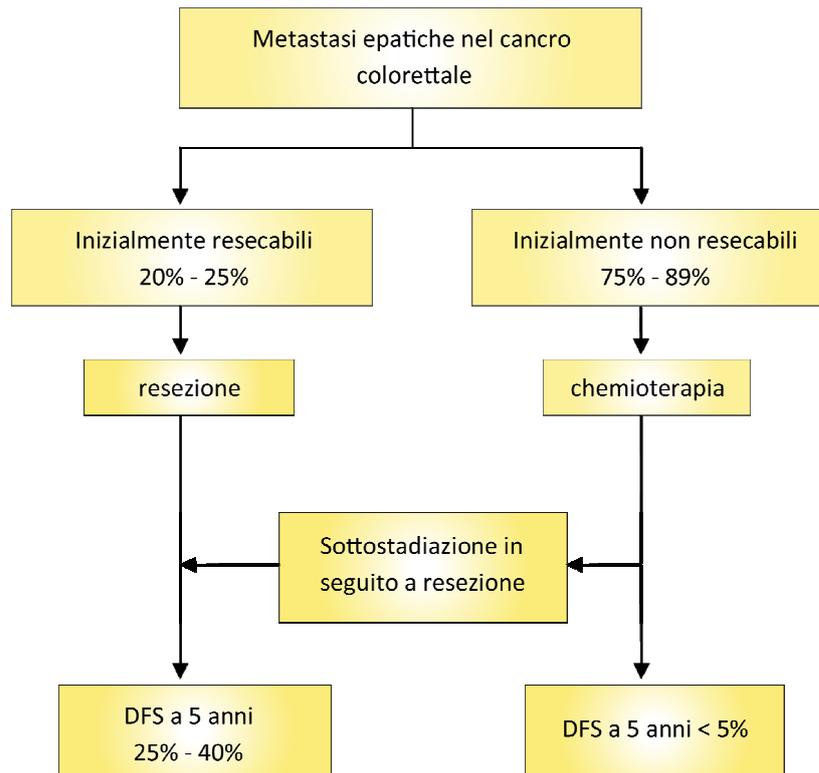


Figura 5: management dei pazienti con metastasi epatiche da carcinoma coloretale e risultati attesi con il trattamento corrente. DFS: disease free survival.

3.2.2.2. Trattamento chemioterapico

Per i pazienti con malattia non resecabile e/o diffusione extraepatica, la chemioterapia sistemica con fluoropirimidine è stata alla base del trattamento per oltre 40 anni. Il trattamento con 5-FU produce circa un tasso di risposta del 20% e un tasso di sopravvivenza a 2 anni del 20%. Recentemente è stato dimostrato che l'aggiunta di irinotecan o oxaliplatino a schemi terapeutici basati su 5-FU porta a tassi di risposta superiori (40–57%) come pure a una maggiore sopravvivenza mediana (15-20 mesi) [107]. La combinazione di capecitabina e oxaliplatino è simile alla combinazione di fluorouracile e capecitabina in efficacia e sicurezza. Il bevacizumab, un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro il vascular endothelial growth factor (VEGF), combinato con la chemioterapia basata su fluoropirimidine, è ora il trattamento di prima linea standard per il cancro coloretale metastatico. Il cetuximab, un anticorpo monoclonale chimerico IgG1 diretto contro il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), ha efficacia come monoterapia e in combinazione con irinotecan [108].

3.2.2.3. Chemioterapia neoadiuvante

La chemioterapia come trattamento di prima linea nel cancro metastatico coloretale è notevolmente migliorata nell'ultimo decennio, permettendo un aumento della sopravvivenza nei pazienti in cui la terapia è utilizzata a scopo palliativo, ma ha anche offerto una possibilità di cura ai pazienti considerati non resecabili: l'obiettivo della NC è di rendere resecabili metastasi considerate precedentemente non resecabili [109]. La NC ha infatti dimostrato di aumentare il tasso di resezione del 13-20% in pazienti selezionati grazie alla sotto stadiazione della malattia [91]. I benefici della NC sono stati particolarmente importanti in pazienti dove la non resecabilità è dovuta alla presenza di malattia esclusivamente epatica [110]. Inoltre, fornisce una valutazione in vivo della risposta alla chemioterapia e consente la possibilità di continuare o modificare il trattamento sulla base della risposta del singolo paziente. Infine, la risposta alla NC è stata identificata come indicatore prognostico indipendente di sopravvivenza dopo una resezione curativa [111-112].

Vari studi hanno utilizzato o la combinazione di 5-FU somministrato in infusione endovenosa, LV e oxaliplatino (FOLFOX) o irinotecan (FOLFIRI), o una combinazione di 5-FU, LV, oxaliplatino e irinotecan nell'impostazione neoadiuvante. I tassi di risposta di tutti i tre regimi vanno dal 30% al 60% nel trattamento di prima linea [91].

Un recente studio ha evidenziato l'uso di cetuximab in combinazione con oxaliplatino e irinotecan, che potrebbe aumentare i tassi di risposta quasi fino al 70% e in modo sicuro può aumentare il tasso di resecabilità di un altro 7-8% nei pazienti con metastasi epatiche da CRC [113].

3.3. Cellule tumorali circolanti

3.3.1. Biologia delle cellule tumorali circolanti

Nonostante i progressi degli ultimi anni fatti in ambito terapeutico, molti pazienti muoiono di metastasi derivanti dal tumore primitivo, nonostante l'assenza di malattia clinicamente rilevabile in seguito al trattamento. In questi pazienti la malattia si sviluppa a partire da microscopici residui del tumore noti come malattia minima residua (MRD). MRD può coinvolgere diversi compartimenti del corpo inclusi il midollo spinale, i linfonodi ed il sangue periferico [76, 114-115]. La ricerca della MRD nel sangue periferico è condotta di routine per il trattamento delle neoplasie ematologiche, dato che il flusso sanguigno è l'ambiente fisiologico per questo tipo di tumori. Di contro il significato biologico delle cellule tumorali circolanti (CTC) nei tumori solidi è ancora dibattuto. L'idea di investigare il processo metastatico nel sangue periferico origina nel diciannovesimo secolo quando T.R. Ashworth descrisse per primo il fenomeno delle CTC e S. Paget ipotizzò una distribuzione non casuale delle metastasi originatesi dal tumore (la teoria del "seed and soil") [115-116]. In seguito fu confermata la natura maligna delle CTC dimostrando che queste possedevano aberrazioni cromosomiche tumore specifiche [117-118] ed, ex vivo, avevano la capacità di crescere come linee cellulari con fenotipo maligno. Attraverso sistemi modello è stato stimato che per ogni grammo di tumore possono essere immesse ogni giorno nel sangue periferico fino a 1×10^6 cellule tumorali [119]. Nei pazienti con neoplasia le CTC possono raggiungere il flusso sanguigno da depositi persistenti di tumore dormiente e qui possono rimanere fino a 22 anni [120]. Tuttavia una percentuale significativa delle CTC è apoptotica e quindi incapace di colonizzare organi secondari distanti [121]. Inoltre, come anche affermato dalla teoria del "seed and soil", i tumori contengono sottopopolazioni cellulari geneticamente diverse, con diverso potenziale metastatico a seconda dell'espressione di una serie di fattori specifici (*figura 6*).

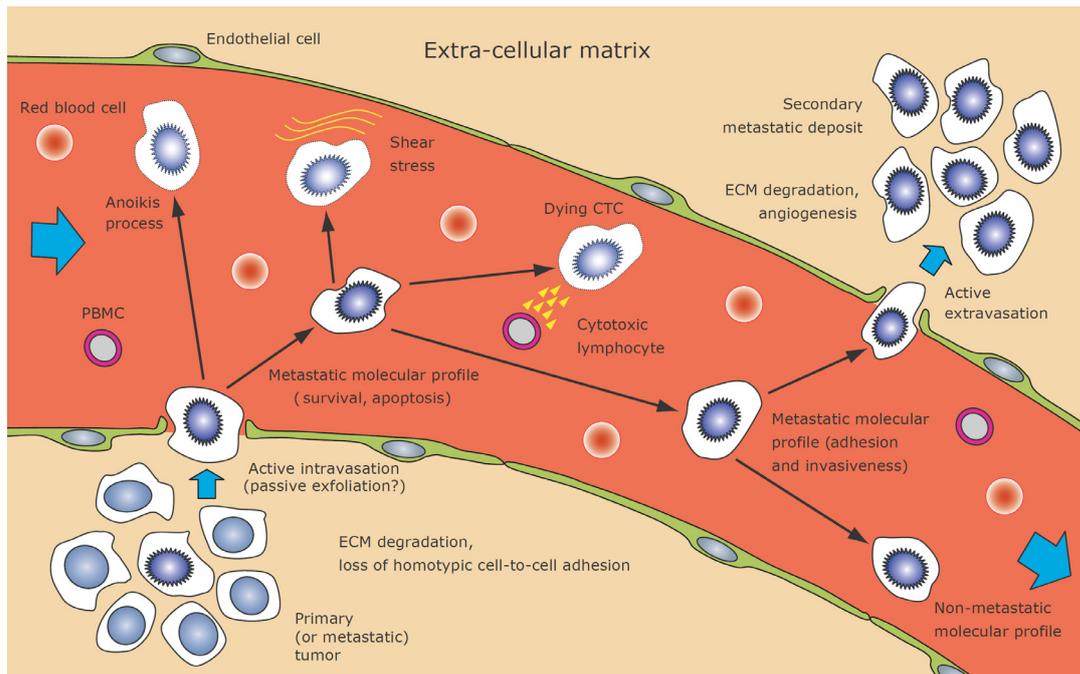


Figura 6: in accordo con la teoria del “seed and soil” il processo metastatico è in larga parte inefficiente, ed il destino delle cellule circolanti può variare a seconda del loro profilo molecolare. Per generare un deposito metastatico le CTC devono: (i) esprimere determinati fattori di sopravvivenza o anti apoptosi [ad esempio Survivin, telomerase, epidermal growth factor receptor (EGFR) e Bcl-2], adesione o homing factors [ad esempio integrins, focal-adhesion-kinases (FAK), cadherins e lamins], fattori di invasività [ad esempio matrix metalloproteinases (MMP) ed urokinase plasminogen activator (uPA)] e fattori angiogenetici [ad esempio vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), inducible nitric oxide synthase (iNOS) e hypoxia inducible factor (HIF)]; (ii) evitare l’anoikis [morte cellulare ancoraggio dipendente che si manifesta quando le cellule perdono il contatto con la matrice extracellulare a cui erano adese]; (iii) resistere alle shear forces; (iv) sfuggire alla sorveglianza immunitaria. Queste considerazioni hanno un’implicazione importante negli studi sul valore prognostico dell’analisi delle CTC. PBMC: peripheral-blood mononucleated cell; ECM: matrice extra-cellulare.

Questi requisiti spiegano perché la presenza delle CTC è necessaria ma non sufficiente affinché si verifichi il processo metastatico. Questo fenomeno, chiamato “inefficienza metastatica”, è stato ampiamente dimostrato in modelli preclinici [122] e rappresenta il maggior problema quando le CTC sono utilizzate come marker di MRD nelle neoplasie solide.

Fino ad ora la biologia delle CTC era stata trascurata perché la ricerca si è concentrata sulle caratteristiche del microambiente del tumore primitivo e delle metastasi già stabilite. Negli ultimi anni però si è visto come la presenza delle CTC nel sangue periferico dei pazienti con tumori solidi correli con la loro risposta clinica; dato che i risultati dei vari studi sono spesso contrastanti tra loro,

saranno necessarie ulteriori ricerche per implementare l'analisi delle CTC nello scenario clinico di routine.

3.3.2. Rilevamento delle CTC

Sono stati descritti diversi approcci per il rilevamento delle CTC, che si suddividono in due categorie. Alla prima appartengono i metodi basati su PCR, alla seconda quelli basati su citofluorimetria. A causa della mancanza di analisi comparative, non è disponibile nessuna tecnica ideale e devono essere ben valutate diverse problematiche nella ricerca delle cellule tumorali circolanti.

3.3.2.1. Metodi basati su PCR

I metodi basati su PCR sono i più impiegati per il rilevamento delle CTC. La specificità è ottenuta attraverso il disegno di primers oligonucleotidici sequenza-specifici per i geni di interesse. Attraverso queste metodiche l'espressione dei geni tumore- o tessuto-specifici e la presenza di anomalie genetiche possono essere rilevate in un campione clinico con la più elevata sensibilità (una cellula maligna ogni 10^6 - 10^7 cellule normali, che corrisponde all'incirca a una cellula tumorale in 1-10 ml di sangue periferico) rispetto ad altre tecniche – almeno quando non si utilizzano metodi di arricchimento – come la microscopia in campo chiaro (una cellula tumorale ogni 10^2 - 10^3 cellule normali) e l'immunocitochimica (ICC) (una cellula tumorale ogni 10^4 - 10^5 cellule normali) [123]. I metodi basati su PCR offrono anche un elevato livello di efficienza: il DNA genomico o l'RNA totale da un campione clinico possono essere estratti e testati in una singola reazione. La PCR standard (una coppia di primers) e la nested PCR (due coppie di primers: una coppia amplifica una sequenza nucleotidica che è interna all'amplicone ottenuto dall'altra coppia) sono metodi qualitativi, ma si possono ottenere risultati semi-quantitativi attraverso l'utilizzo della PCR competitiva e della tecnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) o la rilevazione mediante Southern-blot dei prodotti di PCR. Paradossalmente il maggior limite della PCR è proprio la sua sensibilità, che può rivelare l'espressione di trascritti illegittimi nei leucociti del sangue periferico

[124] o la presenza di mRNA nelle cellule normali che circolano a bassa frequenza (ad esempio le cellule epiteliali) o che contaminano il campione di sangue in seguito al prelievo venoso (come ad esempio melanociti, cheratinociti, fibroblasti e cellule endoteliali). Con l'avvento delle tecniche di PCR quantitativa in tempo reale (qRT-PCR) [125] è possibile una precisa quantificazione di una sequenza target. Tali tecniche non solo forniscono al ricercatore vantaggi di tipo tecnico (*figura 7*), ma anche di tipo applicativo, come la possibilità di definire valori di soglia che indichino i livelli di espressione dell'mRNA di importanza clinica nei soggetti sani raffrontati con i pazienti malati di tumore e la possibilità di correlare la quantificazione della sequenza target con la risposta clinica [126] o la risposta alla terapia [127].

3.3.2.1.1. DNA come bersaglio della PCR

Al fine di rilevare le CTC, i target della PCR devono esprimere in modo consistente sequenze di DNA tumore specifica. Il vantaggio più importante nell'utilizzo del DNA come bersaglio di PCR è la sua stabilità e l'indipendenza di eventuali anomalie dall'attività trascrizionale delle cellule tumorali. Tuttavia gli svantaggi sono rappresentati dalla perdita di sensibilità (una cellula di solito contiene solamente una singola copia del gene bersaglio) e l'incapacità dell'analisi di distinguere tra il DNA derivante dalle CTC vitali in circolo e il DNA libero rilasciato dalle cellule tumorali morenti. Inoltre, a differenza delle neoplasie ematologiche, nei tumori solidi solamente poche traslocazioni cromosomiche o mutazioni geniche hanno sufficiente specificità e frequenza per poter essere impiegate per la rilevazione delle CTC.

3.3.2.1.2. mRNA come bersaglio di PCR

Il metodo utilizzato più di frequente per la rilevazione delle CTC è la reverse transcription qRT-PCR (RT-qRT-PCR). In seguito alla sintesi del cDNA il gene d'interesse è amplificato attraverso l'utilizzo di primers specifici. Per evitare l'amplificazione del DNA genomico, che potrebbe contaminare la preparazione del cDNA, questi primers sono disegnati in modo tale che o uno di essi sia

complementare ad una sequenza interrotta nel DNA genomico da un introne (introne che è rimosso durante lo splicing dell'RNA e quindi non interrompe la sequenza nella versione a cDNA del gene) oppure sono disegnati in modo tale da fiancheggiare l'introne nella sequenza genomica (rendendo quindi facile l'identificazione dei prodotti di PCR derivanti dal DNA genomico e dal cDNA sulla base delle dimensioni dell'amplicone). L'mRNA scelto come bersaglio di solito codifica per antigeni di differenziazione espressi solamente dalle cellule tumorali e dai tessuti da cui derivano [ad esempio il prostate-specific antigen (PSA) nel carcinoma della prostata e la tyrosinase nel melanoma cutaneo]. Altri geni sono espressi ad alti livelli nelle cellule tumorali e molto poco da quelle sane dello stesso tessuto [ad esempio carcinoembryonic antigen (CEA)]. Infine, geni di fusione tumore specifici e geni mutati sono trascritti in modo consistente da alcuni tumori solidi e sono quindi stati utilizzati come markers delle CTC [128-129]. Comparato con i metodi basati sul DNA, l'approccio basato sull'RNA ha il vantaggio di rilevare le CTC vitali (dato che l'RNA rilasciato dalle cellule morenti viene rapidamente degradato dalle RNasi ubiquitarie), assieme a quelle nei primi stadi apoptotici [121], e l'mRNA libero presente nel plasma dei pazienti che codifica per antigeni correlati alla neoplasia [130]. Un inconveniente di questo metodo è che il numero di copie di mRNA di un gene per un dato tumore potrebbe variare durante il ciclo vitale della cellula o come risultato della de-differenziazione. Questo fenomeno può rendere di difficile interpretazione i risultati dell'analisi, ossia relazionare la variazione nel numero delle CTC con i livelli di espressione dell'mRNA. Una possibilità per aggirare il problema è l'utilizzo di un pannello di markers multipli, con diversi mRNA bersaglio indipendenti tra loro e provenienti da differenti famiglie geniche [126].

3.3.2.2. Metodi citometrici

Gli approcci citometrici, che isolano e caratterizzano le singole cellule, furono i primi ad essere impiegati per l'analisi delle CTC nel sangue periferico e correntemente rappresentano l'approccio standard per l'identificazione dell'MRD nel midollo spinale. Il vantaggio è che permettono sia l'identificazione morfologica del fenotipo maligno (cosa impossibile da fare con i metodi basati su

PCR poiché le cellule sono lisate per estrarne gli acidi nucleici) e anche la successiva caratterizzazione molecolare a livello di singola cellula. Tuttavia le tecniche di microscopia classica in campo chiaro e la ICC hanno una sensibilità limitata a causa della bassa frequenza delle CTC nel sangue periferico. L'implementazione però di tecnologie avanzate (ad esempio metodi di imaging cellulare automatici e metodi di arricchimento cellulare) sta rinnovando l'interesse in questo tipo di metodiche [131]. La microscopia digitale [ad esempio piattaforme di ICC automatica e citometria a scansione laser basata su fluorescenza (LSC)] permettono lo screening automatico di campioni di sangue sulla base delle caratteristiche nucleari (positività alla colorazione degli acidi nucleici) e delle caratteristiche di superficie cellulare (positività per gli antigeni delle cellule epiteliali e/o negatività per gli antigeni leucocitari); l'operatore ha quindi solamente il compito di confermare l'identità delle cellule selezionate. La citometria a flusso attivata dalla fluorescenza (FACS) è una tecnologia nota di uso già consolidato in ambito ematologico. In aggiunta alla caratterizzazione antigenica e morfologica delle cellule presenti in un dato campione, il FACS permette anche la separazione (sorting) delle cellule di interesse, che possono mantenere la loro vitalità e quindi essere espanse in vitro per successivi studi funzionali (*figura 7*).

3.3.2.3. Metodi di arricchimento cellulare

Nonostante la lisi dei globuli rossi e la separazione mediante gradiente di densità possono essere considerati metodi di arricchimento cellulare, queste procedure non eliminano i leucociti, che rimangono in sovrannumero rispetto alle CTC. Sono quindi disponibili membrane filtranti con pori in dimensione tale da lasciare passare i linfociti ma non le cellule tumorali circolanti, di dimensioni molto maggiori. Molti ricercatori però preferiscono il metodo di arricchimento cellulare immunomagnetico (IMCE), costituito da un sistema a microbiglie magnetiche con il relativo sistema di cattura specifico. Il sistema a microbiglie magnetiche impiega anticorpi (diretti contro marcatori di superficie tumore- o tessuto-specifici) coniugati a piccole microbiglie paramagnetiche che abilitano la selezione delle cellule bersaglio utilizzando un potente magnete. Le microbiglie

disponibili commercialmente sono collegate ad anticorpi specifici sia per una selezione positiva delle CTC (ad esempio anticorpi monoclonali anti-citocheratine per le CTC di origine epiteliale) oppure per una selezione negativa mediante anticorpi anti-CD45 che legano i leucociti e ne permettono l'eliminazione. I sistemi ferro-fluidici utilizzano anticorpi anti EpCAM (epithelial-cell adhesion molecule) coniugati a colloidali da 1 μm , seguiti da separazione magnetica. Dato che molti tumori sono di origine epiteliale, l'uso di anticorpi diretti contro antigeni di superficie (ad esempio citocheratine) espressi dalle cellule epiteliali (sia normali che maligne) sono diventati la via più comune per separare le CTC dai campioni di sangue periferico prima dell'analisi citometrica [132]. Tuttavia la mancanza di marcatori di superficie ampiamente espressi nei tumori solidi di origine non epiteliale (ad esempio melanomi e sarcomi) non permettono l'applicazione di tale metodo a tutti i tipi di tumore. Una limitazione di tali sistemi rimane la potenziale perdita di CTC proprio durante il passaggio di arricchimento; resta da chiarire se tale perdita cellulare abbia o meno un impatto negativo nel rilevare livelli di CTC informativi per la prognosi.

3.3.3. *Considerazioni su CTC e risultati clinici*

Il ruolo prognostico delle CTC nei pazienti con quasi tutti i tipi di tumori solidi è stato investigato da diversi studi. Dato che la frequenza di falsi positivi nei controlli (soggetti sani o pazienti con patologie non neoplastiche) è molto bassa, si può dire che la specificità dei metodi di analisi (sia basati su PCR che citometrico) si avvicina al 100% [133-134]. Data anche però la presenza in letteratura di molti lavori discordanti tra loro, non sono ancora disponibili conclusioni definitive sul significato biologico delle CTC nei tumori solidi. L'interpretazione dei risultati clinici è particolarmente problematica poiché i dati di letteratura hanno un elevato grado di variabilità in termini di:

- ✓ tipo di tumore; stadio della malattia; timing (prima, durante o dopo il trattamento; con o senza evidenza di malattia) e numero dei prelievi di sangue;
- ✓ metodo di analisi delle CTC (basato su PCR oppure citometrico); caratteristiche di tipo tecnico (utilizzo o meno di metodi di arricchimento)

e, se usati, tipo di metodo impiegato; diverse coppie di primers per lo stesso marker; differenti tecniche di PCR o citometria); tipo e numero di markers analizzati;

- ✓ endpoint clinico (correlazione con lo stadio della malattia o con la sopravvivenza); tipo di analisi statistica (analisi di sopravvivenza univariata o multivariata).

È quindi necessaria una standardizzazione dei protocolli al fine di permettere ampi trials multicentrici.

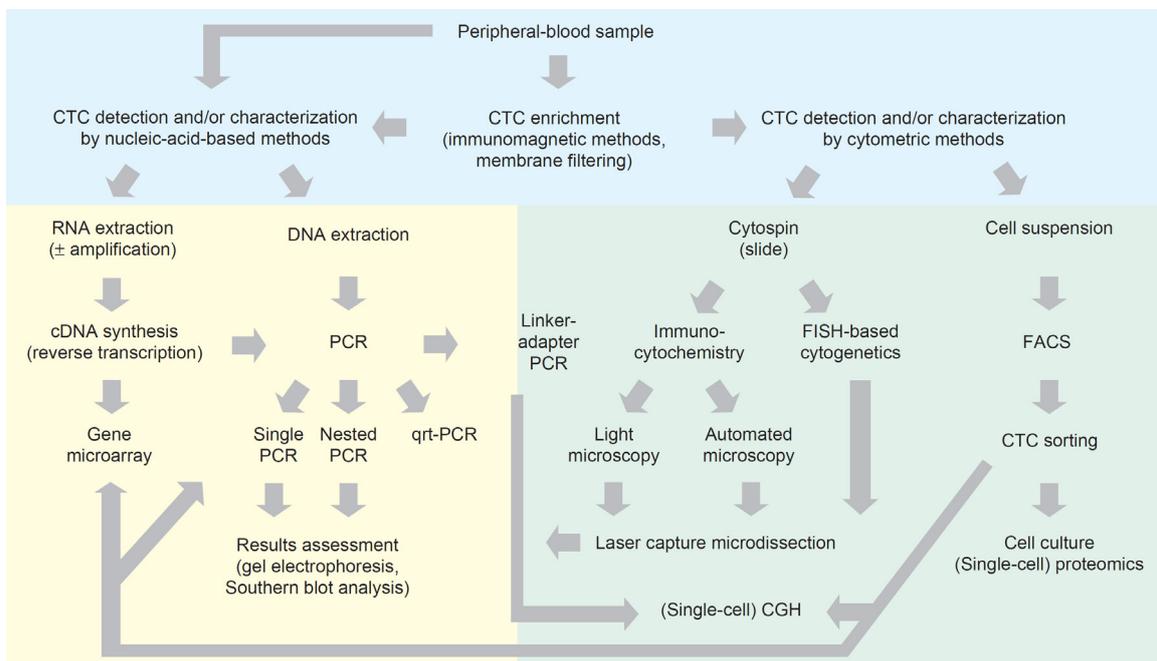


Figura 7: le cellule tumorali circolanti possono essere rilevate nel sangue periferico attraverso due tipi di tecniche: quelle basate sull'estrazione degli acidi nucleici (pannello a sinistra, in giallo) e quelle basate sui metodi citometrici (pannello a destra, in verde). La loro caratterizzazione molecolare può essere effettuata utilizzando biotecnologie innovative di recente implementazione. Dopo l'estrazione dell'RNA o del DNA, gli acidi nucleici possono essere utilizzati per le tecniche di analisi basate su PCR. A differenza della PCR tradizionale, la qrtPCR permette la quantificazione dell'espressione del target, non richiede ulteriori valutazioni dei risultati (ad esempio mediante Southern blot), e garantisce il controllo della qualità dell'mRNA per ogni campione. In alternativa l'mRNA può essere amplificato in modo lineare per poter essere impiegato nel profilo dell'espressione genica mediante microarray, mentre il DNA può essere amplificato esponenzialmente (amplificazione del DNA genomico, utilizzato in particolare quando ci si occupa di campioni con poche cellule o cellule singole) utilizzando la linker-adaptor PCR per studi di comparative genomic hybridization (CGH). Gli studi citometrici permettono l'identificazione morfologica delle CTC, ma per essere condotti richiedono passaggi di arricchimento cellulare. Le CTC depositate su un vetrino mediante cytopspin possono essere usate per studi di ICC o fluorescence in situ hybridization (FISH) e quindi essere selezionate attraverso la tecnica della laser-capture microdissection ed utilizzate per la CGH. Infine, a partire dalla sospensione cellulare, può essere impiegata la tecnica FACS per selezionare e separare le cellule quando queste sono ancora vitali, permettendone così la coltura in vitro.

3.4. PCR quantitativa

3.4.1. Principi di funzionamento

La Polimerase Chain Reaction (PCR) è una tecnica di biologia molecolare che permette l'amplificazione del DNA in vitro. È applicabile anche per lo studio del RNA previa retro trascrizione dello stesso in DNA complementare (cDNA) grazie alla trascrittasi inversa, enzima scoperto da David Baltimore, Renato Dulbecco e Howard Martin Temin [135]. Il limite della PCR tradizionale sta nel fatto che, indipendentemente dall'ammontare iniziale di molecole di DNA, si ottiene la stessa quantità di prodotto finale: il risultato consiste in una risposta positiva o negativa ma risulta impossibile determinare la quantità iniziale. Questo limite fu superato grazie allo sviluppo della quantitative real time PCR (qRT-PCR) da parte di Higuchi e collaboratori nel 1993 [136]. La caratteristica chiave della qRT-PCR sta nel fatto che il DNA amplificato viene quantificato dopo ogni ciclo di reazione. Esistono due metodi comunemente impiegati per la quantificazione. Il più economico ma meno preciso utilizza coloranti fluorescenti, come "SYBR Green", che si intercalano con il DNA a doppio filamento: il problema è che si legano anche a prodotti non specifici che possono essere presenti interferendo così nella quantificazione. L'altro sistema utilizza sonde (probes) oligonucleotidiche specifiche: è il più accurato e affidabile fra tutti i sistemi, ma anche il più costoso. Nel sistema utilizzato per il presente progetto di tesi la probe ha un "reporter", ossia una molecola fluorescente, legato a un'estremità ed un "quencher", ossia una molecola che assorbe la luce emessa dal reporter, legato all'altra estremità. Durante la fase di annealing si legano al DNA target sia i primers che la probe; la vicinanza del quencher al reporter fa sì che non venga rilevata la fluorescenza. Durante la fase di prolungamento la *Thermophilus aquaticus* (Taq)-polimerasi giunge fino alla probe ed essendo dotata di attività esonucleasica stacca e frammenta la sonda; in tal modo il reporter si libera dal quencher e l'emissione di fluorescenza può essere rilevata (*figura 8*).

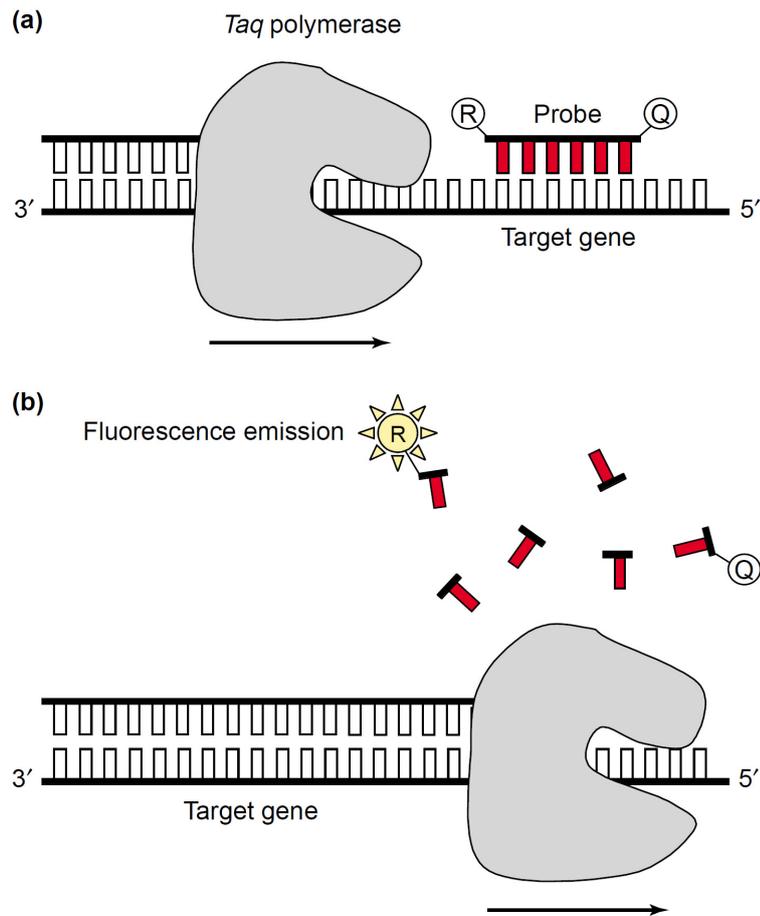


Figura 8: principio di funzionamento della qPCR mediante probes fluorogeniche. (a) La probe si lega alla sequenza complementare sul gene target; (b) Durante la sintesi del nuovo filamento la probe è degradata dall'attività esonucleasica 5'-3' della *Taq*-polimerasi, che permette al reporter (R) di liberare il segnale di fluorescenza prima assorbito dal quencher (Q).

Ad ogni ciclo il rivelatore misura un aumento di fluorescenza proporzionale alla distruzione delle sonde oligonucleotidiche. Ponendo in ascissa il numero di cicli effettuati ed in ordinata l'intensità della fluorescenza espressa in scala logaritmica (in tal modo una amplificazione esponenziale viene rappresentata da una linea retta) misurata dal rivelatore ad ogni ciclo, si ottengono le curve di amplificazione (figura 9).

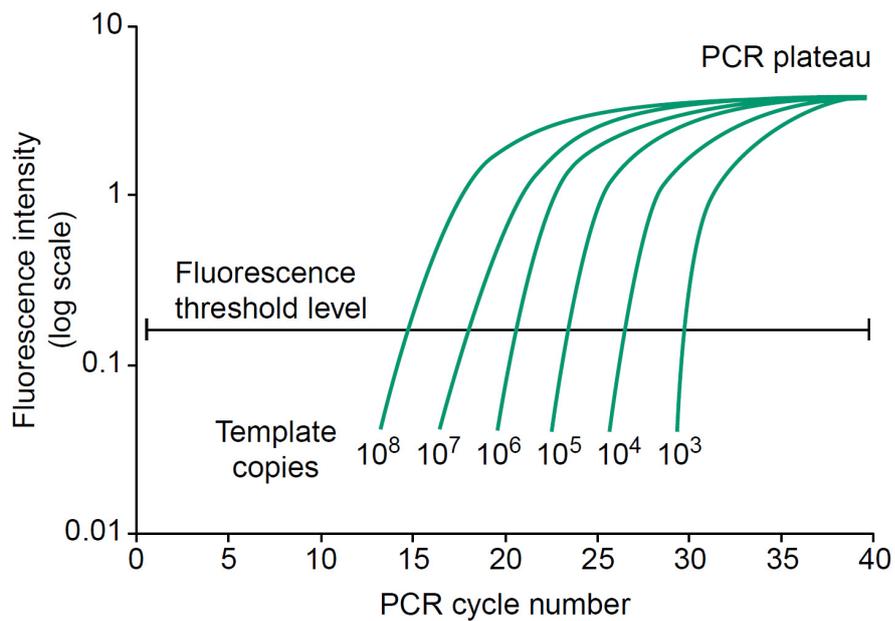


Figura 9: curve di amplificazione ottenute con qrtPCR. La curva rappresenta il segnale di fluorescenza verso il numero dei cicli della PCR. Il segnale misurato durante questi cicli è utilizzato per determinare la soglia (threshold), calcolata come dieci volte la deviazione standard della media del segnale di fluorescenza di base. Un segnale di fluorescenza rilevato sopra tale soglia è considerato un segnale vero e si può utilizzare per il calcolo del Cycle Threshold (C_T) di ogni campione (definito come il numero frazionario del ciclo di PCR in cui il segnale di fluorescenza è maggiore di quello minimo rilevabile).

Le curve presentano tre fasi:

- ✓ Fase di amplificazione esponenziale: ad ogni ciclo, assumendo un'efficienza della reazione del 100%, il prodotto viene duplicato;
- ✓ Fase di livellamento: la reazione rallenta per una riduzione nell'attività della *Taq*-polimerasi, per consumo dei reagenti e dei primers;
- ✓ Plateau, che viene raggiunto per esaurimento di enzima e reagenti.

Viene stabilita una soglia per il rilievo della fluorescenza che è pari a dieci volte la deviazione standard dell'emissione di fluorescenza basale. Il ciclo a cui il campione raggiunge la soglia di fluorescenza viene chiamato ciclo soglia (Cycle Threshold o C_T). Dal momento che in fase esponenziale la quantità di DNA raddoppia ad ogni ciclo, si può determinare la quantità iniziale di DNA dei campioni in base al ciclo soglia. La RT-qrtPCR (Reverse Transcription-quantitative real time PCR) è una tecnica che abbina la trascrizione inversa alla PCR quantitativa e in tal modo permette di studiare l'espressione genica in

maniera quantitativa. Infatti, la quantificazione dell'acido nucleico nel campione di analisi viene effettuata attraverso due tecniche principali, ossia il metodo assoluto ed il metodo relativo. Per una quantificazione assoluta è necessario relazionare il segnale ottenuto ad una curva standard prodotta dall'amplificazione di diverse diluizioni di una quantità nota di acido nucleico. Questo sistema permette di determinare il numero di copie iniziali del trascritto di interesse. Tuttavia il metodo è valido solamente nel caso in cui il target nativo e la curva di calibrazione hanno le stesse efficienze di amplificazione, sia nella reazione di retro trascrizione, sia nella cinetica di PCR [137]. Quindi il modello della curva esterna deve essere attentamente validato, dato che l'accuratezza della quantificazione assoluta dipende interamente dall'accuratezza degli standards. Quando si desidera misurare l'espressione genica, è necessario considerare che una stessa quantità di RNA misurata potrebbe essere stata prodotta dalla variazione dell'espressione genica, ma anche più semplicemente da un numero variabile di cellule. Data la variabilità nella trascrizione, non è sufficiente misurare la quantità di mRNA, ma è necessario normalizzare l'espressione del gene di interesse in base all'espressione di un gene housekeeping misurato nello stesso campione [138-139]. I geni housekeeping sono geni espressi costitutivamente, coinvolti nelle funzioni di base e necessari per la sopravvivenza della cellula; il loro livello di espressione si considera costante a seconda delle condizioni sperimentali. Il metodo di quantificazione relativa descrive il cambiamento della quantità di un gene target nei campioni di analisi in relazione a un campione di riferimento (calibratore). Dopo che l'espressione del gene target è stata normalizzata in base all'espressione del gene housekeeping, i dati ottenuti vengono rapportati al calibratore, che può essere rappresentato da un donatore sano (o un pool di donatori), uno dei campioni utilizzati nell'analisi, o qualsiasi campione di controllo; infatti ciò che interessa è il rapporto fra i campioni in analisi.

3.4.2. Quantificazione relativa: il metodo del $\Delta\Delta C_T$.

Il calcolo per la quantificazione relativa nella RT-qrtPCR si basa sul metodo del $\Delta\Delta C_T$. L'equazione generale che descrive il processo di amplificazione esponenziale del prodotto di PCR è la seguente:

$$X_n = X_0 \times (1 + E_X)^n$$

Dove X_n è il numero di molecole del gene target al ciclo n della reazione, X_0 è il numero iniziale di molecole del target, E_X è l'efficienza di amplificazione del target ed n è il numero di cicli. Dato che il ciclo soglia C_T indica il numero del ciclo il cui la quantità di amplificato del target raggiunge la soglia prefissata si ha che:

$$X_T = X_0 \times (1 + E_X)^{C_{T,X}} = K_X$$

Dove X_T è il numero delle molecole del target al raggiungimento della soglia, $C_{T,X}$ è il numero del ciclo soglia per il target e K_X è una costante. Un'equazione simile si può ottenere per il gene housekeeping:

$$H_T = H_0 \times (1 + E_H)^{C_{T,H}} = K_H$$

Dove H_T è il numero delle molecole dell'housekeeping al raggiungimento della soglia, H_0 è il numero di molecole iniziali di housekeeping, E_H è l'efficienza di amplificazione dell'housekeeping, $C_{T,H}$ è il numero del ciclo soglia per l'housekeeping e K_H è una costante. Se divido le due costanti X_T su H_T ottengo l'espressione:

$$\frac{X_T}{H_T} = \frac{X_0 \times (1 + E_X)^{C_{T,X}}}{H_0 \times (1 + E_H)^{C_{T,H}}} = \frac{K_X}{K_H} = K$$

La ditta Applied Biosystems, di cui sono state impiegate nello studio le probes TaqMan®, dichiara che gli esatti valori di X_T ed H_T dipendono da una serie di fattori [140] e quindi la costante K non deve essere uguale a uno. Se assumiamo che il gene target e l'housekeeping abbiano le stesse efficienze di amplificazione, si ha che:

$$E_X = E_R = E$$

quindi:

$$\frac{X_0}{H_0} \times (1 + E)^{C_{T,X} - C_{T,H}} = K$$

oppure:

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta C_T} = K$$

dove X_N rappresenta la quantità normalizzata del gene target rispetto all'housekeeping (X_0/H_0) e ΔC_T è uguale alla differenza tra i cicli soglia del target e dell'housekeeping ($C_{T,X} - C_{T,H}$). Riarrangiando l'espressione si ottiene:

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta C_T}$$

il passaggio finale è quello di dividere il rapporto X_N di ogni campione q per l' X_N del calibratore (cb):

$$\frac{X_{N,q}}{X_{N,cb}} = \frac{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,q}}}{K \times (1 + E)^{-\Delta C_{T,cb}}} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T}$$

dove $-\Delta \Delta C_T = -(\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb})$. Visto che l'efficienza di amplificazione E viene considerata convenzionalmente vicina ad uno, la quantità del target normalizzata per un gene housekeeping e relativa ad un calibratore è data da:

$$\text{quantità del target} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

il valore del $\Delta \Delta C_T$ per il calibratore corrisponde sempre a zero e quindi 2^0 è uguale ad uno. L'espressione di mRNA nei campioni si relaziona sempre all'unità.

3.5. Significato dei marcatori studiati

L'analisi delle cellule tumorali circolanti nel progetto di tesi è stata effettuata determinando il profilo di espressione genica del sangue periferico dei pazienti. Per fare ciò, per ogni campione è stato utilizzato un pannello di markers multipli, indipendenti tra loro e provenienti da differenti famiglie geniche (*tabella 7*).

Nome del gene	Simbolo del gene	Caratteristiche del marcatore
carcinoembryonic antigen	CEA	adesione cellulare
keratin 19	CK19	presenza di cellule epiteliali
keratin 20	CK20	presenza di cellule epiteliali
vascular endothelial growth factor	VEGF	invasività
epidermal growth factor receptor	EGFR	invasività
Survivin	Survivin	aggressività biologica
prominin-1	CD133	cellule staminali circolanti

Tabella 7: caratteristiche dei markers inclusi negli studi.

In particolare nell'analisi delle CTC nei pazienti con cancro gastrico sono stati impiegati CEA, CK19, Survivin e VEGF; nei pazienti con metastasi epatiche da CRC si sono utilizzati CEA, CK19, CK20, VEGF, EGFR, Survivin e CD133. Segue una breve descrizione del significato biologico di ogni marcatore.

3.5.1. CarcinoEmbryonic Antigen

Il CarcinoEmbryonic Antigen (CEA) è una glicoproteina composta per il 50% circa da carboidrati con un peso molecolare di 180-200 kDa [141-143] appartenente alla famiglia CEA che include 29 tra geni e pseudogeni [144-145]. Tale superfamiglia si può suddividere in tre sottogruppi [il sottogruppo CEA con sette geni, il sottogruppo pregnancy-specific-glycoprotein (PSG) formato da undici geni e l'ultimo sottogruppo formato da sei pseudo geni], ed il sottogruppo CEA codifica per proteine coinvolte nell'adesione cellulare. CEA è un antigene tumorale espresso estensivamente in più del 95% dei carcinomi colo rettali, gastrici e pancreatici, come pure in circa il 70% dei carcinomi polmonari a grandi cellule e nel 50% dei tumori al seno. È presente anche nei carcinomi ovarici mucinosi, e nell'adenocarcinoma del pene [146]. CEA è anche presente, in minore quantità, nel tessuto colico normale dell'adulto e nei tessuti fetali [147-150].

L'analisi della sequenza amminoacidica della famiglia CEA rivela che appartiene alla super-famiglia delle immunoglobuline [151]. È stato trovato che CEA gioca un ruolo come molecola di adesione con un'importante funzione nella trasduzione del segnale nelle cellule tumorali. Diversi membri della famiglia CEA, tra cui CEA stesso, possiedono proprietà di adesione cellulare [152] e la loro presenza nella membrana citoplasmatica delle cellule tumorali è stata considerata responsabile dell'aumento della disseminazione cellulare del tumore [153]. Alcuni autori sostengono che la presenza di molecole di CEA in cellule normali potrebbe giocare un ruolo nella difesa immunitaria innata, proteggendo la mucosa colica dall'invasione microbica [154].

3.5.2. *Cytocheratin 19*

Cytokeratin 19 (CK19) è un componente polipeptidico dei filamenti intermedi del citoscheletro di cellule normali e neoplastiche, presente in una grande varietà di tessuti epiteliali. Le citocheratine possono essere distinte sulla base delle loro caratteristiche biochimiche in due gruppi: citocheratine acide (gruppo I) e citocheratine basiche (gruppo II). CK19 fa parte del gruppo I. A differenza delle altre citocheratine che si organizzano in coppia (citocheratina acida e citocheratina basica) la CK19 si riscontra in forma singola. La caratteristica distribuzione delle differenti citocheratine nei diversi di tessuti consente la distinzione delle cellule epiteliali, ma l'assetto tipico si modifica quando subentra la trasformazione neoplastica.

L'analisi biochimica del citoscheletro dei carcinomi umani mostra che i tumori derivati da differenti epiteli presentano una diversa composizione in citocheratine, la stessa nel tumore primitivo e nelle metastasi. I processi di proliferazione e necrosi delle neoplasie maligne liberano frammenti di citoscheletro negli spazi extracellulari, cosicché tali componenti diventano misurabili nel sangue ed in altri liquidi biologici in caso di tumori gastrointestinali, polmonari, tiroidei, epatici, pancreatici, mammari e uterini [155]. CK19 è un marker caratteristico per lo studio delle cellule tumorali circolanti per neoplasie di origine epiteliale. Di recente è stato dimostrato che CK19 è un

marker migliore rispetto a CK18, CK20 e CEA per predire la prognosi o attuare strategie post operatorie in pazienti con carcinoma gastrico [156].

3.5.3. Cytocheratin 20

La proteina codificata dal gene Cytocheratin 20 (CK20) appartiene alla famiglia delle citocheratine. È un filamento intermedio e la sua espressione è quasi esclusivamente limitata alle cellule degli epitelii intestinale [157] e gastrico [158], ed alle cellule uroteliali e di Merkel [159]. La positività a questo marcatore è stata osservata nella maggior parte degli adenocarcinomi del colon, nei tumori ovarici mucinosi, nei carcinomi delle cellule di transizione e delle cellule di Merkel, nonché negli adenocarcinomi dello stomaco. Nel carcinoma coloretale è espressa in più del 90% dei casi indipendentemente dal grado di differenziazione e può essere rilevata anche nelle metastasi [155]. L'espressione della citocheratina 20 è stata rilevata in più tumori coloretali e nelle loro metastasi e la sua rilevazione tramite RT-PCR è stata utilizzata per rilevare metastasi occulte nei pazienti con cancro coloretale [160].

3.5.4. Vascular Endothelial Growth Factor

Il vascular endothelial growth factor (VEGF) è una glicoproteina omodimerica diffusibile prodotta da cellule endoteliali e periciti, ma anche da cellule neoplastiche. È un promotore di angiogenesi in condizioni fisiologiche e patologiche favorendo così la progressione neoplastica [161]. La variante VEGF-A riveste il ruolo predominante per lo sviluppo del sistema vascolare. La sua espressione è influenzata da diversi fattori, fra cui HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1), EGFR (epidermal growth factor receptor), IGF-1 (insulin-like growth factor-1).

L'attivazione dei recettori VEGF, tramite legame del ligando e autofosforilazione del dominio tirosinchinasico, aumenta la permeabilità, la proliferazione e la chemiotassi nelle cellule endoteliali sane, promuovendo quindi il processo angiogenetico. L'espressione del VEGF è aumentata in numerosi tumori umani, ad opera delle cellule tumorali in sinergia con cellule dell'ospite. Tale aumento, nei pazienti con neoplasia, correla con una più elevata incidenza di

metastasi, un minore indice di apoptosi ed una diminuita sopravvivenza globale [162].

3.5.5. *Epidermal Growth Factor Receptor*

Il gene Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) codifica per una proteina di superficie cellulare di 170 kDa costituita da tre domini principali: un dominio extracellulare con funzione di legame, un ponte idrofobico transmembrana e una sequenza citoplasmatica tirosinchinasica. Il legame al corrispondente Epidermal Growth Factor, causa la dimerizzazione del recettore, l'autofosforilazione della tirosina e la propagazione del segnale di proliferazione cellulare. Infatti EGFR è un membro della famiglia di recettori tirosinchinasici transmembrana ErbB, implicati nel controllo della crescita cellulare, della proliferazione e della differenziazione attraverso il pathway Ras–RAF–MAP kinasi e PI3K–PTEN–Akt. L'attivazione costitutiva dell'EGFR porta a trasformazione maligna, angiogenesi e diffusione metastatica.

La sovra espressione di EGFR è stata riscontrata in diversi tumori solidi: nel cancro del colon, è associata a prognosi sfavorevole [163]. Nel cancro coloretale metastatico, cetuximab e panitumumab, due anticorpi monoclonali che riconoscono il dominio extracellulare del recettore che conduce alla sua inattivazione, sono entrati in pratica clinica per il trattamento della malattia metastatica [164-165]. Di recente però è emerso che il trattamento è valido solo nel sottogruppo di pazienti che non presentano mutazioni a carico i KRAS: la presenza di mutazione è un fattore prognostico fortemente negativo [166].

3.5.6. *Survivin*

Survivin è una proteina originariamente identificata come membro della famiglia delle Inhibitors of Apoptosis Proteins (IAPs); si è poi scoperto come giochi un ruolo critico nella divisione e sopravvivenza cellulare [167-168]. Strutturalmente contiene un singolo dominio baculoviral IAP repeats (BIR), condiviso con altri membri delle IAPs come XIAP, c-IAP1, c-IAP2 e Livin [169]. Tale dominio contribuisce alla sua funzione inibitrice dell'apoptosi cellulare. La proteina contiene anche una regione ad alfa elica responsabile dell'interazione con

i microtubuli e da qui deriva il suo ruolo nella divisione cellulare [167, 170]. Survivin promuove la sopravvivenza cellulare andandosi a legare direttamente con la caspasi-3 e la caspasi-7, impedendone così l'attivazione [171-172]. Inoltre è in grado di interagire con il complesso Smac/DIABLO [173] e permette inoltre una citoprotezione anche attraverso la via caspasi – indipendente mediante l'inibizione del pathway AIF, responsabile della frammentazione del DNA [174].

La proteina è espressa nei tessuti fetali ed embrionali, ma risulta quasi non rilevabile nei tessuti adulti [167, 169]. Tuttavia ne è stata riscontrata la sovra espressione in molti tipi di neoplasie inclusi i tumori dello stomaco ed il cancro coloretale (*tabella 8*).

Tipo di tumore	Espressione	Autori
Esophageal cancer	80%	[175]
Gastric cancer	34.5-68%	[176-177]
Colorectal cancer	63.5%	[178]
Pancreatic cancer	76.9-88%	[179-180]
Hepatocellular cancer	41-87%	[181-182]
Breast cancer	70.7-90.2%	[183-184]
Ovarian cancer	73.5%	[185]
Lung cancer	85.5%	[186]
Bladder cancer	57.8%	[187]
Acute myeloid leukemia	54.8%	[188]
Acute lymphocytic leukemia	68.8%	[188]

Tabella 8: espressione di Survivin dal punto di vista proteico o del trascritto a mRNA nelle neoplasie umane.

L'espressione della proteina in molti tumori è stata associata con la sopravvivenza dei pazienti, alla ricorrenza della malattia ed alla resistenza a chemio e radioterapia. Nel carcinoma gastrico sembra che la sua attivazione sia un passaggio fondamentale nel processo di carcinogenesi [189]. Inoltre l'espressione dell'mRNA nel tumore correla con una prognosi peggiore [190]. Nel tumore coloretale in stadio II una più elevata espressione di Survivin correla con una prognosi più sfavorevole [178].

3.5.7. *CD133 (prominin-1)*

Prominin-1 o CD133 è stato il primo membro identificato della famiglia prominin, una serie di glicoproteine di membrana. La funzione specifica ed i ligandi delle prominin non sono ancora completamente delucidati, ma si distinguono per la loro espressione ristretta all'interno delle protusioni della membrana plasmatica, come ad esempio nei microvilli epiteliali. Nel 1997 si scoprì che CD133 era un marcatore di cellule progenitrici ematopoietiche [191]. La sua espressione è stata dimostrata in diverse linee cellulari e tessuti adulti [192-193], nelle cellule staminali del sistema nervoso centrale, nei precursori endoteliali circolanti e nelle multipotent adult progenitor cells (MAPs) [191, 194]. CD133 è un marcatore di cellule staminali tumorali (CSCs) [195], come riassunto in *tabella 9*.

Fenotipo antigenico	Origine del tumore	Autori
CD133, CD44, $\alpha1\beta2$	Human prostate tumours	[196]
CD133, ABCG2	Human pancreatic adenocarcinoma	[197]
CD133	Human colon carcinoma	[198-199]
CD133	Human hepatocellular carcinoma	[200-201]
CD133, nestin	Human neural tumours	[202-205]
CD133	Human renal tumours	[206]

Tabella 9: le cellule che esprimono CD133, spesso in combinazione con altri marcatori, rappresentano la popolazione di cellule staminali tumorali in diverse neoplasie umane.

Tale proteina ha consentito il riconoscimento, in due studi analoghi recenti condotti sul cancro del colon, di una popolazione di CSCs che sarebbero responsabili della crescita tumorale e della diffusione metastatica. Il CD133 risultava presente in tutte le cellule cancerose, ma nel sottogruppo che dimostrava di poter crescere senza limiti era particolarmente abbondante.

Tale sottogruppo è caratterizzato da basso tasso di replicazione, un'alta capacità di auto-rinnovamento, propensione alla differenziazione in cellule tumorali attivamente proliferanti e resistenza alla chemio e radioterapia [198-199].

4. Scopo della tesi

Allo stato attuale, nei pazienti con carcinoma gastrico, il solo sistema prognostico utilizzato è basato sul sistema di stadiazione TNM, in cui il grado di penetrazione del tumore (pT) ed il coinvolgimento linfonodale (pN) sono i due indicatori prognostici principali per i pazienti senza malattia metastatica a distanza. I pazienti negli stadi iniziali della malattia sono candidati alla chirurgia. Tuttavia nel 50% dei pazienti si osserva recidiva del tumore anche se la chirurgia è stata eseguita con intento radicale. Da questo si deduce come l'attuale sistema di stadiazione non sembri accurato nel predire il rischio di ripresa di malattia per ogni paziente. Infatti questo tipo di classificazione identifica categorie molto ampie, ognuna composta da sottogruppi con prognosi significativamente diverse per ogni stadio, rendendolo non ottimale nell'ottica di una terapia personalizzata. Ciò si può semplificare con il fatto che alcuni pazienti correntemente classificati come "a basso rischio" non sono sottoposti a terapia adiuvante, anche se poi in seguito manifestano ripresa di malattia. Vice versa altri pazienti stadiati ad "alto rischio" sono sottoposti alla terapia, senza magari averne una reale necessità. Al fine di comprendere meglio il problema ed indirizzare così i pazienti sono necessari nuovi fattori prognostici.

Al momento della diagnosi circa il 25% dei pazienti con cancro coloretale presenta metastasi epatiche e un ulteriore 40-50% svilupperà metastasi metacrone nel corso della malattia. La maggior parte dei pazienti non è resecabile: infatti solo il 10-20% possono essere sottoposti a resezione epatica con intento radicale. Grazie alla terapia neoadiuvante, pazienti inizialmente non resecabili possono essere sottostadiati e venire quindi sottoposti all'intervento chirurgico. A differenza di altri tipi di tumori in stadio quarto, i pazienti con malattia metastatica in sede epatica da CRC possono beneficiare della resezione R0 potenzialmente curativa, con un tasso di sopravvivenza a 5 anni compreso tra il 37% e il 68% (contro una sopravvivenza praticamente nulla se non sono trattati chirurgicamente). Anche in questo caso dunque è necessario individuare, attraverso nuovi fattori prognostici, i pazienti che in seguito ad una resezione apparentemente R0 subiranno recidiva di malattia.

In generale dunque, per migliorare le aspettative di vita dei pazienti, la strategia da attuare è la seguente:

1. determinare fattori prognostici indipendenti che permettano di individuare, tra i pazienti sottoposti ad intervento con intento radicale, quelli che presentano ancora malattia minima residua e che quindi beneficranno della chemioterapia adiuvante;
2. capire verso quali farmaci, tra quelli a disposizione, risultano sensibili i pazienti con malattia minima residua;
3. sviluppare nuovi farmaci più efficaci verso la malattia minima residua.

Nel presente lavoro di tesi ci si è concentrati sul primo punto. Lo scopo della tesi di dottorato è stato quello di definire se le cellule tumorali circolanti, analizzate mediante profilo di espressione genica nel sangue periferico, avessero o meno un ruolo prognostico sia in pazienti con tumore gastrico primario, sia in pazienti con malattia metastatica in sede epatica da CRC. Questo permetterebbe agli oncologi di avere a disposizione un fattore prognostico indipendente da quelli convenzionali, per individuare quali sono i pazienti, di entrambe le patologie, che trarrebbero un reale beneficio dalla terapia adiuvante.

5. Pazienti, Materiali e Metodi

5.1. Selezione dei Pazienti

5.1.1. Carcinoma gastrico

Per il progetto di Tesi sono stati selezionati, (parte durante il periodo di dottorato e parte retrospettivamente dal database informatizzato di oltre 700 pazienti trattati chirurgicamente per cancro gastrico presso la Clinica Chirurgica II dell'Università di Padova), un gruppo di 70 pazienti con adenocarcinoma gastrico in diverso stadio patologico. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Padova con protocollo n° 70/2008. I pazienti sono stati informati della natura puramente investigativa dello studio ed hanno firmato il modulo di Consenso Informato al momento dell'arruolamento. Le caratteristiche clinico-patologiche sono riportate in *tabella 10*. Il criterio principale di inclusione è stato la disponibilità dei dati riguardanti la sopravvivenza dei pazienti e la disponibilità nella nostra Banca Tissutale di un prelievo di sangue periferico nell'immediato periodo pre-operatorio. Come campioni di controllo sono stati utilizzati i buffy coat di venti donatori sani selezionati dal Centro Immunotrasfusionale dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Da questi si è estratto l'RNA totale, utilizzato poi per la preparazione del pool di cDNA impiegato come calibratore nelle corse di RT-qrtPCR.

ID paziente	Codice Banca Tissutale	Sesso	Età (anni)	Status	T	N	M	Stadio TNM97
1	9094 MD	F	47	0	2b	2	0	3A
2	7898 VF	F	39	1	2b	2	0	3A
3	7708 FM	M	67	1	3	2	0	3B
4	7642 DT	F	83	0	2b	1	0	2
5	7394 GO	F	78	1	2b	1	0	2
6	9415 EC	F	30	0	2b	1	0	2
7	8509 MG	M	69	1	2b	1	0	2
8	8469 GA	M	66	0	2b	1	0	2
9	8159 LC	M	51	1	3	2	0	3B
10	7870 TS	M	77	1	3	1	0	3A
11	7399 GA	F	66	1	2b	2	0	3A
12	7218 VE	M	90	1	3	2	0	3B
13	9217 MI	F	75	0	3	1	0	3A
14	9008 BP	M	44	0	2b	2	0	3A
15	8644 QT	M	79	1	3	2	0	3B
16	8409 CR	F	72	1	3	2	0	3B
17	8130 PM	F	61	0	2b	1	0	2
18	7777 PR	F	66	0	2b	1	0	2
19	7318 ML	M	69	1	2b	1	0	2
20	7290 DLL	M	74	0	2a	1	0	2
21	8122 DP	F	41	1	2b	1	1	4
22	8024 CE	F	62	1	2b	3	1	4
23	7993 SL	M	41	1	3	3	1	4
24	7841 RA	M	78	1	3	2	1	4
25	7691 AA	M	54	1	3	3	1	4
26	7003 GR	F	47	1	2b	3	1	4
27	6932 GC	F	62	0	2b	2	1	4
28	7718 MG	M	71	1	3	3	1	4
29	9969 RD	M	70	0	3	0	0	2
30	9964 CZ	F	80	0	2b	0	0	1B
31	9959 ML	F	72	1	2b	3	0	4
32	9600 MA	M	78	1	3	2	1	4
33	8344 ST	M	65	1	2b		1	4
34	8107 CG	M	66	1	2b	0	0	1B
35	10009 SM	M	62	0	2a	0	0	1B

Tabella 10: caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti con carcinoma gastrico inclusi nello studio. Sesso: M=maschio, F=femmina; Status: 0=vivente, 1=deceduto.

ID paziente	Codice Banca Tissutale	Sesso	Età (anni)	Status	T	N	M	Stadio TNM97
36	10007 RN	F	69	0	3	2	0	3B
37	8733 BA	M	66	1	2b	0	0	1B
38	8667 BB	M	72	0	2b	0	0	1B
39	8470 BG	M	54	0	2b	3	0	4
40	8456 CC	F	71	1	2b	2	1	3A
41	7971 CA	M	66	1	2b	3	0	4
42	7648 CM	F	71	0	2b	0	0	1B
43	7474 PP	M	69	1	2b	3	0	4
44	7427 CC	F	67	1	3	3	0	4
45	9994 BG	M	68	0	2a	1	0	2
46	8463 DSA	M	70	1	3	2	1	4
47	8390 DD	F	28	0	2b	3	0	4
48	8055 SF	M	78	1	3	3	0	4
49	10089 GL	M	57	0	3	0	0	1B
50	10307 CP	M	67	1	4	x	1	4
51	10321 GA	F	85	1	2b	3	0	4
52	10342 BVU	M	62	1	3	3	0	4
53	10375 DG	M	70	1	3	1	0	3A
54	10414 CL	M	83	0	2b	2	0	3A
55	10816 MML	F	64	0	3	1	0	3A
56	10842 FV	F	67	0	3	1	0	3A
57	10853 TM	F	68	0	1b	1	0	1B
58	10860 OS	F	68	0	1b	1	0	1B
59	10911 TG	M	68	1	x	x	1	4
60	11029 ZL	F	75	0	3	1	0	3A
61	11149 VE	F	80	0	2a	0	0	1B
62	11162 DMR	M	78	0	2a	0	0	2
63	11171 ZG	M	69	0	2a	0	0	2
64	11240 CN	F	64	0	x	x	1	4
65	11358 BJ	M	79	1	3	3	1	4
66	11480 ML	M	65	0	2a	1	0	2
67	11497 PG	M	79	0	4	1	1	4
68	7904 TD	M	62	0	2b	3	1	4
69	8003 BE	F	52	1	3	3	1	4
70	9104 YM	F	58	1	2a	1	0	3A

Tabella 10 (segue): caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti con carcinoma gastrico inclusi nello studio. Sesso: M=maschio, F=femmina; Status: 0=vivente, 1=deceduto.

5.1.2. Metastasi epatiche da CRC

Per questo studio sono stati selezionati durante il periodo di dottorato, ed in modo retrospettivo dal database informatico della Banca Tissutale della Clinica Chirurgica II un gruppo di 50 pazienti sottoposti a resezione epatica per carcinoma coloretale metastatico (stadio IV). Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Padova con protocollo n° 103/2009. I pazienti sono stati informati della natura puramente investigativa dello studio ed hanno firmato il modulo del Consenso Informato al momento dell'arruolamento. Anche in questo caso il criterio principale di inclusione è stato la disponibilità dei dati riguardanti la sopravvivenza dei pazienti e la disponibilità nella nostra banca biologica del prelievo di sangue periferico nell'immediato periodo pre-operatorio. Le caratteristiche dei pazienti sono descritte in *tabella 11*.

ID paziente	Codice Banca Tissutale	Sesso	Età (anni)	Status	Radicalità
1	7044GD	M	67	1	1
2	7227MA	M	73	1	0
3	7396CA	M	78	1	1
4	7647GA	M	66	1	0
5	7817DG	M	64	1	0
6	7952MA	F	46	1	1
7	7988GM	F	58	1	1
8	8069DP	F	62	0	0
9	8105FE	M	67	1	1
10	8511DCC	M	69	1	1
11	8563CMT	F	57	1	1
12	8991RG	M	64	0	0
13	9005MR	F	63	0	0
14	9189OS	F	35	1	1
15	9516SM	F	73	1	1
16	9768NL	F	47	1	1
17	9916GS	F	56	1	1
18	10137CA	F	74	1	0
19	10139AL	F	69	0	0
20	10208BG	M	56	1	1
21	10271PA	F	75	1	0

Tabella 11: caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti con metastasi epatiche da CRC inclusi nello studio. Sesso: M=maschio, F=femmina; Status: 0=vivente, 1=deceduto; Radicalità: 0=resezione radicale R0, senza residui di tumore né micro né macroscopici, 1= resezione non radicale di tipo R1 o R2.

ID paziente	Codice Banca Tissutale	Sesso	Età (anni)	Status	Radicalità
22	10281GF	M	38	0	1
23	10296MS	M	44	1	0
24	10494MP	M	59	0	0
25	10656PL	M	45	0	0
26	10678MI	M	67	0	0
27	10772AM	F	50	1	0
28	10896LE	M	61	1	1
29	11066AA	M	67	0	0
30	11112IN	M	62	0	0
31	11235TT	M	75	1	1
32	11393SM	F	48	0	0
33	11408PC	F	63	1	1
34	11437TR	M	67	0	0
35	11453CA	M	68	0	0
36	11499TG	M	65	0	1
37	11531RC	M	60	1	1
38	11582MF	M	42	1	0
39	11719RC	F	69	0	0
40	11768CMR	F	65	0	0
41	11827TB	F	55	0	0
42	12081SG	M	28	1	0
43	12088SG	M	66	0	0
44	12126VG	M	79	0	0
45	12224PM	M	50	0	0
46	12229ML	F	57	1	1
47	12321BN	M	78	0	1
48	12343BV	M	55	1	1
49	12368DA	M	69	0	0
50	12899BS	F	52	1	0

Tabella 11 (segue): caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti con metastasi epatiche da CRC inclusi nello studio. Sesso: M=maschio, F=femmina; Status: 0=vivente, 1=deceduto; Radicalità: 0=resezione radicale R0, senza residui di tumore né micro né macroscopici, 1= resezione non radicale di tipo R1 o R2.

5.2. Materiali e Strumentazioni utilizzate

Estrazione dell'RNA totale:

- ✓ Trizol Reagent (Invitrogen);
- ✓ Cloroformio (molecular biology tested, Sigma);
- ✓ Alcool isopropilico (Carlo Erba);
- ✓ Etanolo al 75% (Sigma);
- ✓ Acqua libera da RNasi (DEPC);
- ✓ Centrifuga refrigerata (Eppendorf 5415 R);
- ✓ Cappa aspirante;

Retro trascrizione:

- ✓ High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) composto da:
 - 10x RT Buffer,
 - 10x RT Random Primers,
 - 25x dNTPs,
 - MultiScribe reverse transcriptase, 50 U/μl;
- ✓ acqua libera da nucleasi;
- ✓ termociclatore 9700 GeneAmp PCR system (Applied Biosystems).

Reazione di qrt-PCR:

- ✓ TaqMan® Gene Expression Assay (20x mix) Applied Biosystems contenente:
 - FAM dye-labeled TaqMan MGB probe,
 - primers non marcati;

In *tabella 12* sono riportate le caratteristiche dei kit utilizzati.

Simbolo del gene	TaqMan Assay ID	Trascritti noti	Proteina tradotta	Lunghezza amplicone (numero di basi)
CEA	Hs00944023_m1	NM_004363.2	NP_004354.2	59
CK19	Hs01051611_gH	NM_002276.4	NP_002267.2	66
CK20	Hs00300643_m1	NM_019010.1	NP_061883.1	75
VEGF	Hs00900054_m1	NM_001025366.2	NP_001020537.2	60
		NM_001025367.2	NP_001020538.2	
		NM_001025368.2	NP_001020539.2	
		NM_001025369.2	NP_001020540.2	
		NM_001025370.2	NP_001020541.2	
		NM_001033756.2	NP_001028928.1	
		NM_001171630.1	NP_001165101.1	
		NM_001171629.1	NP_001165100.1	
		NM_001171628.1	NP_001165099.1	
		NM_001171627.1	NP_001165098.1	
		NM_001171626.1	NP_001165097.1	
		NM_001171625.1	NP_001165096.1	
		NM_001171624.1	NP_001165095.1	
		NM_001171623.1	NP_001165094.1	
NM_001171622.1	NP_001165093.1			
EGFR	Hs01076091_m1	NM_003376.5	NP_003367.4	86
		NM_201282.1	NP_958439.1	
		NM_201283.1	NP_958440.1	
		NM_201284.1	NP_958441.1	
Survivin	Hs00153353_m1	NM_005228.3	NP_005219.2	93
		NM_001012271.1	NP_001012271.1	
CD133	Hs01009261_m1	NM_001168.2	NP_001159.2	106
		NM_001145847.1	NP_001139319.1	
		NM_001145848.1	NP_001139320.1	
		NM_001145849.1	NP_001139321.1	
		NM_001145850.1	NP_001139322.1	
		NM_001145851.1	NP_001139323.1	
NM_001145852.1	NP_001139324.1			
		NM_006017.2	NP_006008.1	

Tabella 12: caratteristiche dei kit TaqMan® utilizzati nelle analisi di RT-qrtPCR.

- ✓ TaqMan Universal qrt-RT-PCR MasterMix Applied Biosystems con AmpErase UNG [la mix contiene l'enzima UNG (Uracil-N-glicosilasi) e una miscela di nucleotidi con dUTP. La presenza di questo nucleotide previene la contaminazione da “carry-over” di DNA da precedenti reazioni di PCR. Il trattamento con l'enzima UNG all'inizio del programma di amplificazione rimuove i residui di uracile da molecole di DNA contenenti dU e impedisce che queste fungano da stampo per la reazione di amplificazione] che contiene:
 - polimerasi AmpliTaq Gold,

- dUTP invece di dTTP,
- fonte passiva interna ROX Dye, che normalizza per le variazioni di fluorescenza non correlate alla RT-qrtPCR;
- ✓ acqua libera da nucleasi;
- ✓ 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

5.3. Metodi

5.3.1. Processamento e stoccaggio dei campioni di sangue periferico

I campioni di sangue sono ottenuti tramite accesso venoso periferico eseguito nell'immediato periodo pre-operatorio. Per ogni paziente, dopo aver scartato i primi 5 ml di sangue (al fine di ridurre il rischio di falsi positivi, dato che l'azione traumatica dell'ago potrebbe inoculare cellule epiteliali che andrebbero a falsare i risultati [207]), si raccolgono 7 ml di sangue venoso in provette con EDTA, le quali si conservano a +4°C per un'ora al massimo prima del processamento. Ogni campione viene sottoposto a centrifugazione a 1500 x g per 10 minuti a +4°C, quindi mediante una pipetta si aspira in una cryovial il così detto 'buffy coat', ossia il sottile strato macroscopicamente visibile e di colore tendente al bianco (compreso fra i globuli rossi sedimentati sul fondo e il plasma al di sopra di esso) che contiene le cellule nucleate come i globuli bianchi e le eventuali cellule tumorali circolanti [208].

Al fine di mantenere l'integrità dell'RNA, la cryovial viene conservata in azoto liquido in attesa della successiva fase di estrazione dell'RNA.

5.3.2. Estrazione dell'RNA da buffy coat

Per isolare l'RNA dal buffy coat viene utilizzato il metodo di estrazione guanidina isotiocianato fenolo-cloroformio [209-210], più comunemente noto come protocollo TRIzol. Lavorando in ghiaccio si trasferisce il buffy coat dalla cryovial in una provetta da 15 ml e si aggiunge TRIzol in quantità di 2.5ml per ogni ml del campione. Il Trizol è una soluzione monofasica di fenolo (che causa lisi cellulare) e guanidina isotiocianato (un agente caotropico che ha la proprietà

di inattivare le nucleasi) [211]. Si agita energicamente la provetta per omogeneizzare il tutto e si lascia incubare per 5 minuti a temperatura ambiente per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici. Si trasferisce il campione in tubi da 2 ml e lo si sottopone alla prima centrifuga: 12.000 x g per 15 minuti a +4°C, il cui risultato è la separazione dei campioni in un precipitato disomogeneo sul fondo, contenente detriti di membrana, proteine, lipidi e una fase acquosa limpida contenente gli acidi nucleici. Il soprannatante viene recuperato con una pipetta e trasferito in una nuova provetta. Si aggiungono 240 µL di cloroformio per ogni ml di TRIzol inizialmente utilizzato, si mescola vigorosamente per 15 secondi e si incuba il campione per 3 minuti a temperatura ambiente. A questo punto il campione può essere sottoposto alla seconda centrifuga: 12.000 x g per 15 minuti a +4°C, il cui risultato è un preparato polifasico in cui si ha una fase organica sul fondo, un'interfase di colore bianco contenente il DNA e una fase superiore acquosa limpida dove è contenuto l'RNA. Si recupera la fase acquosa, si trasferisce in un'altra provetta e si aggiungono 0.5 ml di isopropanolo per ogni ml di TRIzol utilizzato. Si lascia incubare per un'ora a -20°C per favorire la precipitazione dell'RNA, quindi si centrifuga 12.000 x g per 10 minuti a +4°C, a seguito della quale si ottiene un pellet di RNA sul fondo della provetta. Si effettua un doppio lavaggio del pellet con etanolo al 75%, al fine di eliminare ogni traccia di fenolo che comprometterebbe la successiva reazione di retro trascrizione. Infine si lascia essiccare all'aria il pellet per pochi minuti e lo si scioglie in un volume appropriato di acqua libera da nucleasi, anche incubando per 10 minuti a 50°C per permettere la completa dissoluzione dell'RNA. Ora il campione, dopo la quantificazione, è pronto per essere retro trascritto

5.3.3. Quantificazione e controllo di qualità dell'RNA

Al fine di poter valutare la quantità e la qualità dell'RNA ottenuto dal processo di estrazione, viene effettuata la lettura spettrofotometrica di una aliquota dell'estratto. La quantificazione si effettua misurando l'assorbanza a 260 nanometri (nm), tenendo poi conto del fatto che un valore di assorbanza pari ad uno, con un cammino ottico di un centimetro, corrisponde ad un valore di 40 µg/ml di RNA. La qualità dell'acido nucleico si verifica leggendo lo stesso

campione ad una lunghezza d'onda di 280 nm, che corrisponde al picco di assorbimento delle proteine, principale contaminante degli estratti. Effettuando poi il rapporto tra le assorbanze a 260 e 280 nm si può ottenere una stima della bontà dell'RNA ottenuto (in genere in preparazioni pure tale rapporto ha valori compresi tra 1.9 e 2.1). A titolo esplicativo, nella *tabella 13* sono riportati i valori di quantificazione e di purezza per i campioni di RNA dai pazienti con CRC metastatico. I campioni contrassegnati con (*) presentavano valori del rapporto 260/280 fuori scala. Si è deciso di inglobarli ugualmente nello studio poiché la successiva corsa in RT-qrtPCR ha confermato la qualità dei cDNA attraverso le buone curve di amplificazione del gene housekeeping.

ID paziente	Codice Banca Tissutale	Quantità RNA estratta [µl]	Quantificazione [µg/µl]	Rapporto 260/280
1	7044GD	80	0.87	1.9
2*	7227MA	50	0.70	1.6
3*	7396CA	80	0.68	1.8
4*	7647GA	80	0.78	1.6
5*	7817DG	80	1.00	1.6
6	7952MA	80	0.79	1.9
7	7988GM	80	1.35	2.0
8	8069DP	80	0.58	1.9
9	8105FE	80	1.02	1.9
10	8511DCC	80	0.25	1.9
11	8563CMT	80	0.51	2.0
12	8991RG	80	0.64	2.0
13	9005MR	80	0.57	1.9
14	9189OS	80	1.02	1.9
15	9516SM	75	0.55	1.9
16	9768NL	75	1.04	1.9
17	9916GS	75	1.01	1.9
18	10137CA	75	0.07	2.4
19	10139AL	75	0.51	1.9
20	10208BG	80	0.98	2.0
21	10271PA	80	0.86	2.0

Tabella 13: valori di concentrazione espressa in µg/µl e purezza espressa come rapporto tra le assorbanze a 260 nm e 280 nm per gli RNA totali estratti dai buffy coat dei pazienti con metastasi epatiche da CRC.

ID paziente	Codice Banca Tissutale	Quantità RNA estratta [μl]	Quantificazione [μg/μl]	Rapporto 260/280
22	10281GF	60	0.36	2.1
23	10296MS	80	1.09	2.0
24	10494MP	60	0.21	2.1
25	10656PL	75	1.10	2.0
26	10678MI	75	0.34	2.1
27	10772AM	75	0.61	2.0
28	10896LE	75	0.65	2.1
29*	11066AA	80	1.00	1.8
30	11112IN	80	0.40	1.9
31	11235TT	80	1.00	1.9
32	11393SM	80	0.39	1.9
33	11408PC	80	0.59	1.9
34*	11437TR	80	0.56	1.8
35	11453CA	80	0.67	1.9
36	11499TG	80	1.00	1.9
37	11531RC	80	0.57	1.9
38	11582MF	80	0.70	1.9
39	11719RC	80	0.80	1.9
40	11768CMR	80	0.30	1.9
41	11827TB	60	0.30	1.9
42*	12081SG	50	0.70	2.2
43	12088SG	50	0.34	1.9
44*	12126VG	50	0.26	1.8
45*	12224PM	65	0.50	1.8
46	12229ML	50	0.21	1.9
47	12321BN	80	0.32	1.9
48	12343BV	80	0.89	1.9
49	12368DA	50	0.33	2.0
50	12899BS	80	1.71	1.9

Tabella 13 (segue): valori di concentrazione espressa in μg/μl e purezza espressa come rapporto tra le assorbanze a 260 nm e 280 nm per gli RNA totali estratti dai buffy coat dei pazienti con metastasi epatiche da CRC.

5.3.4. Retro trascrizione e RT-qrtPCR

Per determinare il profilo di espressione genica nel sangue periferico è stata impiegata la tecnica di RT-qrtPCR in due fasi, ossia effettuando una prima reazione di retro trascrizione ed in un secondo momento le corse in qrtPCR. Per la retro trascrizione è stato impiegato l'High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) che si basa sull'utilizzo di random primers. Il campione contenente l'RNA deve avere un volume superiore a 30 μl, deve essere libero da inibitori della retro trascrizione, libero da RNasi, non denaturato e la

concentrazione di RNA finale deve essere compresa tra 0.01-1.00 µg/µl. Per ogni campione è stata prelevata una quantità tale da avere 7.00 µg di RNA in 100 µl di volume finale di reazione. Seguendo il protocollo del kit, agli RNA dei campioni si è aggiunta la mix di reazione (contenente acqua, buffer di reazione, random primers, dNTPs, trascrittasi inversa MultiScribe) e si è posto nel termociclatore 9700 GeneAmp PCR System (Applied Biosystems), con il seguente programma; stadio 1: 25°C per 10 minuti (attivazione dell'enzima); stadio 2: 37°C per 120 minuti (reazione di retro trascrizione); stadio 3: 85°C per 15 minuti (inattivazione della trascrittasi inversa). Il cDNA ottenuto è stato poi stoccato a -80°C.

Per la seconda fase di amplificazione dei cDNA, si è seguito il protocollo TaqMan Gene Expression Assay. Alla piastra da 96 pozzetti vengono caricati per ognuno in sequenza:

- ✓ TaqMan Universal PCR Master Mix con AmpErase UNG (2X);
- ✓ acqua libera da nucleasi;
- ✓ il kit TaqMan contenente i primers e la probe specifici per il gene di interesse.

Vengono poi caricati in triplice replica tecnica i campioni di cDNA dei pazienti.

Infine si configura il software della macchina e si fa correre la piastra sul sistema 7300 Real-Time PCR programmando opportunamente le condizioni secondo lo schema in *figura 10*.

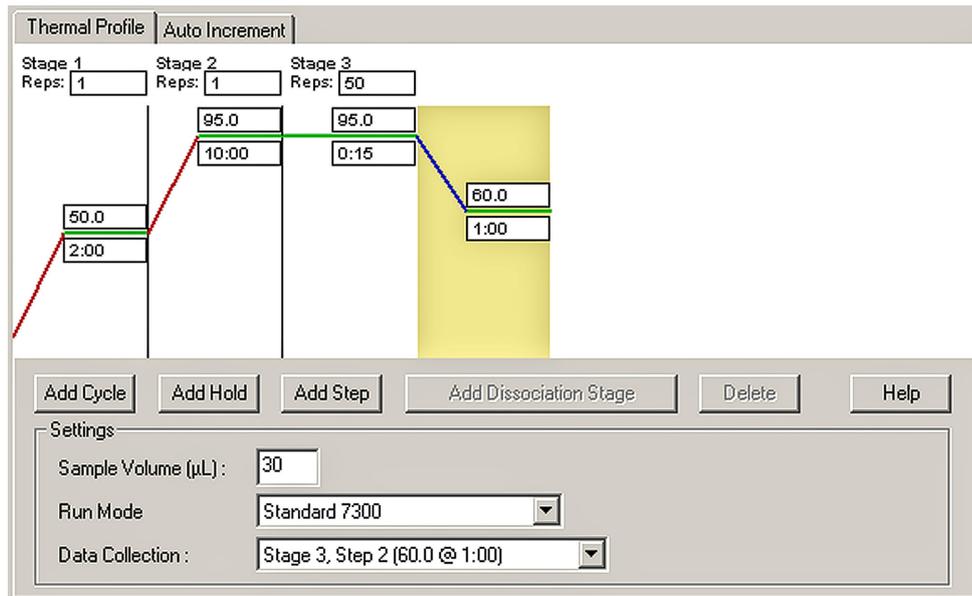


Figura 10: condizioni di amplificazione dei campioni. Stage 1: 50°C per 2 minuti. Viene attivato l'enzima UNG e svolge la sua azione; Stage 2: 95°C per 10 minuti. Denaturazione iniziale ed attivazione della polimerasi; Stage 3: 50 cicli, ognuno composto da due stadi; stadio 1: 95°C per 15 secondi (denaturazione); stadio 2: 60°C per 1 minuto (annealing ed estensione). L'acquisizione del segnale (data collection) per ogni ciclo viene effettuata durante lo stadio 2.

All'avanzare della reazione il monitor visualizza le curve di amplificazione. Per l'ottenimento di risultati di qualità sono necessarie alcune precauzioni per l'esecuzione della RT-qrtPCR. È necessario:

- ✓ condurre tutte le operazioni sotto cappa chimica aspirante;
- ✓ usare camice e guanti puliti, liberi da RNasi, mentre si maneggiano i campioni nelle varie fasi;
- ✓ mantenere aree separate e strumentazione dedicata per le fasi di estrazione dell'RNA, preparazione dei campioni di cDNA e l'allestimento della RT-qrtPCR;
- ✓ usare puntali sterili con filtro incorporato;
- ✓ pulire periodicamente i piani di lavoro e la strumentazione con soluzioni al 10% di candeggina;
- ✓ Evitare di portare gli amplificati nella zona di allestimento della RT-qrtPCR.

5.3.5. Considerazioni su Calibratori e geni Housekeeping impiegati nello studio

Nella prima parte del progetto riguardante i pazienti con cancro gastrico, i valori di espressione a livello di mRNA per ogni campione sono stati rapportati ad un calibratore costituito da un pool di cDNA. Questo è stato preparato a partire dai prelievi di sangue periferico di venti donatori sani provenienti dal Centro Immunotrasfusionale di Padova. Se ne è estratto l'RNA ed i relativi cDNA ottenuti sono stati miscelati tra loro nelle stesse proporzioni. L'utilizzo di tale pool ha permesso un duplice vantaggio:

1. l'utilizzo come calibratore di un materiale molto simile a quello dei campioni in analisi, con le stesse caratteristiche di efficienza di amplificazione e quindi l'applicabilità del metodo del $\Delta\Delta C_T$;
2. la creazione di una soglia rappresentata dai soggetti sani verso cui si sono confrontati i pazienti malati di tumore: i valori di espressione genica dei marcatori nei pazienti sono stati messi in diretta relazione con la condizione "normale".

I valori di espressione genica sono stati normalizzati nei confronti dell'mRNA della β -actina (ACTB), scelto come housekeeping. La β -actina è una proteina del citoscheletro, essenziale per la sua struttura e cinetica, nonché fondamentale per la locomozione cellulare. Grazie ai suoi ruoli basali, il suo livello di espressione si considera non variabile a seconda delle condizioni sperimentali [212].

Nelle piastre assieme ai campioni, sono stati aggiunti un "blank", ossia un campione costituito di acqua ed un controllo positivo di espressione genica. Questo è stato ottenuto mediante retro trascrizione dell'RNA estratto dalla linea cellulare di adenocarcinoma gastrico umano N87, acquistata presso l'American Type Culture Collection (ATCC) e coltivata nel nostro laboratorio.

Per lo studio riguardante l'analisi delle CTC nei pazienti con metastasi epatiche da CRC si è scelto di utilizzare come calibratore uno di questi scelto in modo casuale. Ciò è stato possibile poiché:

1. l'utilizzo del metodo di analisi relativo del $\Delta\Delta C_T$ permette di fare questo tipo di confronto, anzi utilizzando uno dei campioni di analisi come

calibratore gli assunti fatti per l'applicazione del metodo sono particolarmente validi;

- avendo condotto uno studio di tipo prognostico siamo interessati a valutare l'andamento di un gruppo di pazienti, senza preoccuparci della condizione non patologica (che invece è necessario considerare negli studi di tipo diagnostico);

L'espressione dei vari marcatori per questi pazienti è stata normalizzata utilizzando come gene housekeeping non la β -actina, bensì la β -glucuronidasi (GUS), una glicoproteina implicata nel processo di glicosilazione nei lisosomi. Infatti, da dati di letteratura [213], la sua espressione nel tessuto epatico metastatico da CRC risulta costante se confrontata con l'espressione nel corrispondente tessuto normale. Anche nel presente studio, nelle piastre assieme ai campioni sono stati aggiunti un "blank" ed un controllo positivo di espressione genica. Non avendo a disposizione una linea cellulare, si è utilizzato un pool di RNA estratto da biopsie di metastasi epatiche da CRC.

5.4. Analisi statistiche

5.4.1. Pazienti con carcinoma gastrico

Le analisi statistiche sono state condotte mediante l'uso dei programmi Stat View V. 4.57 (Abacus Concepts, London, UK) e StatXact V7.0.0 (Cytel Software Corporation, USA). La correlazione tra i livelli genici (espressione genica bassa vs. alta rispetto al valore mediano) e le categorie di stadiazione TNM della malattia è stata determinata dal trend test di Cochran-Armitage. Le curve di sopravvivenza sono state create secondo il metodo di Kaplan-Meier e le comparazioni di sopravvivenza univariata sono state calcolate mediante log-rank test. I livelli trascrizionali dei quattro geni (CK19, CEA, VEGF, Survivin), assieme a fattori antropometrici (età, sesso) ed alla stadiazione TNM, sono stati utilizzati come variabili indipendenti nell'analisi di sopravvivenza multivariata, secondo il modello di regressione dei rischi proporzionali di Cox. La selezione delle variabili che contribuiscono in modo significativo al modello predittivo è stata effettuata attraverso il metodo stepwise. Sono stati considerati come statisticamente significativi i valori di $P < 0.05$.

5.4.2. Pazienti con metastasi epatiche da CRC

L'analisi statistica è stata effettuata mediante l'utilizzo del pacchetto statistico STATA SE 11.0 (Statacorp, College Station, TX, USA). Per l'analisi della sopravvivenza la casistica è stata considerata prima nella sua globalità, successivamente i pazienti sono stati suddivisi in due gruppi in base alla radicalità dell'intervento resettivo (R0 vs. R1-R2). Sono state considerate come variabili indipendenti l'età, il sesso, la radicalità e i livelli trascrizionali dei geni di interesse misurati nel sangue periferico dei pazienti (CK19, CK20, CEA, CD133, VEGF, EGFR, Survivin).

Le curve di sopravvivenza sono state stimate secondo il metodo di Kaplan-Meier e le funzioni di sopravvivenza univariata sono state comparate mediante log-rank test. L'analisi di sopravvivenza univariata e multivariata è stata effettuata secondo il modello di regressione dei rischi proporzionali di Cox. Mediante il modello di regressione univariata di Cox, a causa del numero relativamente basso di eventi (n=28), è stata effettuata una prima selezione delle covariate. Le covariate caratterizzate dal P-value più basso sono state poi incluse nell'analisi multivariata. La selezione delle covariate che contribuivano in modo significativo ed indipendente al modello prognostico è stata effettuata attraverso l'Akaike Information Criterion (AIC). Sono stati impiegati gli errori standard robusti ed il metodo Efron per la gestione dei ties nella variabile dipendente (nel nostro caso il tempo). Dopo avere creato il modello multivariato, è stato utilizzato il predittore lineare per calcolare il rischio individuale per ogni paziente secondo la seguente formula:

$$PI = (\beta_1 \times X_1) + (\beta_2 \times X_2) + (\beta_n \times X_n),$$

dove PI è il Prognostic Index (che è la combinazione lineare delle n covariate trattenute dal modello, ciascuna moltiplicata per il suo coefficiente), e β_n è il coefficiente di regressione per ciascuna covariata (X_n). In seguito i valori di PI sono stati categorizzati sulla base dei terzili: questa nuova variabile categorica è stata utilizzata per dividere i pazienti in tre diversi gruppi prognostici, sulla base delle informazioni combinate fornite dalle covariate trattenute dal modello multivariato di Cox. Sono stati considerati come statisticamente significativi i valori di $P < 0.05$.

6. Risultati ottenuti

6.1. Prima parte: CTC in pazienti con carcinoma gastrico

6.1.1. Caratteristiche dei pazienti con carcinoma gastrico

Allo studio hanno partecipato 70 pazienti, 31 donne e 39 uomini, di età compresa fra 28 e 90 anni con un'età mediana di 68 anni, sottoposti a gastrectomia parziale o totale per carcinoma gastrico istologicamente dimostrato. Di questi, al follow-up eseguito in marzo 2008, 33 sono risultati viventi, 37 deceduti. In *tabella 14* sono riassunte le caratteristiche dei pazienti.

Parametri	N	(%)
Pazienti		
Tutti	70	(100.0)
Maschi	39	(55.7)
femmine	31	(44.3)
Età (anni)		
≤ 65	21	(30.0)
> 65	49	(70.0)
Sede		
Multicentrico	5	(7.1)
Terzo superiore	11	(15.7)
Terzo di mezzo	19	(27.1)
Terzo inferiore	35	(50.0)
Stadio TNM		
I (IA + IB)	10	(14.3)
II	14	(20.0)
III (IIIA + IIIB)	19	(27.1)
IV	27	(38.6)

Tabella 14: caratteristiche dei pazienti con cancro gastrico inclusi nello studio (sesso, età e stadio TNM) e sede del tumore.

6.1.2. Sensibilità della tecnica

Per stabilire la sensibilità del nostro sistema sperimentale si sono effettuate delle diluizioni seriali di cellule tumorali (spiking experiment), ottenute dalla linea stabilizzata N87 di adenocarcinoma gastrico, in Peripheral Blood Mononuclear

Cell (PBMC) ottenuti da buffy coat di donatori sani, provenienti dal Centro Immunotrasfusionale di Padova.

Per prima cosa è stato valutato il livello di espressione dei marcatori utilizzati nello studio, andando a misurare mediante RT-qrtPCR il livello dell'mRNA dei geni CEA, CK19, Survivin e VEGF nella linea cellulare pura. Tutti e quattro i geni sono risultati altamente espressi (*figura 11*) in relazione al calibratore utilizzato (una linea cellulare di fibroblasti umani), quindi le cellule N87 rappresentano un valido controllo positivo, nel senso che i livelli di espressione dei quattro marcatori risultano molto maggiori nel tumore rispetto alla condizione non patologica della linea normale.

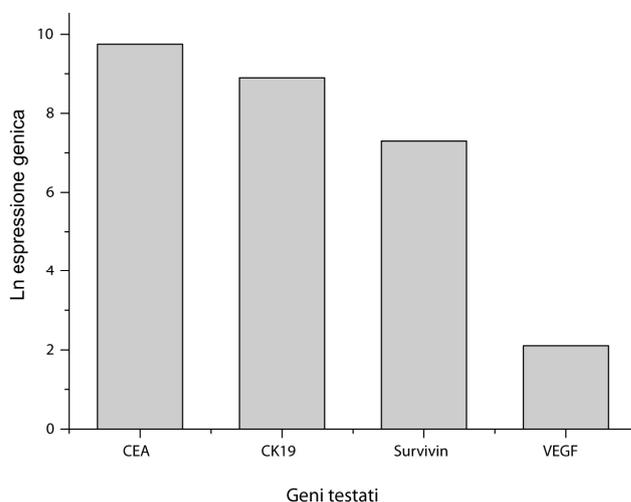


Figura 11: livelli di espressione genica dei quattro geni di interesse nelle cellule N87 di adenocarcinoma gastrico umano (misurati mediante RT-qrtPCR): nell'asse y è riportato il logaritmo naturale dei livelli di espressione; nell'asse x lo zero rappresenta il calibratore verso cui sono stati comparati i campioni sperimentali mediante quantificazione relativa.

Andando a diluire serialmente le cellule N87 nei PBMC, è stato possibile rilevare i livelli di espressione dei geni CEA e Survivin fino ad una cellula tumorale ogni 10^8 cellule di PBMC (*figura 12*). Nei prelievi di sangue periferico questo corrisponde a rilevare fino a 1-10 cellule tumorali ogni 10 ml di campione (che corrisponde al volume del prelievo effettuato ai pazienti).

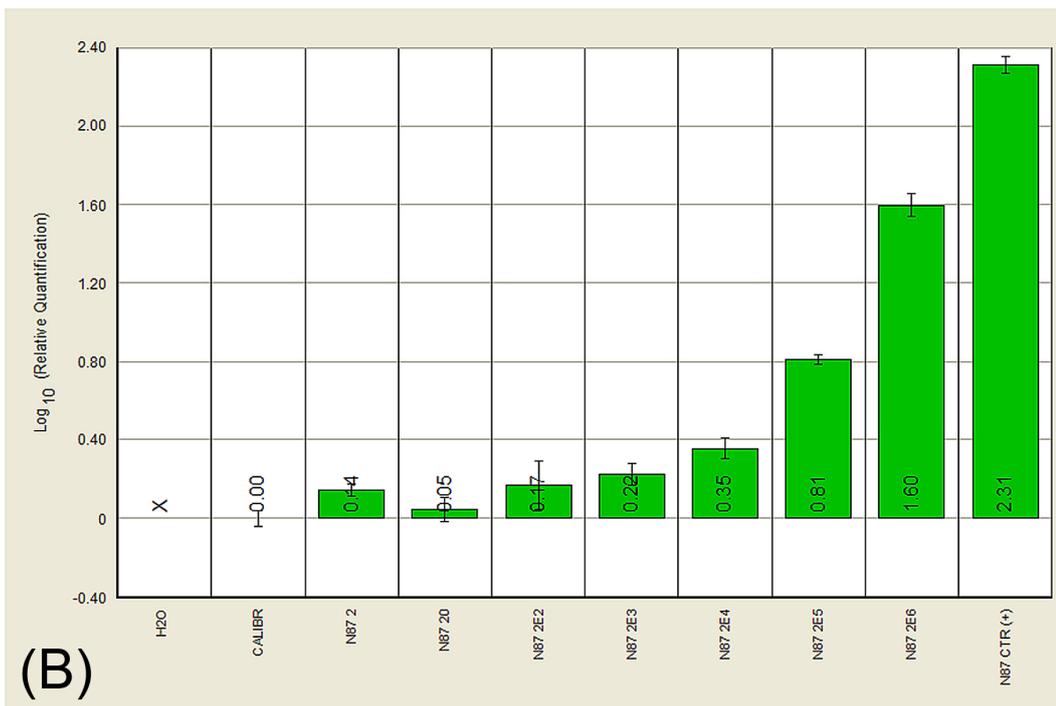
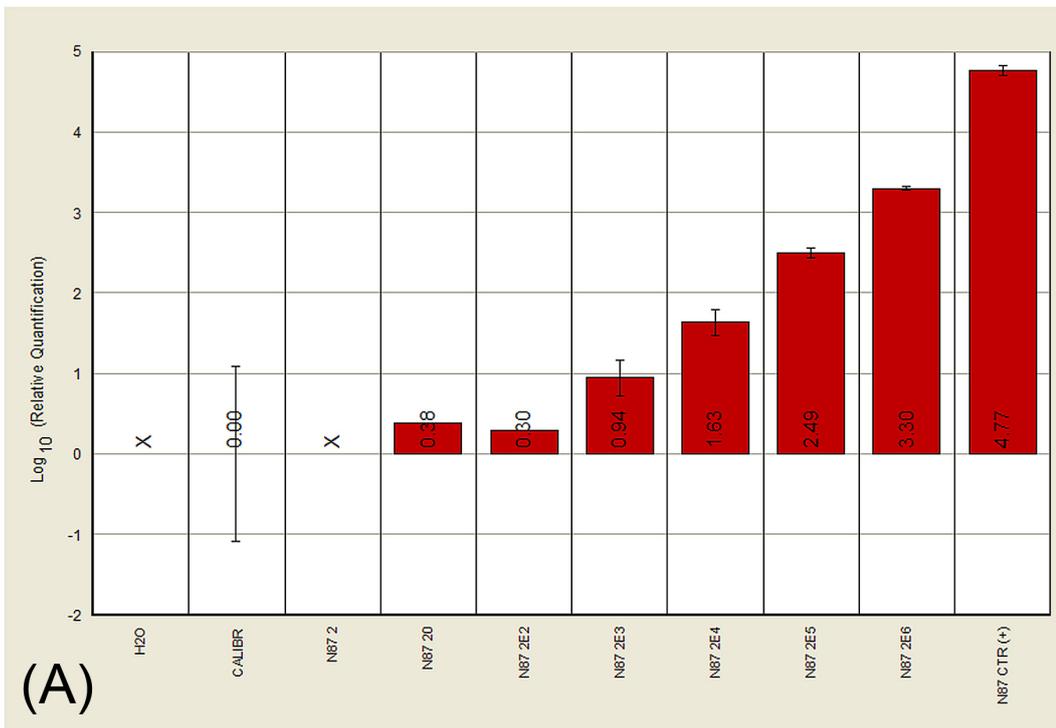


Figura 12: spiking experiment di cellule tumorali N87 in PBMC. La sensibilità è determinata dall'ultima diluizione in cui il sistema è ancora in grado di rilevare l'espressione del gene rispetto al calibratore (un campione di PBMC senza cellule tumorali). (A) analisi effettuata rispetto ai livelli di espressione dell'mRNA di CEA: è possibile rilevare fino a 20 cellule in 2×10^9 PBMC; (B) analisi effettuata rispetto ai livelli di espressione dell'mRNA di Survivin: è possibile rilevare fino a 2 cellule in 2×10^9 PBMC. H₂O: controllo negativo; CALIBR: calibratore; CTR (+): controllo positivo rappresentato dalle cellule N87 non diluite.

6.1.3. Analisi di espressione genica nei pazienti con carcinoma gastrico

Mediante RT-qrtPCR si sono valutati i livelli di espressione dei quattro geni scelti per ogni singolo paziente. L'espressione rispetto al calibratore (rappresentato dal valore zero in asse y) è riportata nei seguenti istogrammi.

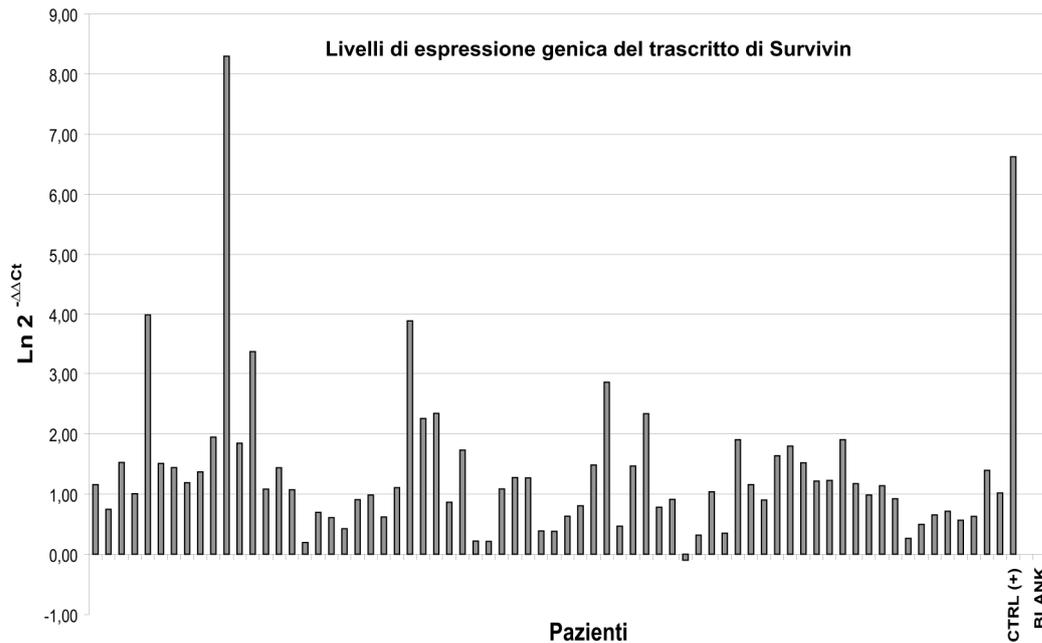


Figura 13: espressione di Survivin relativa al calibratore. CTRL (+): espressione di Survivin nella linea cellulare N87; BLANK: controllo negativo.

Nell'istogramma in *figura 13* si può notare come Survivin in questa serie sia espressa maggiormente rispetto al calibratore in 69 pazienti su 70 ossia nel 98.6 % dei casi. Risulta invece sottoespressa in un caso su 70 (1.4 %). Questo indica un potenziale valore diagnostico del profilo di espressione di Survivin nel sangue periferico di pazienti con adenocarcinoma gastrico. Anche la CK19 (*figura 14*) è espressa maggiormente rispetto al calibratore in 68 pazienti su 70 (97.1 %) e sottoespressa in solamente due casi (2.9 %). Come nel caso di Survivin, l'espressione di CK19 nel sangue periferico presenta caratteristiche compatibili con quelle di un marcatore diagnostico nei pazienti con adenocarcinoma gastrico.

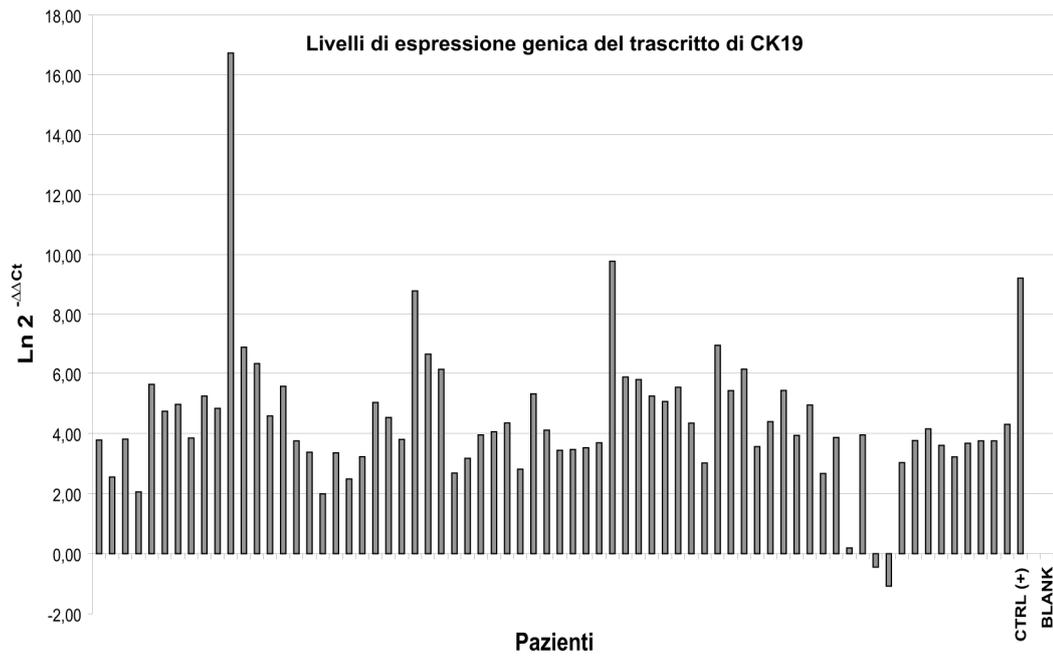


Figura 14: espressione di CK19 relativa al calibratore. CTRL (+): espressione di CK19 nella linea cellulare N87; BLANK: controllo negativo.

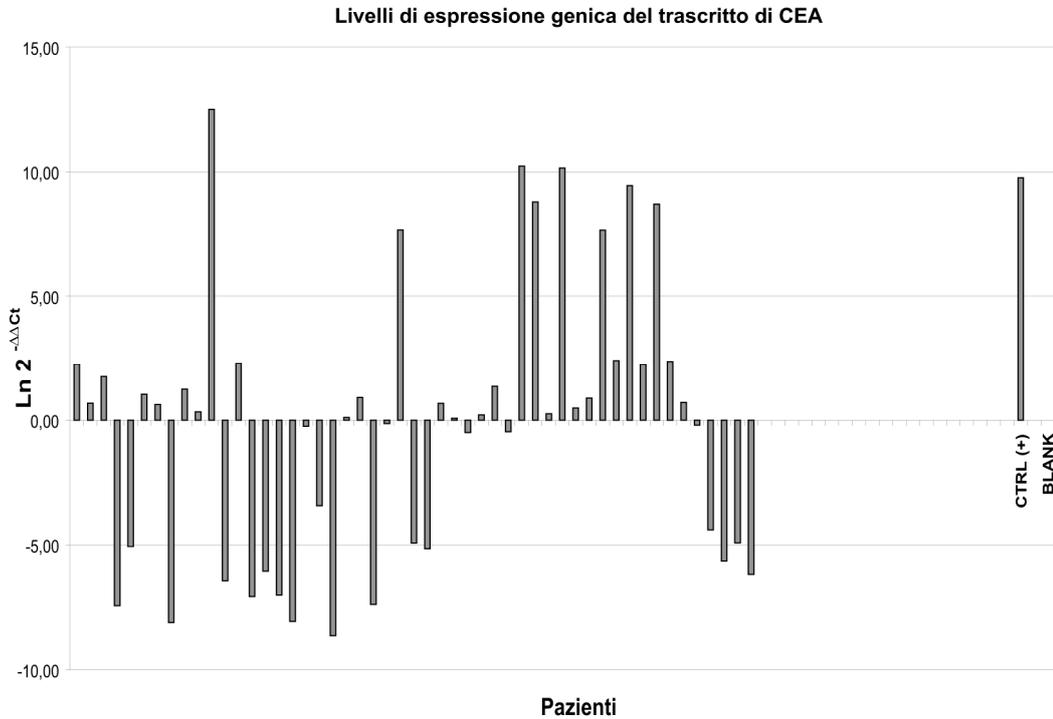


Figura 15: espressione di CEA relativa al calibratore. Abbreviazioni: CTRL (+) espressione di CEA nella linea cellulare N87; BLANK controllo negativo.

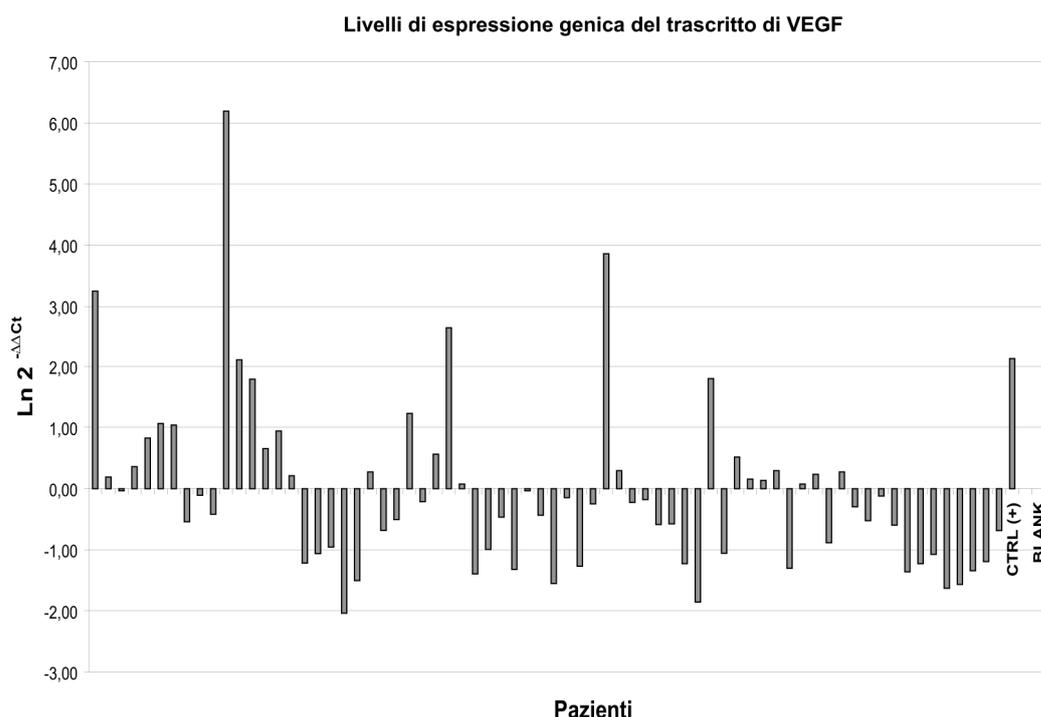


Figura 16: espressione di VEGF relativa al calibratore. CTRL (+): espressione di VEGF nella linea cellulare N87; BLANK: controllo negativo.

Al contrario di Survivin e CK19, le espressioni di CEA (*figura 15*) e VEGF (*figura 16*), risultano ampiamente variabili. In particolare CEA è espresso maggiormente rispetto al calibratore in 30 pazienti su 70 (42.9%), mentre è sottoespresso in 21 pazienti su 70 (30.0%). Il CEA risulta non rilevabile, ossia in RT-qrtPCR non è presente la curva di amplificazione per quei campioni, in 19 pazienti su 70 (27.1%). Per quanto riguarda il VEGF, questo risulta sovra espresso in 27 pazienti su 70 (38.6%) e sottoespresso in 43 su 70 casi (61.4%). In *tabella 15* è riportato un riassunto dei dati di espressione genica.

Marcatore	Sopra il calibratore (%)	Sotto il calibratore (%)	Non rilevabile (%)
Survivin	69 (98.6 %)	1 (1.4 %)	0 (0.0 %)
CK19	68 (97.1 %)	2 (2.9 %)	0 (0.0 %)
CEA	30 (42.9 %)	21 (30.0 %)	19 (27.1 %)
VEGF	27 (38.6 %)	43 (61.4 %)	0 (0.0 %)

Tabella 15: confronto rispetto al calibratore dei livelli trascrizionali di Survivin, CK19, CEA e VEGF nel sangue periferico dei pazienti con cancro gastrico.

Andando ad analizzare i livelli di espressione per ogni stadio, solamente per il marcatore Survivin si ottiene un andamento omogeneo (*figura 17*). Infatti se si riporta sull'asse y la media per ogni stadio del logaritmo naturale dei valori di $2^{-\Delta\Delta C_T}$, il livello del trascritto aumenta in modo significativo dallo stadio I allo stadio III, per poi diminuire nei pazienti con malattia metastatica in stadio IV.

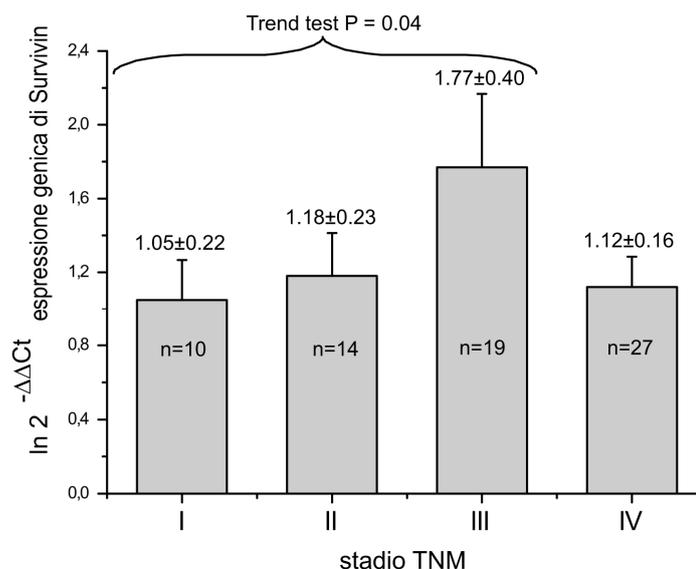


Figura 17: livelli genici di Survivin misurati nel sangue periferico dei pazienti con cancro gastrico. L'analisi trend test dimostra un incremento significativo ($P=0.04$) nei pazienti dallo stadio I allo stadio III. Per ogni colonna sono riportate la media \pm la deviazione standard.

6.1.4. Analisi di sopravvivenza

Considerando la casistica nel suo complesso, la mediana del follow-up è risultata di 15 mesi, variando da un minimo di 6 ad un massimo di 119 mesi, mentre la mediana della sopravvivenza è risultata di 25 mesi. La sopravvivenza a 5 anni è del 25% (*figura 18*). Si sono poi costruite le curve di sopravvivenza dei pazienti per ogni singolo stadio TNM e queste sono state confrontate mediante log-rank test. Data la bassa numerosità, l'analisi è stata effettuata raggruppando i pazienti in stadio I assieme a quelli in stadio II. Dopo un follow-up medio di 26 mesi, l'OS mediana per gli stadi TNM I-II non è stata raggiunta; l'OS mediana per gli stadi III e IV, invece, è risultata rispettivamente di 25 e 13 mesi (*figura 19*). Il test ha confermato una differenza altamente significativa tra le tre curve ($P<0.0001$).

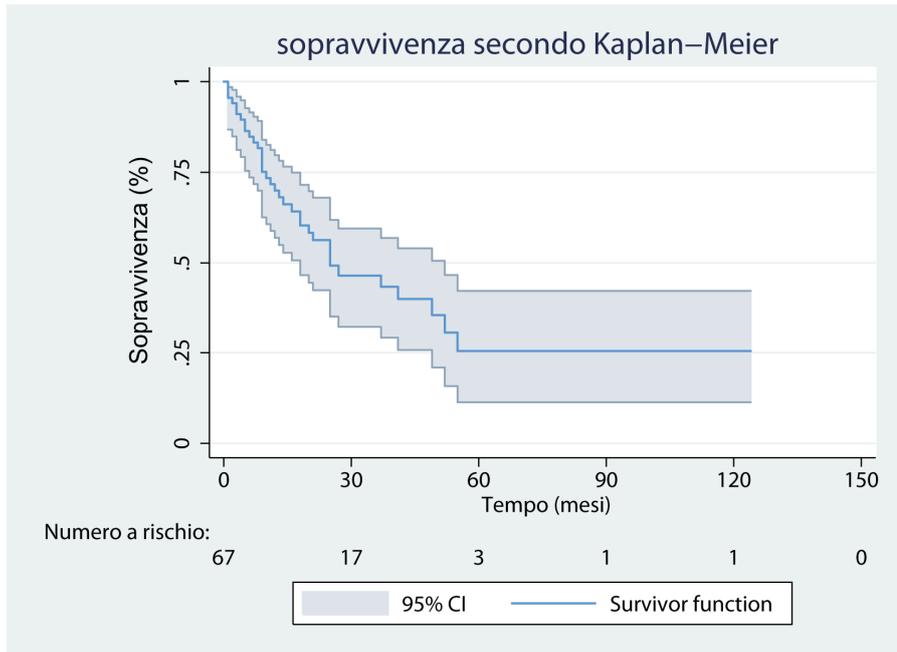


Figura 18: curva della sopravvivenza globale dei pazienti di carcinoma gastrico secondo Kaplan-Meier. La zona in grigio rappresenta l'intervallo di confidenza (CI) al 95 %.

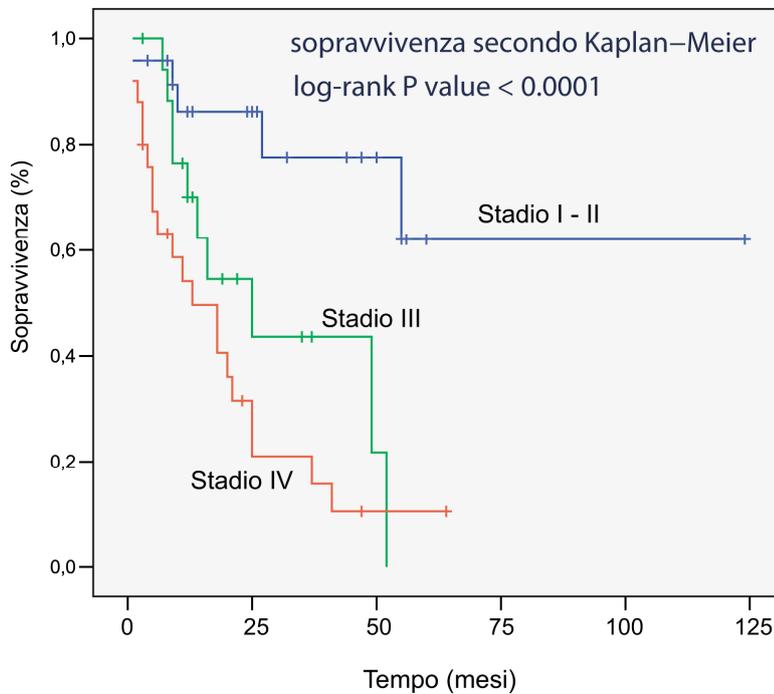


Figura 19: overall survival per ogni stadio dei pazienti con cancro gastrico. Il confronto mediante log-rank test tra le curve degli stadi I-II, III e IV è altamente significativo ($P < 0.0001$).

In base all'analisi di sopravvivenza univariata, tra i quattro geni testati, solamente i livelli di espressione di Survivin possono separare i pazienti in due gruppi con prognosi significativamente diversa. Infatti, considerando come cut-off il 75° percentile dei livelli di espressione trasformati in scala logaritmica (1.508), l'OS mediana per livelli alti (>1.508) e bassi (<1.508) è rispettivamente di 14 e 41 mesi (log-rank test, $P=0.036$, *figura 20*).

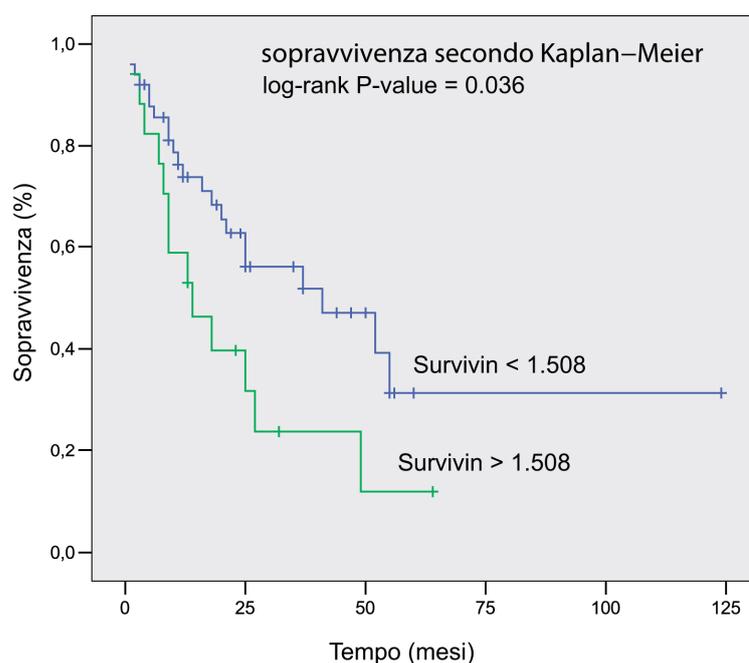


Figura 20: curve di sopravvivenza secondo Kaplan-Meier dei pazienti con livelli trascrizionali di Survivin alti (>75° percentile) o bassi (<75° percentile), misurati nel sangue periferico. Log-rank test $P=0.036$.

I livelli trascrizionali dei quattro geni di interesse sono stati utilizzati come variabili indipendenti assieme a fattori antropometrici (età, sesso) e alla stadiazione TNM nell'analisi di sopravvivenza multivariata secondo il modello dei rischi proporzionali di Cox. La selezione delle variabili che contribuiscono significativamente al modello predittivo è stata effettuata mediante metodo "stepwise". I risultati ottenuti sono riportati in *tabella 16*.

Covariate		HR	95% CI	P
Stadiazione TNM	Stadio I	riferimento	-	-
	Stadio II	1.20	1.01 - 1.45	0.048
	Stadio III	1.34	1.05 - 1.70	0.017
	Stadio IV	3.17	1.38 - 6.77	0.004
Survivin*		1.34	1.14 - 1.53	< 0.001

Tabella 16: risultati dell'analisi multivariata di sopravvivenza. HR: hazard ratio; CI: intervallo di confidenza; (*) valore di HR ogni 100 "unità" di Survivin, vedi testo per dettagli.

Sono presentate solamente le variabili risultate significative all'analisi multivariata ($P < 0.05$), le uniche utili ai fini della prognosi dei pazienti. Per quanto riguarda la stadiazione TNM, prendendo come riferimento lo stadio I, l'hazard ratio (HR) per le covariate considerate è di: 1.2 per lo stadio II, 1.34 per lo stadio III, e 3.17 per lo stadio IV. Tra i quattro geni indagati, solo Survivin correla in modo indipendente con la prognosi dei pazienti. In particolare, per avere un hazard ratio meglio comprensibile, i valori dei $2^{-\Delta\Delta C_T}$ per ogni paziente sono stati divisi per 100. Con questo assunto si ha che, rispetto al calibratore, ogni 100 volte l'aumento dei livelli di espressione di Survivin, il rischio di morte aumenta del 34%.

6.2. Seconda parte: CTC nelle metastasi epatiche da CRC

6.2.1. Caratteristiche dei pazienti con metastasi epatiche da CRC

A questo studio hanno partecipato 50 pazienti (30 maschi e 20 femmine), di età compresa tra i 28 e i 79 anni, tutti sottoposti a resezione epatica per metastasi da CRC (stadio IV). Tra questi, 29 hanno subito un intervento radicale (R0), 21 non radicale (R1-R2). L'inclusione nello studio anche di pazienti resecati in modo non radicale è dovuta all'impossibilità di conoscere l'esito dell'intervento di resezione al momento del prelievo di sangue, dato che questo veniva effettuato sempre nell'immediato periodo pre-operatorio. Al momento dell'analisi dei dati 22 pazienti sono risultati viventi e 28 deceduti. Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte in *tabella 17*.

Parametri	N	(%)
Pazienti		
Tutti	50	(100.0)
Maschi	30	(60.0)
femmine	20	(40.0)
Età (anni)		
≤ 65	30	(60.0)
> 65	20	(40.0)
Radicalità		
R0	29	(58.0)
R1	3	(6.0)
R2	18	(36.0)

Tabella 17: caratteristiche dei pazienti con metastasi epatiche da CRC inclusi nello studio (sesso, età e radicalità dell'intervento). R0: nessun residuo di tumore; R1: residui microscopici di tumore; R2: residui macroscopici di tumore.

6.2.2. Analisi di espressione genica nei pazienti con CRC metastatico

Mediante RT-qrtPCR si sono valutati i livelli di espressione dei sette geni scelti per ogni singolo paziente. L'espressione rispetto al calibratore (rappresentato dal paziente 9005MR, il valore zero in asse y) è riportata nelle *figure 21 e 22*. Nell'analisi è stato inserito come controllo positivo l'RNA estratto da un pool di biopsie di tessuto epatico metastatico da CRC. I valori di $2^{-\Delta\Delta C_T}$ per ogni paziente sono presentati sotto forma di logaritmo naturale.

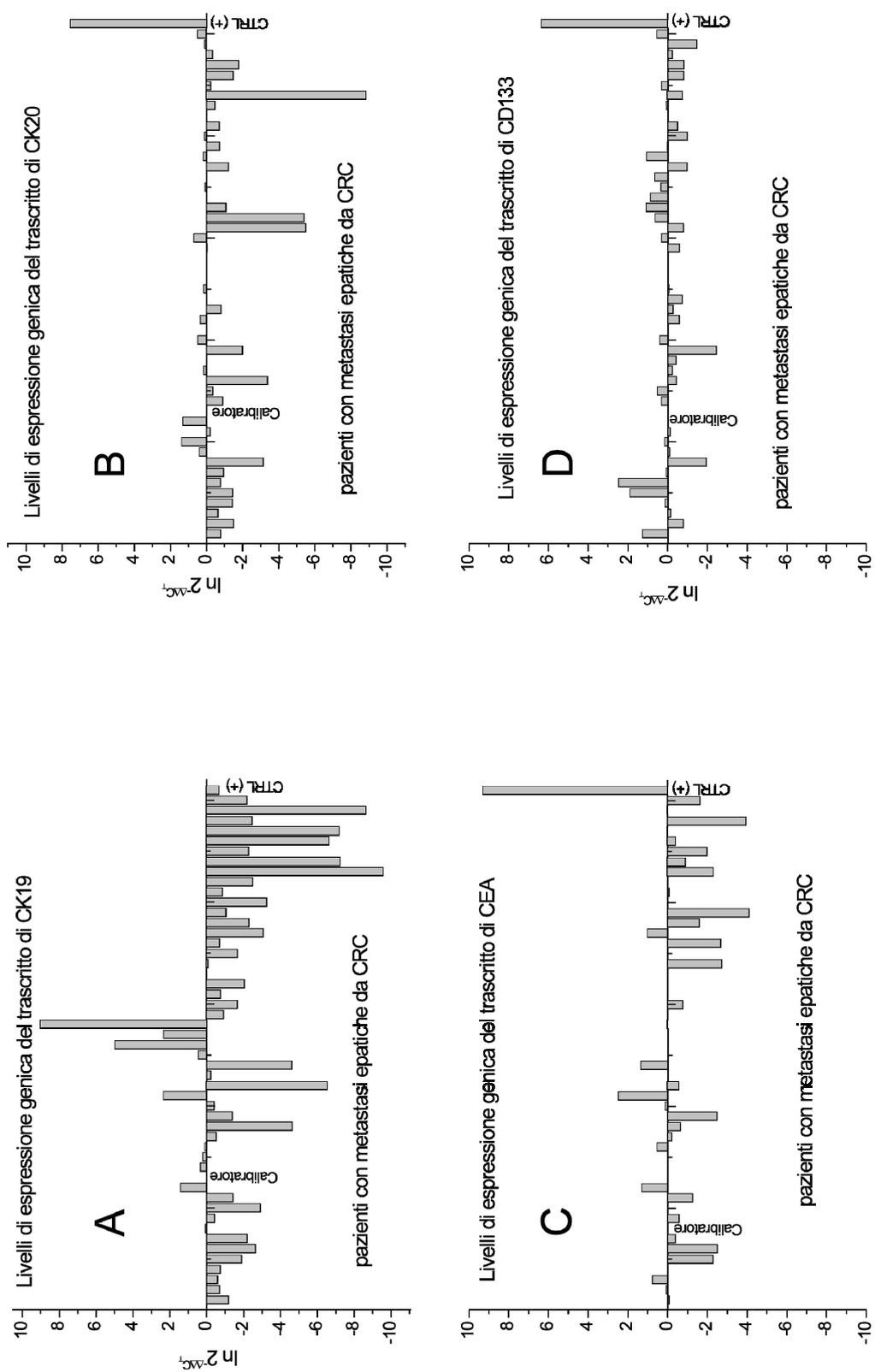


Figura 21: livelli di espressione nel sangue periferico di tutti i pazienti con CRC metastatico dei marcatori CK19 (A), CK20 (B), CEA (C) e CD133 (D), relativi al calibratore. Calibratore: paziente 9005MR; CTRL (+): controllo positivo.

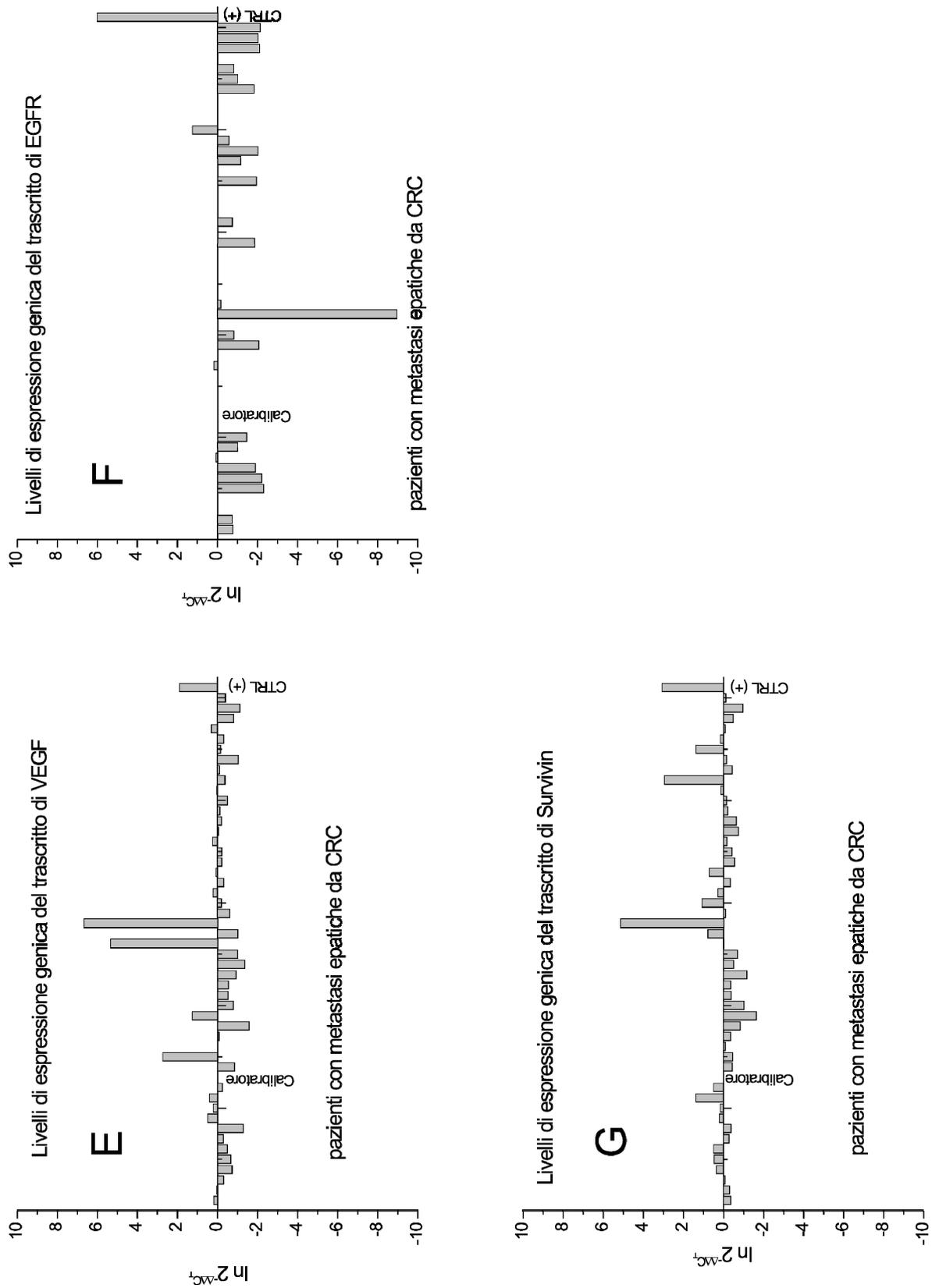


Figura 22: livelli di espressione nel sangue periferico di tutti i pazienti con CRC metastatico dei marcatori VEGF (E), EGFR (F) e Survivin (G) relativi al calibratore. Calibratore: paziente 9005MR; CTRL (+): controllo positivo.

A differenza dei pazienti con cancro gastrico, per tutti i marcatori le espressioni sono ampiamente variabili rispetto al riferimento. Ciò è normale dato che come calibratore è stato scelto in modo casuale uno dei pazienti. Avendo fatto il confronto rispetto ad uno dei pazienti inoltre, non è possibile fare considerazione di carattere diagnostico. Tranne nel caso di CK19 (*figura 21, A*) l'espressione del controllo positivo è sempre molto maggiore rispetto al paziente calibratore. In *tabella 18* sono riassunti i dati di espressione genica per tutti i marcatori analizzati.

Marcatore	Sopra il calibratore (%)	Sotto il calibratore (%)	Non rilevabile (%)
CK19	11 (22 %)	39 (78 %)	0 (0 %)
CK20	14 (28 %)	27 (54 %)	9 (18 %)
CEA	9 (18 %)	22 (44 %)	19 (38 %)
VEGF	16 (32 %)	34 (68 %)	0 (0 %)
EGFR	5 (10 %)	23 (46 %)	22 (44 %)
Survivin	17 (34 %)	32 (64 %)	1 (2 %)
CD133	21 (42 %)	23 (46 %)	6 (12 %)

Tabella 18: tabella riassuntiva dei livelli trascrizionali di CK19, CK20, CEA, VEGF, EGFR, Survivin e CD133, rispetto al calibratore, nel sangue periferico dei pazienti con metastasi epatiche da cancro coloretale.

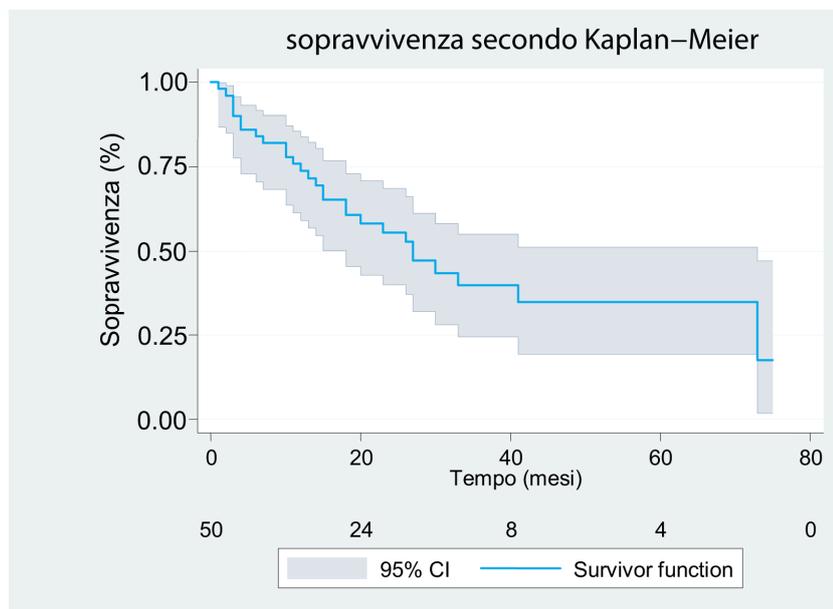


Figura 23: curva della sopravvivenza globale nei pazienti con metastasi epatiche da CRC (n=50) secondo Kaplan-Meier. La zona ombreggiata rappresenta l'intervallo di confidenza (CI) al 95 %.

6.2.3. Analisi di sopravvivenza

Considerando la totalità dei pazienti la mediana della sopravvivenza è risultata di 27 mesi con una overall survival a 5 anni del 35% (figura 23). La radicalità o meno dell'intervento chirurgico rappresenta uno dei fattori prognostici principali per questo tipo di pazienti. Confrontando la curva di sopravvivenza (figura 24) dei pazienti sottoposti ad intervento radicale (R0) con quella dei pazienti sottoposti ad intervento non radicale (R1-R2), attraverso log-rank test è risultata una differenza significativa tra i due gruppi ($P < 0.0001$). I pazienti sottoposti ad intervento non radicale presentano un rischio molto maggiore di sviluppare l'evento di morte rispetto all'altro gruppo.

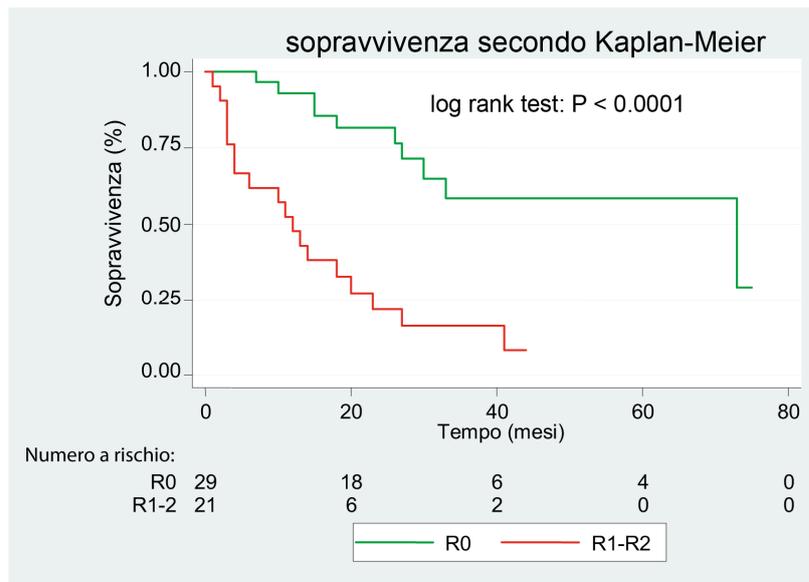


Figura 24: curve di sopravvivenza dei pazienti con metastasi epatiche da CRC del sottogruppo R0 vs. R1-R2 secondo Kaplan-Meier.

Considerando la variabile continua di espressione del trascritto di CD133 è stato possibile categorizzarla scegliendo come cut-off il valore di $CD133=0.6590$ (33° percentile), suddividendo così la popolazione in esame in due sottogruppi ($CD133 \leq 0.6590$ e $CD133 > 0.6590$). Mediante log-rank test è risultata una differenza significativa tra le due curve ($P < 0.025$). I pazienti con un valore del marcatore superiore rispetto al cut-off presentano una sopravvivenza inferiore

rispetto ai pazienti con livelli di CD133 inferiori o uguali a 0.6590, quindi l'aumentata espressione di CD133 risulta un fattore prognostico sfavorevole. La *figura 25* mostra la differenza di sopravvivenza nei due sottogruppi.

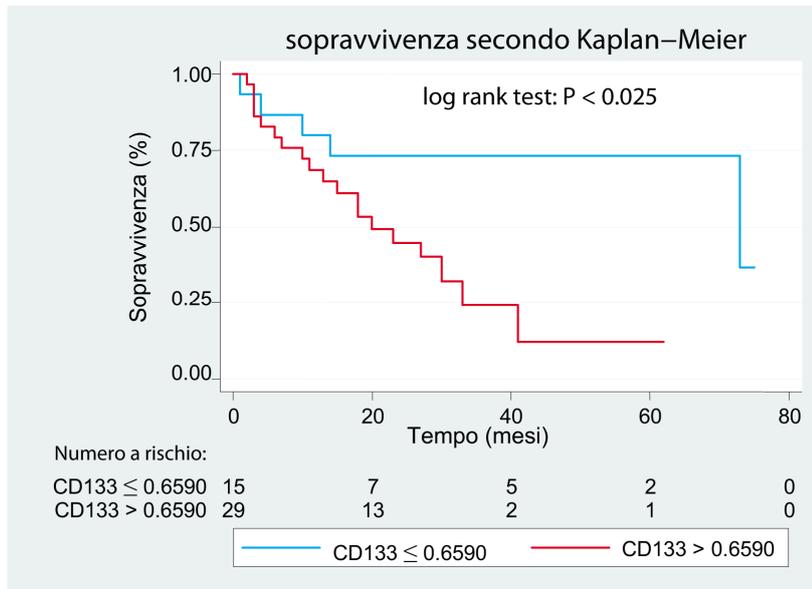


Figura 25: curve di sopravvivenza dei pazienti con metastasi epatiche da CRC nel sottogruppo con livello di espressione dell'mRNA di $CD133 \leq 0.6590$ vs. $CD133 > 0.6590$ secondo Kaplan-Meier (log-rank test $P < 0.025$).

	UNIVARIATA			MULTIVARIATA		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Sesso	0.726	0.351-1.502	0.388	-	-	-
Età	0.986	0.960-1.013	0.300	-	-	-
Radicalità	5.231	2.3844-11.4741	0.000*	6.027	2.556-14.207	0.000*
CK19	1.000	1.000-1.001	0.000*	-	-	-
CK20	0.825	0.418-1.627	0.579	-	-	-
CEA	1.013	0.9189-1.1159	0.799	-	-	-
CD133	1.222	1.071-1.395	0.003*	1.218	1.098-1.350	0.000*
VEGF	1.001	0.999-1.003	0.116	-	-	-
EGFR	0.692	0.303-1.579	0.381	-	-	-
Survivin	1.008	1.004-1.012	0.000*	-	-	-

Tabella 19: risultati dell'analisi univariata e multivariata di sopravvivenza nei pazienti con metastasi epatiche da CRC. (*) indica le variabili risultate significative. HR: hazard ratio; CI: intervallo di confidenza.

All'analisi univariata di sopravvivenza mediante il modello di regressione di Cox, sono state inglobate come variabili l'età, il sesso, la radicalità ed i livelli trascrizionali dei sette geni di interesse. I risultati sono riportati in *tabella 19*. Le variabili statisticamente significative sono risultate la radicalità (P=0.000) ed i livelli trascrizionali dei geni CK19 (P=0.000), Survivin (P=0.000) e CD133 (P=0.003). All'analisi multivariata sono state considerate come variabili indipendenti la radicalità e i livelli trascrizionali di CD133, CK19 e Survivin: solo la radicalità (P=0.000) e l'espressione di CD133 (P=0.000) correlano in modo statisticamente significativo con la prognosi dei pazienti (*tabella 19*). Per variazioni unitarie del valore di CD133, il rischio di decesso aumenta del 22%, mentre i pazienti sottoposti a un intervento non radicale hanno un rischio di decesso sei volte maggiore rispetto ai pazienti sottoposti a intervento radicale. È stata effettuata l'analisi di sopravvivenza univariata separando i pazienti trattati in modo radicale dai non radicali.

	UNIVARIATA (R0)			UNIVARIATA (R1-R2)		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Sesso	0.95	0.27 - 3.25	0.928	0.65	0.26 - 1.62	0.357
Età	0.95	0.89 - 0.99	0.048*	1.02	0.98 - 1.05	0.367
CK19	0.99	0.97 - 1.01	0.121	1.00	0.99 - 1.01	0.268
CK20	0.76	0.33 - 1.74	0.521	0.85	0.33 - 2.18	0.737
CEA	1.10	0.93 - 1.29	0.251	1.37	0.717 - 2.63	0.339
CD133	1.37	1.09 - 1.71	0.007*	1.15	1.02 - 1.30	0.020*
VEGF	0.37	0.08 - 1.75	0.212	1.00	0.99 - 1.01	0.283
EGFR	0.21	0.01 - 8.92	0.414	1.43	0.25 - 8.34	0.691
Survivin	1.13	1.05 - 1.22	0.001*	1.01	0.99 - 1.01	0.262

Tabella 20: risultati dell'analisi univariata nei pazienti con metastasi epatiche da CRC sottoposti ad intervento di resezione radicale (R0) e non radicale (R1-R2). (*) indica le variabili risultate significative. HR: hazard ratio; CI: intervallo di confidenza.

Prendendo in considerazione solo i pazienti sottoposti a intervento R0, l'età (P=0.048), i livelli trascrizionali di CD133 (P=0.007) e Survivin (P=0.001) risultano associati alla sopravvivenza in modo statisticamente significativo (*tabella 20*). Nei pazienti sottoposti a un intervento resettivo non radicale (R1-

R2), solo i livelli trascrizionali di CD133 ($P=0.02$) sono risultati associati alla sopravvivenza in modo statisticamente significativo (*tabella 20*). L'analisi multivariata non è stata svolta a causa del limite numerico.

È stato poi utilizzato il metodo statistico del Prognostic Index, un predittore lineare che ha combinato le due variabili radicalità dell'intervento e livelli di espressione del marcatore CD133 per ogni paziente, ottenendo un valore numerico continuo di PI per ogni soggetto. È stato possibile suddividere i valori dei PI in tre gruppi (suddivisione in base ai terzili), denominati categoria 0, categoria 1 e categoria 2, con livelli di rischio crescente dalla zero alla due. Si sono costruite le curve di sopravvivenza per ognuno di questi gruppi (*figura 26*), ed il confronto mediante log-rank test ha dimostrato una elevata significatività ($P<0.0001$).

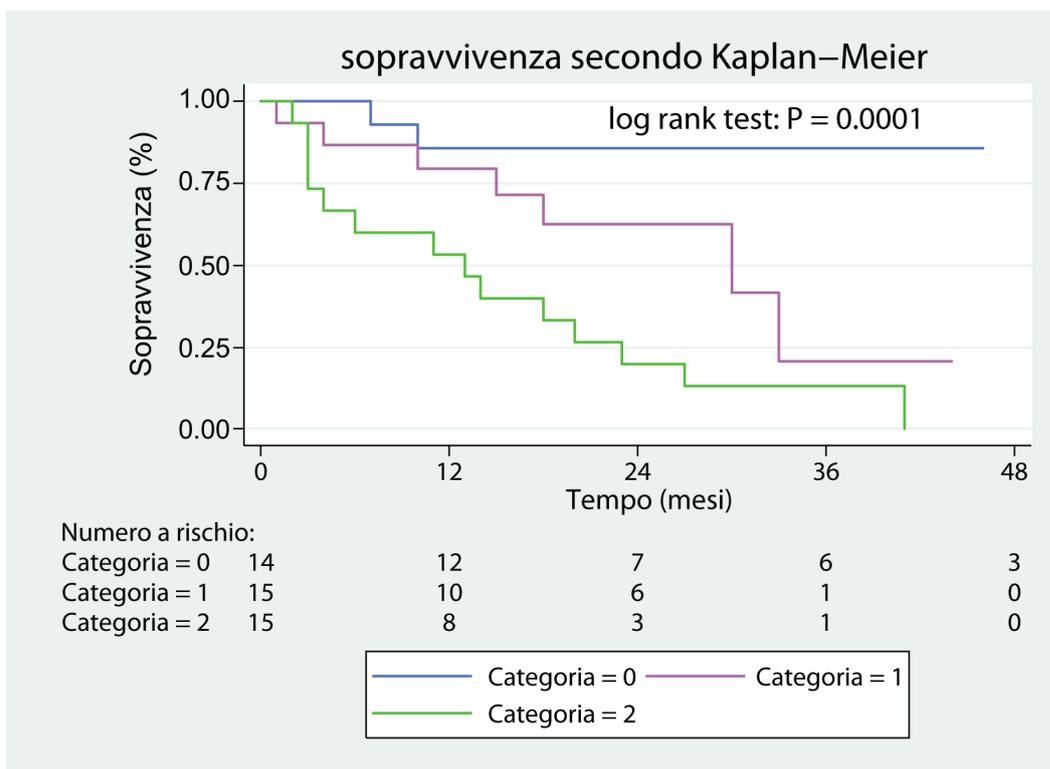


Figura 26: confronto tra le curve di sopravvivenza secondo Kaplan-Meier (log-rank test $P<0.0001$) dei pazienti con metastasi epatiche da CRC categorizzati mediante il predittore lineare Prognostic Index.

6.2.4. Analisi dell'espressione di CD133

Per valutare la specificità del marcatore CD133 verso le cellule tumorali metastatiche se ne è confrontata l'espressione nel controllo positivo utilizzato nell'analisi dei cDNA dei pazienti verso una serie di campioni rappresentativi della condizione normale non neoplastica (fibroblasti umani, cellule epiteliali, PBMC), e verso un tumore primitivo del colon (*figura 27*).

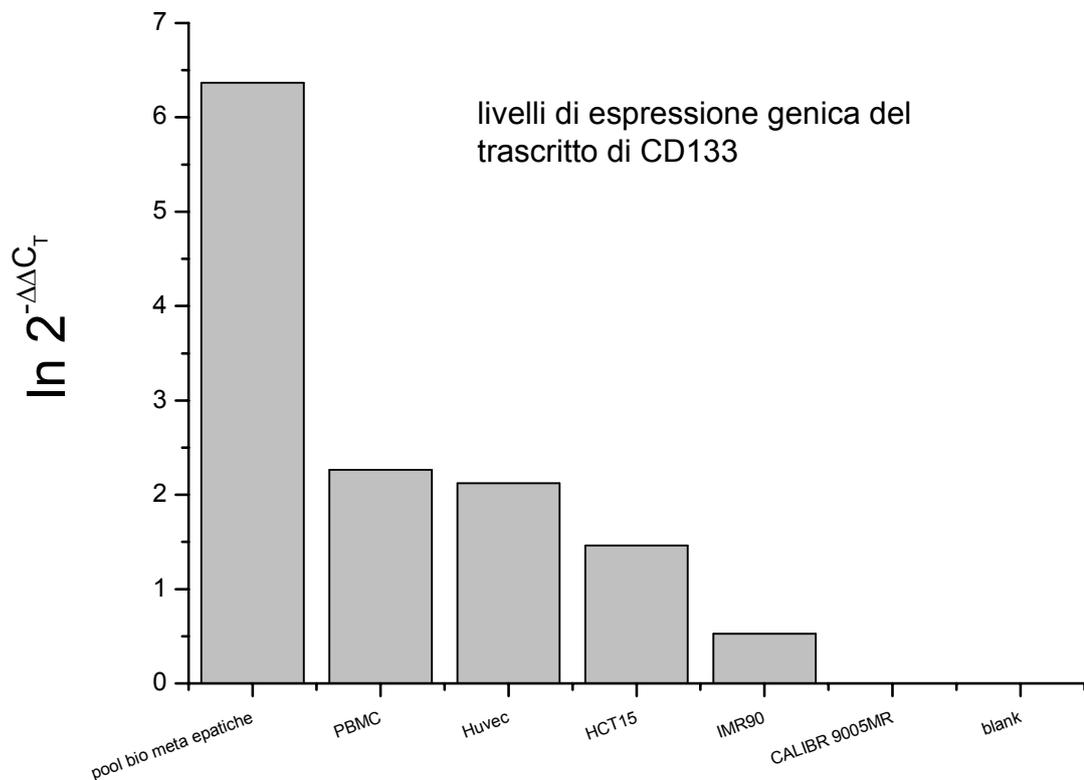


Figura 27: valutazione dei livelli trascrizionali del marcatore CD133, espressi come logaritmo naturale dei livelli di espressione rispetto al calibratore. pool bio meta epatiche: pool di cDNA ottenuto da biopsie di metastasi epatiche da CRC; PBMC: pool di PBMC estratti dal sangue periferico di donatori sani; Huvec: pool di linee cellulari umane di origine endoteliale; HCT15: linea cellulare umana di tumore primitivo del colon; IMR90: linea cellulare di fibroblasti umani; CALIBR 9005MR: paziente utilizzato come calibratore in questa e nell'analisi di quantificazione relativa dei pazienti; blank: controllo negativo.

Dall'analisi si nota che CD133 è un marcatore altamente specifico verso le cellule tumorali, dato che viene espresso in modo molto elevato nel pool di biopsie da metastasi epatiche coloretali (581 volte il calibratore). Inoltre tale specificità è

diretta verso la condizione metastatica, poiché nel tumore primitivo (ovvero la linea cellulare HCT15), il CD133 è espresso nello stesso ordine di grandezza dei controlli normali, ossia 4.31 volte il calibratore. I livelli di espressione di CD133 nelle Huvec (8.35 volte il calibratore) sono paragonabili a quelli nei PBMC (9.62 volte). Nell'ultimo controllo normale considerato, la linea di fibroblasti IMR90, l'espressione è inferiore (1.69 volte il calibratore).

7. Discussione

Il lavoro del dottorato di ricerca ha coinvolto una casistica di pazienti con patologie tumorali del tratto gastrointestinale, in particolare con cancro gastrico primitivo e con metastasi epatiche da cancro del colon retto, due patologie sulle quali si concentra l'attività di ricerca della Clinica Chirurgica Seconda. Lo scopo del lavoro è stata la ricerca di nuovi fattori prognostici che permettano di stratificare meglio i pazienti dopo intervento chirurgico e quindi individuare quei casi che necessitano di terapia dopo la chirurgia (terapia adiuvante). Per fare ciò, ci siamo concentrati sull'analisi delle cellule tumorali circolanti, ossia una sottopopolazione del tumore che si stacca dalla massa principale e viaggia nel torrente circolatorio. Tali cellule hanno un certo potenziale metastatico (vedi parte introduttiva) e quindi la loro presenza rappresenta un fattore prognostico negativo per il paziente. Ci siamo avvalsi della tecnica di RT-qrtPCR per analizzare una serie di marcatori espressi dalle cellule tumorali epiteliali eventualmente presenti nel sangue periferico dei pazienti, andandone così a determinare il profilo di espressione genica.

Nella prima parte il lavoro si è concentrato sull'analisi di quattro marcatori (CEA, CK19, VEGF e Survivin) in una casistica di pazienti con cancro gastrico istologicamente provato, operati con intento radicale presso il nostro istituto. È stato trovato che, assieme alla stadiazione TNM, tra i quattro geni considerati solo i livelli trascrizionali di Survivin correlano in modo indipendente con l'overall survival dei pazienti. Se questo dato fosse validato in più ampi studi prospettici, verrebbe aumentato il potere prognostico dei fattori convenzionali, attualmente rappresentati dalla sola stadiazione TNM. Questo è di particolare interesse per quei pazienti negli stadi TNM di malattia dall'I al III, in cui una buona stratificazione del rischio è essenziale per individuare i soggetti che necessitano veramente della terapia adiuvante, ossia quelli per cui l'applicazione della terapia porterebbe un reale beneficio. La nostra evidenza è interessante anche dal punto di vista biologico, poiché il gene di Survivin codifica per una proteina anti apoptotica chiave appartenente alla famiglia delle IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein). Oltre ad essere uno dei fattori anti apoptotici meglio caratterizzati [214], Survivin è oggetto di intensi studi perché negli adulti è virtualmente espressa solo

dai tumori e la sua espressione è correlata con una prognosi peggiore e resistenza alla chemioterapia convenzionale [215]. Queste osservazioni fanno di Survivin un bersaglio ideale per le terapie specifiche verso il tumore, come ad esempio gli small molecule inhibitors e l'immunoterapia antigene-specifica [216]. Investigando l'espressione della proteina nei tumori primitivi, tra cui il carcinoma gastrico, si è visto che livelli alti correlano con una prognosi peggiore [217]. Dal punto di vista trascrizionale, l'espressione di Survivin come marcatore di CTC è stata investigata in diversi tipi di tumore, ma i dati disponibili sono scarsi [218-220]. In un lavoro del 2008 che ha analizzato l'espressione dell'mRNA di Survivin in una serie di 26 pazienti con adenocarcinoma gastrico mediante la tecnica qrtPCR-ELISA, all'analisi multivariata è risultata significativa la correlazione con la prognosi dei pazienti, nonostante il parametro TNM fosse escluso e forzando così tutte le variabili nel modello di Cox [221]. Nella nostra casistica più ampia (n=70) oltre ad essere confermato il ruolo prognostico di Survivin, la stadiazione TNM rimane un parametro significativo nel modello finale, utilizzando il metodo stepwise per la selezione delle variabili. I nostri dati sono confermati anche in un recente lavoro del 2010, dove Cao e collaboratori hanno dimostrato mediante qrtPCR-ELISA, su una casistica con numerosità simile alla nostra (n=98), che il numero di copie dell'mRNA di Survivin ed il parametro TNM sono predittori indipendenti del tempo di sopravvivenza libero da malattia [220]. Nonostante l'associazione significativa di Survivin con la prognosi dei pazienti, i livelli dell'mRNA non crescono in modo uniforme attraverso i quattro stadi TNM. Infatti vi è un aumento di espressione negli stadi dall'I al III, per poi calare nel IV (*figura 17*). Questo potrebbe dipendere dal basso potere statistico del modello, dovuto alla scarsa numerosità per ogni stadio, pur essendo il trend significativo (P=0.04). Se invece consideriamo l'andamento da un punto di vista biologico si potrebbe dedurre che Survivin gioca un ruolo locoregionale e non nella malattia metastatica a distanza, in cui altri geni potrebbero essere più rilevanti [222]. A differenza di altri studi [156, 223-228] nel nostro lavoro i livelli trascrizionali di CK19 e CEA non correlano con la sopravvivenza dei pazienti né all'analisi univariata (dato non riportato) né tantomeno all'analisi multivariata. Anche i livelli del'mRNA di VEGF non sono significativamente associati all'OS dei pazienti, sebbene in altri studi i livelli proteici nel siero di VEGF-A, -C, e -D e

dei loro recettori, VEGFR-1 and -2 abbiano valore prognostico [229]. Tale mancata correlazione potrebbe dipendere da diversi fattori. Innanzitutto l'inclusione nelle nostre analisi multivariate (con un metodo stepwise di selezione delle variabili) di un marcatore non considerato da altri Autori rende ogni eventuale confronto non effettuabile. Inoltre alcuni lavori che riportano correlazioni positive utilizzano solamente analisi univariate di sopravvivenza, che pregiudicano la veridicità e riproducibilità dei risultati, una volta che sono implementati aggiustamenti per fattori prognostici ben stabiliti come ad esempio la stadiazione TNM [156, 226, 230-231]. In linea con i nostri risultati, anche altri ricercatori riportano la mancata associazione tra la positività alla presenza di citocheratine e la prognosi [232] (*tabella 21*).

Autore	Anno	Ref.	Pazienti (numero)	Metodo di analisi	Analisi di sopravvivenza	Marcatori	Risultati
Cao W et. al.	2010	[220]	98	RT-PCR ELISA	Multivariata	Survivin	L'mRNA di Survivin correla in modo indipendente con la prognosi
Qiu MZ et. al.	2010	[228]	123	RT-qrtPCR	Multivariata	CEA	Il numero di copie di mRNA di CEA misurato alla diagnosi correla con la sopravvivenza
Matusaka et. al.	2010	[233]	52	Isolamento immunomagnetico	Univariata	-	La conta delle CTC correla con la risposta al trattamento
Bertazza et. al. (nostro lavoro)	2009	[234]	70	RT-qrtPCR	Multivariata	CK19, CEA, VEGF, Survivin	L'mRNA di Survivin è un fattore prognostico indipendente
Koga T et. al.	2008	[156]	101	RT-qrtPCR	Univariata	CK18, CK19, CK20, CEA	CK19 è il marcatore migliore ed è utilizzabile per stimare la prognosi o il trattamento adiuvante

Tabella 21: selezione di lavori che analizzano il ruolo prognostico delle CTC in pazienti con cancro gastrico.

Autore	Anno	Ref.	Pazienti (numero)	Metodo di analisi	Analisi di sopravvivenza	Marcatore	Risultati
Yie SM et. al.	2008	[221]	26 (cancro gastrico)	RT-PCR ELISA	Multivariata	Survivin	Lo stato di CTC esprimente Survivin è un predittore di recidiva forte ed indipendente
Mimori K et. al.	2008	[231]	810	RT-qrtPCR	Univariata	MT1-MMP	MT1-MMP è un fattore indipendente per la determinazione della recidiva e di metastasi a distanza
Hiraiwa K et. al.	2008	[223]	44 (cancro gastrico)	CellSearch system	Multivariata	CD45 (-) cells vs CK (+) cells	Le CTC correlano significativamente con lo stadio avanzato del tumore
Pituch-Noworolska A et. al.	2007	[232]	57	Flow cytometry	Univariata	CD45 (-) cells vs CK (+) cells	La presenza di cellule CK (+) non ha valore prognostico
Wu CH et. al.	2006	[227]	42	RT-qrtPCR	Non effettuata	hTERT, CK19, CK20, CEA	L'mRNA di CEA è correlate con un più alto rischio di recidiva post-operatoria/metastasi
Uen YH et. al.	2006	[230]	52	RT-qrtPCR	Univariata	C-MET, MUC1	Gli mRNA di c-Met e MUC1 correlano significativamente con la prognosi
Illert B et. al.	2005	[224]	70	RT-qrtPCR	Multivariata	CK20	CK20 è un marcatore prognostico indipendente
Seo JH et. al.	2005	[226]	46	RT-qrtPCR	Not performed	CEA	L'mRNA di CEA è significativamente correlate con la recidiva clinica
Yeh KH et. al.	1998	[225]	34	Nested quantitative RT-PCR	Univariate	CK19	Le CTC esprimenti CK19 sono associate con una prognosi sfavorevole

Tabella 21 (segue): selezione di lavori che analizzano il ruolo prognostico delle CTC in pazienti con cancro gastrico.

Questi dati contrastanti potrebbero dipendere dal fatto che CK19 e CEA sono marcatori di presenza e non indicano quindi la capacità delle CTC di metastatizzare: è infatti ben noto che solamente un sottogruppo di CTC ha la capacità di dare origine ad un deposito metastatico, mentre la maggior parte di esse muoiono senza risultare dannose per l'ospite [235]. Dato ciò, marcatori di "aggressività" come Survivin si potrebbero rivelare più informativi in termini di

correlazione con la prognosi dei pazienti. È interessante notare come dallo studio sia emerso che l'abbondanza degli mRNA di Survivin e CK19 fosse sempre maggiore rispetto al pool di controlli sani utilizzati come calibratore (*figure 13 e 14*), tranne in uno e due casi, rispettivamente. Ciò sottolinea l'importanza di utilizzare un metodo quantitativo che permetta di stratificare il rischio dei pazienti in una scala continua. Inoltre il dato, se confermato, è anche di forte interesse clinico visto che la positività dell'espressione di Survivin potrebbe avere una valenza diagnostica. Ciò sarebbe di particolare interesse per quei pazienti nei primi stadi della malattia, in cui con un semplice e poco invasivo prelievo di sangue periferico, sarebbe possibile evidenziare la presenza della neoplasia.

Nella seconda parte del lavoro si sono analizzati gli mRNA di sette marcatori (CEA, CK19, CK20, VEGF, EGFR, CD133 e Survivin) nel sangue periferico di pazienti con metastasi epatiche da cancro del colon retto. Dall'analisi dei dati ottenuti è risultato che l'espressione del marcatore CD133 è un fattore prognostico indipendente dai fattori convenzionali, che permette di individuare i pazienti ad elevato rischio di decesso. Anche in questo caso lo studio è stato condotto su una casistica di pazienti (n=50) con la tecnica della RT-qrtPCR mediante l'utilizzo del metodo relativo. Dato che lo scopo del lavoro era la validazione delle cellule tumorali circolanti come fattore prognostico all'interno del gruppo di pazienti con CRC metastatico, è stato possibile scegliere uno dei pazienti come riferimento (calibratore) per lo studio. Nell'analisi delle CTC nei pazienti con cancro gastrico, invece, il calibratore era rappresentato da un pool di 20 controlli sani. I risultati dell'analisi univariata hanno visto confermare Survivin come marcatore correlato alla prognosi. A questo si sono aggiunti la radicalità, i livelli di espressione della CK19, un marcatore di presenza delle CTC, ed il CD133, considerato un marcatore di cellule staminali tumorali [195]. Andando ad effettuare l'analisi multivariata con il metodo stepwise, il modello ha trattenuto le covariate radicalità ed espressione di CD133. Il fatto che la radicalità correli con la sopravvivenza anche nei nostri pazienti conferma i dati di letteratura [94]. La covariata Survivin, significativa all'analisi univariata, è risultata esclusa poiché non aggiunge potere prognostico al modello multivariato in modo indipendente. Ciò può risultare in accordo con i risultati ottenuti dallo studio dei pazienti con cancro gastrico. Infatti nel sottogruppo dei pazienti con malattia metastatica

l'espressione del marcatore diminuisce, come se l'espressione di Survivin fosse biologicamente meno importante rispetto agli stadi dall'I al III (*figura 17*). Il parametro radicalità invece, giustamente correla con la prognosi dei pazienti. I pazienti resecati in modo non radicale hanno una prognosi molto peggiore rispetto agli R0, come evidenziato dalle curve di sopravvivenza in *figura 24*. Il fatto che il modello abbia trattenuto con un'elevata significatività ($P=0.000$) il trascritto per CD133 è un dato di forte interesse. L'espressione del CD133 rimane significativamente correlata con la prognosi anche andando ad effettuare l'analisi di sopravvivenza univariata nei sottogruppi dei pazienti R0 ed R1-R2. Nonostante la sua funzione biologica non sia ancora nota, il CD133 è utilizzato come marcatore di cellule staminali per tessuti normali e tumorali. Da solo, o in combinazione con altri markers, è utilizzato per l'isolamento delle cellule staminali da diversi tessuti. In studi recenti i ricercatori hanno utilizzato anticorpi monoclonali diretti verso CD133 per isolare la popolazione putativa di cellule staminali tumorali (CSCs) da tumori maligni di diverso tipo tra cui CRC. Già nel 2007 Lin e collaboratori dimostrarono che elevati livelli dell'mRNA di CD133 erano predittivi del rischio di recidiva in pazienti con CRC [236]. Lo stesso anno Ricci-Vitiani e collaboratori concludevano che il cancro del colon retto originava e si propagava a partire da un piccolo numero di cellule tumorigeniche indifferenziate CD133(+) [199]. L'anno seguente però Shmelkov e collaboratori dimostravano come l'espressione di CD133 non fosse ristretta alle cellule staminali, e sia le cellule CD133(+) che le cellule CD133(-) di CRC metastatico erano in grado di dare origine al tumore [237]. Alla luce di questi dati, il concetto di CD133 come marcatore di cellule staminali tumorali nel CRC dovrebbe forse essere rivisto, come discusso da Labarge e collaboratori [238]. Il nostro risultato, pur ottenuto da uno studio monocentrico e in una casistica numericamente limitata, supporta comunque l'ipotesi che il profilo di espressione genica possa avere un ruolo nella determinazione della prognosi e nella gestione terapeutica dei pazienti. Dai nostri dati, abbiamo potuto constatare come tale marcatore abbia un'elevata specificità nei confronti delle cellule tumorali metastatiche da CRC, dato che l'espressione di CD133 in una linea tumorale di adenocarcinoma del colon primitivo, è paragonabile ai controlli non neoplastici (*figura 27*). Quindi la sua espressione può verosimilmente essere correlata alla presenza di cellule

tumorali circolanti nel sangue periferico dei pazienti. Considerando che lo scopo della tesi di dottorato era la ricerca di nuovi fattori prognostici per meglio stratificare il rischio dei pazienti, attraverso lo strumento statistico del Prognostic Index abbiamo combinato le variabili radicalità ed espressione del trascritto di CD133, ottenendo per ogni paziente un valore di PI. Questa nuova variabile è stata suddivisa in terzili, e con le tre categorie ottenute sono state create le curve di sopravvivenza secondo Kaplan-Meier. Il confronto tra le curve è risultato altamente significativo (log-rank test $P=0.0001$, *figura 26*) e questo ci ha permesso di suddividere la coorte dei pazienti in tre gruppi prognostici, mentre con il solo parametro radicalità se ne potevano identificare solamente due (*figura 24*).

I risultati ottenuti dal lavoro di dottorato sono interessanti, poiché hanno messo in luce che i livelli dei trascritti di Survivin e CD133 rappresentano dei marcatori di potenziale utilità clinica in due patologie molto diverse tra loro, ossia rispettivamente il cancro gastrico e le metastasi epatiche da cancro coloretale. Se il valore prognostico dei due marcatori venisse confermato da studi multicentrici e su casistiche indipendenti di maggiori dimensioni, il profilo di espressione genica del sangue periferico potrebbe essere utilizzato per identificare i pazienti con prognosi negativa dopo trattamento apparentemente radicale, che quindi potrebbero beneficiare di una terapia adiuvante.

Questi risultati potrebbero aprire la strada anche ad un discorso di tipo terapeutico, poiché l'inibizione dei trascritti di Survivin e CD133 (con conseguente diminuzione dei livelli delle corrispondenti proteine) potrebbe avere un potenziale curativo, magari in sinergia con la radio- e chemioterapia convenzionali.

Come considerazione finale bisogna ricordare che i metodi basati su PCR non permettono di identificare la fonte cellulare dei marcatori misurati. Tutte queste metodiche richiedono infatti la lisi del materiale di partenza al fine di permettere l'estrazione dell'mRNA utilizzato nelle analisi di espressione genica. Da questo punto di vista i metodi citometrici sono meno soggetti a risultati falsi positivi. Comunque, se gli studi sono ben disegnati, i metodi basati su PCR sono dotati oltre che di un'elevata sensibilità anche di un'elevata specificità.

8. Bibliografia

1. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2005. **55**(2): p. 74-108.
2. Ferlay, J., *GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0*. IARC Press, 2001.
3. Haenszel, W. and M. Kurihara, *Studies of Japanese migrants. I. Mortality from cancer and other diseases among Japanese in the United States*. J Natl Cancer Inst, 1968. **40**(1): p. 43-68.
4. Sipponen, P., et al., *Fall in the prevalence of chronic gastritis over 15 years: analysis of outpatient series in Finland from 1977, 1985, and 1992*. Gut, 1994. **35**(9): p. 1167-71.
5. Sipponen, P., *Helicobacter pylori: a cohort phenomenon*. Am J Surg Pathol, 1995. **19 Suppl 1**: p. S30-6.
6. Ohata, H., et al., *Progression of chronic atrophic gastritis associated with Helicobacter pylori infection increases risk of gastric cancer*. Int J Cancer, 2004. **109**(1): p. 138-43.
7. Fukuda, H., et al., *Helicobacter pylori infection, serum pepsinogen level and gastric cancer: a case-control study in Japan*. Jpn J Cancer Res, 1995. **86**(1): p. 64-71.
8. Huang, X.E., et al., *Effects of dietary, drinking, and smoking habits on the prognosis of gastric cancer*. Nutr Cancer, 2000. **38**(1): p. 30-6.
9. Ramon, J.M., et al., *Dietary factors and gastric cancer risk. A case-control study in Spain*. Cancer, 1993. **71**(5): p. 1731-5.
10. Parsonnet, J., et al., *Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma*. N Engl J Med, 1991. **325**(16): p. 1127-31.
11. Park, D.I., et al., *Risk factors suggesting malignant transformation of gastric adenoma: univariate and multivariate analysis*. Endoscopy, 2001. **33**(6): p. 501-6.
12. Alberts, S.R., A. Cervantes, and C.J. van de Velde, *Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment*. Ann Oncol, 2003. **14 Suppl 2**: p. ii31-6.
13. Chun, Y.S., et al., *Germline E-cadherin gene mutations: is prophylactic total gastrectomy indicated?* Cancer, 2001. **92**(1): p. 181-7.
14. *Helicobacter pylori in peptic ulcer disease*. NIH Consens Statement, 1994. **12**(1): p. 1-23.
15. 2010; Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/gastric/HealthProfessional/>.
16. Meyer, H.J. and J. Jahne, *Lymph node dissection for gastric cancer*. Semin Surg Oncol, 1999. **17**(2): p. 117-24.
17. Wu, C.W., et al., *Nodal dissection for patients with gastric cancer: a randomised controlled trial*. Lancet Oncol, 2006. **7**(4): p. 309-15.
18. Bonenkamp, J.J., et al., *Randomised comparison of morbidity after D1 and D2 dissection for gastric cancer in 996 Dutch patients*. Lancet, 1995. **345**(8952): p. 745-8.
19. Bonenkamp, J.J., et al., *Extended lymph-node dissection for gastric cancer*. N Engl J Med, 1999. **340**(12): p. 908-14.

20. Cuschieri, A., et al., *Patient survival after D1 and D2 resections for gastric cancer: long-term results of the MRC randomized surgical trial. Surgical Co-operative Group.* Br J Cancer, 1999. **79**(9-10): p. 1522-30.
21. Cuschieri, A., et al., *Postoperative morbidity and mortality after D1 and D2 resections for gastric cancer: preliminary results of the MRC randomised controlled surgical trial. The Surgical Cooperative Group.* Lancet, 1996. **347**(9007): p. 995-9.
22. Bozzetti, F., et al., *Total versus subtotal gastrectomy: surgical morbidity and mortality rates in a multicenter Italian randomized trial. The Italian Gastrointestinal Tumor Study Group.* Ann Surg, 1997. **226**(5): p. 613-20.
23. Bozzetti, F., et al., *Subtotal versus total gastrectomy for gastric cancer: five-year survival rates in a multicenter randomized Italian trial. Italian Gastrointestinal Tumor Study Group.* Ann Surg, 1999. **230**(2): p. 170-8.
24. Hundahl, S.A., J.L. Phillips, and H.R. Menck, *The National Cancer Data Base Report on poor survival of U.S. gastric carcinoma patients treated with gastrectomy: Fifth Edition American Joint Committee on Cancer staging, proximal disease, and the "different disease" hypothesis.* Cancer, 2000. **88**(4): p. 921-32.
25. Glimelius, B., et al., *Randomized comparison between chemotherapy plus best supportive care with best supportive care in advanced gastric cancer.* Ann Oncol, 1997. **8**(2): p. 163-8.
26. Waters, J.S., et al., *Long-term survival after epirubicin, cisplatin and fluorouracil for gastric cancer: results of a randomized trial.* Br J Cancer, 1999. **80**(1-2): p. 269-72.
27. Sayegh, M., *Gastric Carcinoma.* Surgery (Oxford), 2002. **20**(10): p. 236-240.
28. Macdonald, J.S., et al., *Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction.* N Engl J Med, 2001. **345**(10): p. 725-30.
29. Janunger, K.G., L. Hafstrom, and B. Glimelius, *Chemotherapy in gastric cancer: a review and updated meta-analysis.* Eur J Surg, 2002. **168**(11): p. 597-608.
30. Foukakis, T., et al., *Advances in the treatment of patients with gastric adenocarcinoma.* Acta Oncol, 2007. **46**(3): p. 277-85.
31. Dicken, B.J., et al., *Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions.* Ann Surg, 2005. **241**(1): p. 27-39.
32. Inoue, M. and S. Tsugane, *Epidemiology of gastric cancer in Japan.* Postgrad Med J, 2005. **81**(957): p. 419-24.
33. Hermanek, P. and C. Wittekind, *News of TNM and its use for classification of gastric cancer.* World J Surg, 1995. **19**(4): p. 491-5.
34. Gabbert, H.E., *Prospective prognostic factors in gastric cancer.*, in *Update in gastric surgery.*, H.D. Roher, Editor. 1994, Stuttgart: Georg Thieme. p. 76-82.
35. Hermanek, P., *Gastric cancer.*, in *Prognostic factors in cancer.*, P. Hermanek, Editor. 1995, Geneve: International Union Against Cancer (UICC).
36. AJCC, *AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed.* 6 ed. 2002, New York: Springer.

37. Roder, J.D., et al., *Prognostic factors in gastric carcinoma. Results of the German Gastric Carcinoma Study 1992*. *Cancer*, 1993. **72**(7): p. 2089-97.
38. Layke, J.C. and P.P. Lopez, *Gastric cancer: diagnosis and treatment options*. *Am Fam Physician*, 2004. **69**(5): p. 1133-40.
39. Marchet, A., et al., *The ratio between metastatic and examined lymph nodes (N ratio) is an independent prognostic factor in gastric cancer regardless of the type of lymphadenectomy: results from an Italian multicentric study in 1853 patients*. *Ann Surg*, 2007. **245**(4): p. 543-52.
40. Siewert, J.R., et al., *Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study*. *Ann Surg*, 1998. **228**(4): p. 449-61.
41. Kinoshita, T., *Treatment results of gastric cancer patients: Japanese experience.*, in *Gastric cancer.*, M. Nishi, Editor. 1993, Springer Verlag: Tokyo. p. 319-330.
42. Parkin, D.M. and C.S. Muir, *Cancer Incidence in Five Continents. Comparability and quality of data*. *IARC Sci Publ*, 1992(120): p. 45-173.
43. Nomura, A., *Stomach cancer.*, in *Cancer Epidemiology and Prevention, 2nd edition.*, D. Schottenfeld, Editor. 1996, Oxford University Press: New York. p. 707-724.
44. Correa, P., *Gastric cancer.*, in *Trends in Cancer Incidence and Mortality.*, R. Doll, Editor. 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY. p. 55-76.
45. Blot, W.J., et al., *Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia*. *JAMA*, 1991. **265**(10): p. 1287-9.
46. Rohde, H., et al., *Proximal compared with distal adenocarcinoma of the stomach: differences and consequences. German Gastric Cancer TNM Study Group*. *Br J Surg*, 1991. **78**(10): p. 1242-8.
47. Stipa, S., A. Di Giorgio, and M. Ferri, *Surgical treatment of adenocarcinoma of the cardia*. *Surgery*, 1992. **111**(4): p. 386-93.
48. Nakane, Y., et al., *Prognostic differences of adenocarcinoma arising from the cardia and the upper third of the stomach*. *Am Surg*, 1993. **59**(7): p. 423-9.
49. Kikuchi, S., et al., *Tumor volume: a novel prognostic factor in patients who undergo curative resection for gastric cancer*. *Langenbecks Arch Surg*, 2000. **385**(3): p. 225-8.
50. Krieken, J.H.v., *Gastric cancer.*, in *Prognostic factors in cancer.*, M.K. Gospodarowicz, Editor. 2001, Wiley-Liss: New York. p. 251-265
51. Siewert, J.R., et al., *Gastric Cancer*. *Curr Probl Surg*, 1997. **34**(11): p. 835-939.
52. Matsui, K., et al., *Small cell carcinoma of the stomach: a clinicopathologic study of 17 cases*. *Am J Gastroenterol*, 1991. **86**(9): p. 1167-75.
53. Buttcher, K., *Prognosefaktoren beim Magencarcinom. Ergebnisse einer uni- und multivariaten Analyse*. *Chirurg* 1992. **63**: p. 656-661.
54. Gabbert, H.E., *Tumor-cell dissociation at the invasive front: a new prognostic parameter in gastric cancer patients*. *Int J Cancer*, 1991 **50**: p. 202-207.

55. Bunt, A.M., et al., *Lymph node staging standards in gastric cancer*. J Clin Oncol, 1995. **13**(9): p. 2309-16.
56. Moriguchi, S., et al., *Relationship between age and the time of surgery and prognosis after gastrectomy for gastric cancer*. J Surg Oncol, 1993. **52**(2): p. 119-23.
57. Lo, S.S., et al., *Poorer prognosis in young patients with gastric cancer?* Hepatogastroenterology, 1999. **46**(28): p. 2690-3.
58. Maguire, A., et al., *Sex as a prognostic factor in gastric cancer*. Eur J Cancer, 1996. **32A**(8): p. 1303-9.
59. Brttcher, K., *Risiko der chirurgischen therapie des magencarcinoms in Deutschland*. Chirurg, 1994. **65**: p. 298-306.
60. Tachibana, M., et al., *Serum carcinoembryonic antigen as a prognostic factor in resectable gastric cancer*. J Am Coll Surg, 1998. **187**(1): p. 64-8.
61. Nakane, Y., et al., *Correlation of preoperative carcinoembryonic antigen levels and prognosis of gastric cancer patients*. Cancer, 1994. **73**(11): p. 2703-8.
62. Irinoda, T., et al., *Carcinoembryonic antigen level in peritoneal washing is a prognostic factor in patients with gastric cancer*. Oncol Rep, 1998. **5**(3): p. 661-6.
63. Webb, A., et al., *The prognostic value of serum and immunohistochemical tumour markers in advanced gastric cancer*. Eur J Cancer, 1996. **32A**(1): p. 63-8.
64. Maehara, Y., et al., *Predictive value of preoperative carcinoembryonic antigen levels for the prognosis of patients with well-differentiated gastric cancer. A multivariate analysis*. Oncology, 1994. **51**(3): p. 234-7.
65. Onorato, A., *Nonanatomic prognostic factors for gastric cancer patients: significance of tumor markers*, in *Recent advances in management of digestive cancers.*, T. Takahashi, Editor. 1993, Springer: Berlin.
66. Nitti, D., et al., *Recent advances in conventional and molecular prognostic factors for gastric carcinoma*. Surg Oncol Clin N Am, 2008. **17**(3): p. 467-83, vii.
67. Becker, K.F., G. Keller, and H. Hoefler, *The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer*. Surg Oncol, 2000. **9**(1): p. 5-11.
68. Scartozzi, M., et al., *Molecular biology of sporadic gastric cancer: prognostic indicators and novel therapeutic approaches*. Cancer Treat Rev, 2004. **30**(5): p. 451-9.
69. Furlan, D., et al., *Genetic progression in sporadic endometrial and gastrointestinal cancers with high microsatellite instability*. J Pathol, 2002. **197**(5): p. 603-9.
70. Noel, A., M. Jost, and E. Maquoi, *Matrix metalloproteinases at cancer tumor-host interface*. Semin Cell Dev Biol, 2008. **19**(1): p. 52-60.
71. Maeda, K., et al., *Expression of p53 and vascular endothelial growth factor associated with tumor angiogenesis and prognosis in gastric cancer*. Oncology, 1998. **55**(6): p. 594-9.
72. Mingchao, et al., *Loss of E-cadherin expression in gastric intestinal metaplasia and later stage p53 altered expression in gastric carcinogenesis*. Exp Toxicol Pathol, 2001. **53**(4): p. 237-46.

73. Catalano, V., et al., *Gastric cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2005. **54**(3): p. 209-41.
74. Wu, C.W., et al., *Incidence and factors associated with recurrence patterns after intended curative surgery for gastric cancer*. World J Surg, 2003. **27**(2): p. 153-8.
75. Shiraishi, N., et al., *Early and late recurrence after gastrectomy for gastric carcinoma. Univariate and multivariate analyses*. Cancer, 2000. **89**(2): p. 255-61.
76. Lacroix, J. and M.K. Doeberitz, *Technical aspects of minimal residual disease detection in carcinoma patients*. Semin Surg Oncol, 2001. **20**(4): p. 252-64.
77. Yoo, C.H., et al., *Recurrence following curative resection for gastric carcinoma*. Br J Surg, 2000. **87**(2): p. 236-42.
78. Ambiru, S., et al., *Benefits and limits of hepatic resection for gastric metastases*. Am J Surg, 2001. **181**(3): p. 279-83.
79. Saito, A., et al., *Surgical treatment for gastric carcinomas with concomitant hepatic metastasis*. Hepatogastroenterology, 1996. **43**(9): p. 560-4.
80. Bines, S.D., et al., *Synchronous, metachronous, and multiple hepatic resections of liver tumors originating from primary gastric tumors*. Surgery, 1993. **114**(4): p. 799-805; discussion 804-5.
81. Hagggar, F.A. and R.P. Boushey, *Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors*. Clin Colon Rectal Surg, 2009. **22**(4): p. 191-7.
82. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2008*. CA Cancer J Clin, 2008. **58**(2): p. 71-96.
83. Grande, E., et al., *Regional estimates of colorectal cancer burden in Italy*. Tumori, 2007. **93**(4): p. 352-9.
84. van der Voort van Zijp, J., H.J. Hoekstra, and M.D. Basson, *Evolving management of colorectal cancer*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(25): p. 3956-67.
85. Izzo, F., et al., *Management of colorectal liver metastases in patients with peritoneal carcinomatosis*. J Surg Oncol, 2009. **100**(4): p. 345-7.
86. Wolpin, B.M. and R.J. Mayer, *Systemic treatment of colorectal cancer*. Gastroenterology, 2008. **134**(5): p. 1296-310.
87. Meyerhardt, J.A. and R.J. Mayer, *Systemic therapy for colorectal cancer*. N Engl J Med, 2005. **352**(5): p. 476-87.
88. Abdel-Misih, S.R., C.R. Schmidt, and P.M. Bloomston, *Update and review of the multidisciplinary management of stage IV colorectal cancer with liver metastases*. World J Surg Oncol, 2009. **7**: p. 72.
89. Welsh, F.K., et al., *Predictive models in colorectal liver metastases--can we personalize treatment and outcome?* Dig Surg, 2008. **25**(6): p. 406-12.
90. Saif, M.W., *Secondary hepatic resection as a therapeutic goal in advanced colorectal cancer*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(31): p. 3855-64.
91. Sharma, S., C. Camci, and N. Jabbour, *Management of hepatic metastasis from colorectal cancers: an update*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2008. **15**(6): p. 570-80.

92. Scheele, J., et al., *Indicators of prognosis after hepatic resection for colorectal secondaries*. Surgery, 1991. **110**(1): p. 13-29.
93. Scheele, J., et al., *Resection of colorectal liver metastases*. World J Surg, 1995. **19**(1): p. 59-71.
94. Fong, Y., et al., *Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases*. Ann Surg, 1999. **230**(3): p. 309-18; discussion 318-21.
95. Minagawa, M., et al., *Extension of the frontiers of surgical indications in the treatment of liver metastases from colorectal cancer: long-term results*. Ann Surg, 2000. **231**(4): p. 487-99.
96. Choti, M.A., et al., *Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases*. Ann Surg, 2002. **235**(6): p. 759-66.
97. Okano, K., et al., *Fibrous pseudocapsule of metastatic liver tumors from colorectal carcinoma. Clinicopathologic study of 152 first resection cases*. Cancer, 2000. **89**(2): p. 267-75.
98. Abdalla, E.K., et al., *Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases*. Ann Surg, 2004. **239**(6): p. 818-25; discussion 825-7.
99. Fernandez, F.G., et al., *Five-year survival after resection of hepatic metastases from colorectal cancer in patients screened by positron emission tomography with F-18 fluorodeoxyglucose (FDG-PET)*. Ann Surg, 2004. **240**(3): p. 438-47; discussion 447-50.
100. Pawlik, T.M., et al., *Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases*. Ann Surg, 2005. **241**(5): p. 715-22, discussion 722-4.
101. Tanaka, K., et al., *Role of hepatectomy in treating multiple bilobar colorectal cancer metastases*. Surgery, 2008. **143**(2): p. 259-70.
102. Li Destri, G., et al., *Metachronous liver metastases and resectability: Fong's score and laparoscopic evaluation*. HPB (Oxford), 2008. **10**(1): p. 13-7.
103. Tol, J. and C.J. Punt, *Treatment of liver metastases from colorectal cancer*. Neth J Med, 2006. **64**(5): p. 133-5.
104. Tsim, N.C., et al., *Surgical treatment for liver cancer*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(8): p. 927-33.
105. Small, R., N. Lubezky, and M. Ben-Haim, *Current controversies in the surgical management of colorectal cancer metastases to the liver*. Isr Med Assoc J, 2007. **9**(10): p. 742-7.
106. Cummings, L.C., J.D. Payes, and G.S. Cooper, *Survival after hepatic resection in metastatic colorectal cancer: a population-based study*. Cancer, 2007. **109**(4): p. 718-26.
107. Vogl, T.J., et al., *Colorectal liver metastases: regional chemotherapy via transarterial chemoembolization (TACE) and hepatic chemoperfusion: an update*. Eur Radiol, 2007. **17**(4): p. 1025-34.
108. Tol, J., et al., *Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2009. **360**(6): p. 563-72.
109. Adam, R., et al., *Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival*. Ann Surg, 2004. **240**(4): p. 644-57; discussion 657-8.

110. Masi, G., et al., *First-line treatment of metastatic colorectal cancer with irinotecan, oxaliplatin and 5-fluorouracil/leucovorin (FOLFOXIRI): results of a phase II study with a simplified biweekly schedule*. *Ann Oncol*, 2004. **15**(12): p. 1766-72.
111. Adam, R., et al., *Tumor progression while on chemotherapy: a contraindication to liver resection for multiple colorectal metastases?* *Ann Surg*, 2004. **240**(6): p. 1052-61; discussion 1061-4.
112. Allen, P.J., et al., *Importance of response to neoadjuvant chemotherapy in patients undergoing resection of synchronous colorectal liver metastases*. *J Gastrointest Surg*, 2003. **7**(1): p. 109-15; discussion 116-7.
113. Adam, R., et al., *Hepatic resection after rescue cetuximab treatment for colorectal liver metastases previously refractory to conventional systemic therapy*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(29): p. 4593-602.
114. Lugo, T.G., et al., *Detection and measurement of occult disease for the prognosis of solid tumors*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(13): p. 2609-15.
115. Pantel, K. and R.H. Brakenhoff, *Dissecting the metastatic cascade*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(6): p. 448-56.
116. Fidler, I.J., *The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(6): p. 453-8.
117. Ulmer, A., et al., *Immunomagnetic enrichment, genomic characterization, and prognostic impact of circulating melanoma cells*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(2): p. 531-7.
118. Fehm, T., et al., *Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(7): p. 2073-84.
119. Chang, Y.S., et al., *Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(26): p. 14608-13.
120. Meng, S., et al., *Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(24): p. 8152-62.
121. Mehes, G., et al., *Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic*. *Am J Pathol*, 2001. **159**(1): p. 17-20.
122. Hunter, K.W., *Host genetics and tumour metastasis*. *Br J Cancer*, 2004. **90**(4): p. 752-5.
123. Dolken, G., *Detection of minimal residual disease*. *Adv Cancer Res*, 2001. **82**: p. 133-85.
124. Jung, R., et al., *Detection of micrometastasis by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transcription in granulocytes*. *Br J Cancer*, 1999. **81**(5): p. 870-3.
125. Mocellin, S., et al., *Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research*. *Trends Mol Med*, 2003. **9**(5): p. 189-95.
126. Weigelt, B., et al., *Marker genes for circulating tumour cells predict survival in metastasized breast cancer patients*. *Br J Cancer*, 2003. **88**(7): p. 1091-4.
127. Smith, B.M., et al., *Response of circulating tumor cells to systemic therapy in patients with metastatic breast cancer: comparison of quantitative polymerase chain reaction and immunocytochemical techniques*. *J Clin Oncol*, 2000. **18**(7): p. 1432-9.

128. Ashida, S., et al., *Detection of circulating cancer cells with von hippel-lindau gene mutation in peripheral blood of patients with renal cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(10): p. 3817-22.
129. Schleiermacher, G., et al., *Increased risk of systemic relapses associated with bone marrow micrometastasis and circulating tumor cells in localized ewing tumor*. J Clin Oncol, 2003. **21**(1): p. 85-91.
130. Silva, J.M., et al., *Detection of epithelial tumour RNA in the plasma of colon cancer patients is associated with advanced stages and circulating tumour cells*. Gut, 2002. **50**(4): p. 530-4.
131. Witzig, T.E., et al., *Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(5): p. 1085-91.
132. Ring, A., I.E. Smith, and M. Dowsett, *Circulating tumour cells in breast cancer*. Lancet Oncol, 2004. **5**(2): p. 79-88.
133. Allard, W.J., et al., *Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(20): p. 6897-904.
134. Tsao, H., et al., *A meta-analysis of reverse transcriptase-polymerase chain reaction for tyrosinase mRNA as a marker for circulating tumor cells in cutaneous melanoma*. Arch Dermatol, 2001. **137**(3): p. 325-30.
135. Raju, T.N., *The Nobel chronicles. 1975: Renato Dulbecco (b 1914), David Baltimore (b 1938), and Howard Martin Temin (1934-94)*. Lancet, 1999. **354**(9186): p. 1308.
136. Higuchi, R., et al., *Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions*. Biotechnology (N Y), 1993. **11**(9): p. 1026-30.
137. Souaze, F., et al., *Quantitative RT-PCR: limits and accuracy*. Biotechniques, 1996. **21**(2): p. 280-5.
138. Winer, J., et al., *Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro*. Anal Biochem, 1999. **270**(1): p. 41-9.
139. Foss, D.L., M.J. Baarsch, and M.P. Murtaugh, *Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues*. Anim Biotechnol, 1998. **9**(1): p. 67-78.
140. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
141. Krupey, J., et al., *The preparation of purified carcinoembryonic antigen of the human digestive system from large quantities of tumor tissue*. Immunochemistry, 1972. **9**(6): p. 617-22.
142. Hammarstrom, S., et al., *Nature of the tumor-associated determinant(s) of carcinoembryonic antigen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(4): p. 1528-32.
143. Coligan, J.E., et al., *Isolation and characterization of carcinoembryonic antigen*. Immunochemistry, 1972. **9**(4): p. 377-86.
144. Olsen, A., et al., *Gene organization of the pregnancy-specific glycoprotein region on human chromosome 19: assembly and analysis of a 700-kb cosmid contig spanning the region*. Genomics, 1994. **23**(3): p. 659-68.

145. Teglund, S., et al., *The pregnancy-specific glycoprotein (PSG) gene cluster on human chromosome 19: fine structure of the 11 PSG genes and identification of 6 new genes forming a third subgroup within the carcinoembryonic antigen (CEA) family*. Genomics, 1994. **23**(3): p. 669-84.
146. Cubilla, A.L., et al., *Surface adenosquamous carcinoma of the penis. A report of three cases*. Am J Surg Pathol, 1996. **20**(2): p. 156-60.
147. Prall, F., et al., *CD66a (BGP), an adhesion molecule of the carcinoembryonic antigen family, is expressed in epithelium, endothelium, and myeloid cells in a wide range of normal human tissues*. J Histochem Cytochem, 1996. **44**(1): p. 35-41.
148. Nap, M., et al., *Immunohistochemistry of carcino-embryonic antigen in the embryo, fetus and adult*. Tumour Biol, 1988. **9**(2-3): p. 145-53.
149. Nap, M., et al., *Specificity and affinity of monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen*. Cancer Res, 1992. **52**(8): p. 2329-39.
150. Robbins, P.F., et al., *Definition of the expression of the human carcinoembryonic antigen and non-specific cross-reacting antigen in human breast and lung carcinomas*. Int J Cancer, 1993. **53**(6): p. 892-7.
151. Paxton, R.J., et al., *Sequence analysis of carcinoembryonic antigen: identification of glycosylation sites and homology with the immunoglobulin supergene family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(4): p. 920-4.
152. Grimm, T., G. Riethmuller, and J.P. Johnson, *Characteristics of carcinoembryonic antigen (CEA) expressed in different cell types: evidence that CEA can function as an adhesion molecule and as a repulsion molecule*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **204**(3): p. 1225-34.
153. Wirth, T., et al., *Inhibition of endogenous carcinoembryonic antigen (CEA) increases the apoptotic rate of colon cancer cells and inhibits metastatic tumor growth*. Clin Exp Metastasis, 2002. **19**(2): p. 155-60.
154. Hammarstrom, S. and V. Baranov, *Is there a role for CEA in innate immunity in the colon?* Trends Microbiol, 2001. **9**(3): p. 119-25.
155. Chu, P.G. and L.M. Weiss, *Keratin expression in human tissues and neoplasms*. Histopathology, 2002. **40**(5): p. 403-39.
156. Koga, T., et al., *Detection of circulating gastric cancer cells in peripheral blood using real time quantitative RT-PCR*. Hepatogastroenterology, 2008. **55**(84): p. 1131-5.
157. Kummar, S., et al., *Cytokeratin 7 and 20 staining for the diagnosis of lung and colorectal adenocarcinoma*. Br J Cancer, 2002. **86**(12): p. 1884-7.
158. Gurbuz, Y. and N. Kose, *Cytokeratin expression patterns of gastric carcinomas according to Lauren and Goseki classification*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2006. **14**(3): p. 303-8.
159. Chan, J.K., et al., *Cytokeratin 20 immunoreactivity distinguishes Merkel cell (primary cutaneous neuroendocrine) carcinomas and salivary gland small cell carcinomas from small cell carcinomas of various sites*. Am J Surg Pathol, 1997. **21**(2): p. 226-34.
160. Funaki, N.O., et al., *Cytokeratin 20 mRNA in peripheral venous blood of colorectal carcinoma patients*. Br J Cancer, 1998. **77**(8): p. 1327-32.

161. Ferrara, N., et al., *Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(5): p. 391-400.
162. Mocellin, S., M. Lise, and D. Nitti, *Targeted therapy for colorectal cancer: mapping the way*. Trends Mol Med, 2005. **11**(7): p. 327-35.
163. Guo, G.F., et al., *Overexpression of SGLT1 and EGFR in colorectal cancer showing a correlation with the prognosis*. Med Oncol, 2010.
164. Molinari, F., et al., *Differing deregulation of EGFR and downstream proteins in primary colorectal cancer and related metastatic sites may be clinically relevant*. Br J Cancer, 2009. **100**(7): p. 1087-94.
165. Siena, S., et al., *Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(19): p. 1308-24.
166. Siddiqui, A.D. and B. Piperdi, *KRAS mutation in colon cancer: a marker of resistance to EGFR-I therapy*. Ann Surg Oncol, 2010. **17**(4): p. 1168-76.
167. Ambrosini, G., C. Adida, and D.C. Altieri, *A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma*. Nat Med, 1997. **3**(8): p. 917-21.
168. Li, F., et al., *Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin*. Nature, 1998. **396**(6711): p. 580-4.
169. Altieri, D.C., *Validating survivin as a cancer therapeutic target*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(1): p. 46-54.
170. Salvesen, G.S. and C.S. Duckett, *IAP proteins: blocking the road to death's door*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(6): p. 401-10.
171. Tamm, I., et al., *IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs*. Cancer Res, 1998. **58**(23): p. 5315-20.
172. Shin, S., et al., *An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7*. Biochemistry, 2001. **40**(4): p. 1117-23.
173. Sun, C., et al., *Solution structure of human survivin and its binding interface with Smac/Diablo*. Biochemistry, 2005. **44**(1): p. 11-7.
174. Liu, T., B. Brouha, and D. Grossman, *Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells*. Oncogene, 2004. **23**(1): p. 39-48.
175. Grabowski, P., et al., *Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma*. Br J Cancer, 2003. **88**(1): p. 115-9.
176. Lu, C.D., D.C. Altieri, and N. Tanigawa, *Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas*. Cancer Res, 1998. **58**(9): p. 1808-12.
177. Yu, J., et al., *Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives*. Br J Cancer, 2002. **87**(1): p. 91-7.
178. Sarela, A.I., et al., *Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma*. Gut, 2000. **46**(5): p. 645-50.
179. Satoh, K., et al., *Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors*. Cancer, 2001. **92**(2): p. 271-8.

180. Sarela, A.I., et al., *Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma*. Br J Cancer, 2002. **86**(6): p. 886-92.
181. Ikeguchi, M., et al., *Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma*. Diagn Mol Pathol, 2002. **11**(1): p. 33-40.
182. Ito, T., et al., *Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2000. **31**(5): p. 1080-5.
183. Nasu, S., et al., *Survivin mRNA expression in patients with breast cancer*. Anticancer Res, 2002. **22**(3): p. 1839-43.
184. Tanaka, K., et al., *Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(1): p. 127-34.
185. Cohen, C., et al., *Survivin expression in ovarian carcinoma: correlation with apoptotic markers and prognosis*. Mod Pathol, 2003. **16**(6): p. 574-83.
186. Monzo, M., et al., *A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers*. J Clin Oncol, 1999. **17**(7): p. 2100-4.
187. Lehner, R., et al., *Immunohistochemical localization of the IAP protein survivin in bladder mucosa and transitional cell carcinoma*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2002. **10**(2): p. 134-8.
188. Mori, A., et al., *Expression of the antiapoptosis gene survivin in human leukemia*. Int J Hematol, 2002. **75**(2): p. 161-5.
189. Ivanov, A., et al., *Endopolyploid cells produced after severe genotoxic damage have the potential to repair DNA double strand breaks*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 20): p. 4095-106.
190. Belyanskaya, L.L., et al., *Cisplatin activates Akt in small cell lung cancer cells and attenuates apoptosis by survivin upregulation*. Int J Cancer, 2005. **117**(5): p. 755-63.
191. Yin, A.H., et al., *AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells*. Blood, 1997. **90**(12): p. 5002-12.
192. Miraglia, S., et al., *A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning*. Blood, 1997. **90**(12): p. 5013-21.
193. Shmelkov, S.V., et al., *Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133*. Blood, 2004. **103**(6): p. 2055-61.
194. Uchida, N., et al., *Direct isolation of human central nervous system stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14720-5.
195. Neuzil, J., et al., *Tumour-initiating cells vs. cancer 'stem' cells and CD133: what's in the name?* Biochem Biophys Res Commun, 2007. **355**(4): p. 855-9.
196. Collins, A.T., et al., *Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells*. Cancer Res, 2005. **65**(23): p. 10946-51.
197. Olempska, M., et al., *Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2007. **6**(1): p. 92-7.
198. O'Brien, C.A., et al., *A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice*. Nature, 2007. **445**(7123): p. 106-10.

199. Ricci-Vitiani, L., et al., *Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells*. Nature, 2007. **445**(7123): p. 111-5.
200. Yin, S., et al., *CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity*. Int J Cancer, 2007. **120**(7): p. 1444-50.
201. Suetsugu, A., et al., *Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **351**(4): p. 820-4.
202. Singh, S.K., et al., *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 5821-8.
203. Singh, S.K., et al., *Identification of human brain tumour initiating cells*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 396-401.
204. Liu, G., et al., *Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma*. Mol Cancer, 2006. **5**: p. 67.
205. Yi, L., et al., *Isolation and characterization of stem cell-like precursor cells from primary human anaplastic oligoastrocytoma*. Mod Pathol, 2007. **20**(10): p. 1061-8.
206. Bruno, S., et al., *CD133+ renal progenitor cells contribute to tumor angiogenesis*. Am J Pathol, 2006. **169**(6): p. 2223-35.
207. Mocellin, S., et al., *Circulating tumor cells: the 'leukemic phase' of solid cancers*. Trends Mol Med, 2006. **12**(3): p. 130-9.
208. Mocellin, S., et al., *Molecular detection of circulating tumor cells is an independent prognostic factor in patients with high-risk cutaneous melanoma*. Int J Cancer, 2004. **111**(5): p. 741-5.
209. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
210. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on*. Nat Protoc, 2006. **1**(2): p. 581-5.
211. Cremonesi, P., et al., *Technical note: Improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk*. J Dairy Sci, 2006. **89**(1): p. 163-9.
212. Sturzenbaum, S.R. and P. Kille, *Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2001. **130**(3): p. 281-9.
213. Rubie, C., et al., *Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues*. Mol Cell Probes, 2005. **19**(2): p. 101-9.
214. Altieri, D.C., *Molecular circuits of apoptosis regulation and cell division control: the survivin paradigm*. J Cell Biochem, 2004. **92**(4): p. 656-63.
215. Yamamoto, H., C.Y. Ngan, and M. Monden, *Cancer cells survive with survivin*. Cancer Sci, 2008. **99**(9): p. 1709-14.
216. Altieri, D.C., *Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(1): p. 61-70.
217. Wang, T.T., X.P. Qian, and B.R. Liu, *Survivin: potential role in diagnosis, prognosis and targeted therapy of gastric cancer*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(20): p. 2784-90.

218. Shen, C., et al., *The detection of circulating tumor cells of breast cancer patients by using multimarker (Survivin, hTERT and hMAM) quantitative real-time PCR*. Clin Biochem, 2009. **42**(3): p. 194-200.
219. Yie, S.M., et al., *Clinical significance of detecting survivin-expressing circulating cancer cells in patients with non-small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2009. **63**(2): p. 284-90.
220. Cao, W., et al., *Using detection of survivin-expressing circulating tumor cells in peripheral blood to predict tumor recurrence following curative resection of gastric cancer*. J Surg Oncol, 2010.
221. Yie, S.M., et al., *Detection of survivin-expressing circulating cancer cells (CCCs) in peripheral blood of patients with gastric and colorectal cancer reveals high risks of relapse*. Ann Surg Oncol, 2008. **15**(11): p. 3073-82.
222. Psaila, B. and D. Lyden, *The metastatic niche: adapting the foreign soil*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 285-93.
223. Hiraiwa, K., et al., *Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastrointestinal cancers*. Ann Surg Oncol, 2008. **15**(11): p. 3092-100.
224. Illert, B., et al., *Disseminated tumor cells in the blood of patients with gastric cancer are an independent predictive marker of poor prognosis*. Scand J Gastroenterol, 2005. **40**(7): p. 843-9.
225. Yeh, K.H., et al., *Detection of circulating cancer cells by nested reverse transcription-polymerase chain reaction of cytokeratin-19 (K19)--possible clinical significance in advanced gastric cancer*. Anticancer Res, 1998. **18**(2B): p. 1283-6.
226. Seo, J.H., et al., *Follow-up study of peripheral blood carcinoembryonic antigen mRNA using reverse transcription-polymerase chain reaction as an early marker of clinical recurrence in patients with curatively resected gastric cancer*. Am J Clin Oncol, 2005. **28**(1): p. 24-9.
227. Wu, C.H., et al., *Molecular detection of disseminated tumor cells in the peripheral blood of patients with gastric cancer: evaluation of their prognostic significance*. Dis Markers, 2006. **22**(3): p. 103-9.
228. Qiu, M.Z., et al., *Detection of carcinoembryonic antigen messenger RNA in blood using quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction to predict recurrence of gastric adenocarcinoma*. J Transl Med, 2010. **8**: p. 107.
229. Al-Moundhri, M.S., et al., *Measurement of circulating levels of VEGF-A, -C, and -D and their receptors, VEGFR-1 and -2 in gastric adenocarcinoma*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(24): p. 3879-83.
230. Uen, Y.H., et al., *Clinical significance of MUC1 and c-Met RT-PCR detection of circulating tumor cells in patients with gastric carcinoma*. Clin Chim Acta, 2006. **367**(1-2): p. 55-61.
231. Mimori, K., et al., *A large-scale study of MT1-MMP as a marker for isolated tumor cells in peripheral blood and bone marrow in gastric cancer cases*. Ann Surg Oncol, 2008. **15**(10): p. 2934-42.
232. Pituch-Noworolska, A., et al., *Circulating tumour cells and survival of patients with gastric cancer*. Anticancer Res, 2007. **27**(1B): p. 635-40.
233. Matsusaka, S., et al., *Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in patients with advanced gastric cancer*. Cancer Sci, 2010. **101**(4): p. 1067-71.

234. Bertazza, L., et al., *Survivin gene levels in the peripheral blood of patients with gastric cancer independently predict survival*. J Transl Med, 2009. **7**: p. 111.
235. Bertazza, L., S. Mocellin, and D. Nitti, *Circulating tumor cells in solid cancer: tumor marker of clinical relevance?* Curr Oncol Rep, 2008. **10**(2): p. 137-46.
236. Lin, E.H., et al., *Elevated circulating endothelial progenitor marker CD133 messenger RNA levels predict colon cancer recurrence*. Cancer, 2007. **110**(3): p. 534-42.
237. Shmelkov, S.V., et al., *CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors*. J Clin Invest, 2008. **118**(6): p. 2111-20.
238. LaBarge, M.A. and M.J. Bissell, *Is CD133 a marker of metastatic colon cancer stem cells?* J Clin Invest, 2008. **118**(6): p. 2021-4.