

UNIVERSITÀ DELLA CALABRIA



UNIVERSITA' DELLA CALABRIA

Dipartimento di Biologia, Ecologia e Scienze della Terra

SCUOLA DI DOTTORATO
"LIFE SCIENCES"

Biologia animale

XXVII CICLO

**L'assunzione del genotipo neuroendocrino da parte di cellule
epiteliali neoplastiche quale fattore di resistenza
all'aggressione terapeutica nell'adenocarcinoma prostatico**

Settore Scientifico Disciplinare

MED/05 Patologia Clinica

Direttore: Ch.mo Prof. Marcello Canonaco

Coordinatore: Ch.ma Prof.ssa Maria Carmela Cerra

Supervisor: Prof. Francesco Romeo

Prof.ssa Maria Luisa Panno

Dottoranda

Dott.ssa Aurora Ferraro

INDICE

INTRODUZIONE	»	pag. 3
CAPITOLO 1: L'adenocarcinoma prostatico		pag. 5
1.1 Adenocarcinoma prostatico: generalità	»	pag. 6
1.2 Eziopatologia	»	pag. 7
1.3 Sintomi e segni clinici	»	pag. 8
1.4 Diagnosi ed esami diagnostici	»	pag. 8
1.5 La prognosi	»	pag. 10
1.6 Stadiazione e Grado Gleason	»	pag. 11
1.7 Terapia	»	pag. 13
CAPITOLO 2: I tumori neuroendocrini	»	pag. 15
2.1 I tumori neuroendocrini: generalità	»	pag. 16
2.2 Classificazione dei tumori neuroendocrini	»	pag. 17
2.3 I marcatori tumorali	»	pag. 18
2.4 Trattamento	»	pag. 20
CAPITOLO 3: I tumori neuroendocrini della prostata	»	pag. 22
3.1 Generalità	»	pag. 23
3.2 Acido Valproico: caratteristiche e meccanismo d'azione	»	pag. 26
3.3 Fenotipo morfofunzionale delle cellule neuroendocrine della prostata	»	pag. 27
3.4 La diagnosi differenziale	»	pag. 29
3.5 Terapia	»	pag. 30
CAPITOLO 4: Materiali e metodi	»	pag. 32
4.1 Prima fase sperimentale	»	pag. 33
4.2 Allestimento dei campioni biologici	»	pag. 34
4.3 Microscopia ottica	»	pag. 36
4.4 Immunoistochimica	»	pag. 37
4.5 Tecniche di immunoenzimatica: metodica manuale	»	pag. 37
4.6 Metodica immunoenzimatica automatizzata	»	pag. 40
4.7 Tecniche dell'Immunofluorescenza	»	pag. 41
4.8 Seconda fase sperimentale	»	pag. 43
4.9 Cellule LNCap	»	pag. 43
4.10 Condizioni sperimentali	»	pag. 43
4.11 Preparazione degli estratti proteici cellulari e western blot	»	pag. 45
Risultati	»	pag. 47
Considerazioni e conclusioni	»	pag. 66
Bibliografia	»	pag. 70

Introduzione

La valutazione della componente neuroendocrina nelle neoplasie epiteliali non neuroendocrine è un argomento di ricerca particolarmente attivo, che riguarda l'analisi della progressione neoplastica valutata da un punto di vista morfologico, molecolare e soprattutto prognostico. L'adenocarcinoma prostatico rappresenta la neoplasia "elettiva" per quanto riguarda il processo di differenziazione neuroendocrino, perché nello sviluppo della neoplasia esprime l'intero percorso che va dalla fase di proliferazione delle cellule neuroendocrine fino alla fase dell'ormono-refrattarietà. Quando si innesca questo meccanismo la neoplasia dimostra una maggiore aggressività e di conseguenza una prognosi peggiore. Le cellule neuroendocrine prostatiche, come le cellule basali secretorie ghiandolari originano da comuni cellule staminali pluripotenti.

Hanno le seguenti caratteristiche:

- Sono prive di androgeni;
- Non producono PSA;
- Hanno fenotipo antiapoptotico;
- Secernono diversi ormoni peptidici come serotonina e cromogranina,

Grazie all'azione di questi ormoni, incrementano la proliferazione delle cellule tumorali non endocrine attraverso modalità paracrine.

La tendenza delle cellule prostatiche a differenziarsi nel fenotipo neuroendocrino deve far riferimento a condizioni micro ambientali quale la deplezione di androgeni (indotta da antiandrogeni, ago-antagonisti di LH-H, inibitori della 5alfa reduttasi), fattori adrenergici, accentuazioni della cascata di segnali dipendenti dall'interleuchina 6. Le cellule neuroendocrine svolgerebbero il loro ruolo funzionale intervenendo sui segnali "stromo-epiteliali" mediati da fattori di crescita che favoriscono la proliferazione, oppure la inibiscono. L'iperattivazione delle cellule

neuroendocrine nell'adenocarcinoma prostatico, come conseguenza di un trattamento anti-androgenico può essere evidenziata e confermata con analisi immunoistochimiche. Considerando quindi che all'interno di una neoplasia possano verificarsi la coesistenza di oncotipi diversi, ovvero epiteliale esocrino e neuroendocrino, la valutazione dello "status immunoistocimico neoplastico" diventa un parametro dirimente e fondamentale non solo da un punto di vista diagnostico ma soprattutto prognostico. Alla luce di questi dati il nostro progetto di ricerca analizza le fasi di passaggio dell'adenocarcinoma verso il carcinoma neuroendocrino, valutate attraverso i vari stadi di alterazione del tessuto prostatico, espressi dalla sequenza PIN-ADENOCARCINOMA-NET, ovvero Neoplasia Intraepiteliale Prostatica Benigna (PIN), adenocarcinoma prostatico e Neoplasia Neuroendocrina. Il progetto si è sviluppato secondo due fasi sperimentali distinte: una fase in vivo ed una in vitro. Nella prima fase sono state effettuate analisi morfologiche e funzionali, mediante tecniche di immunoistochimica ed immunofluorescenza eseguite in microscopia ottica e confocale, per valutare l'espressione di markers epiteliali e neuroendocrini. I dati ottenuti ci hanno permesso di valutare anche il profilo terapeutico dei pazienti e l'efficacia della terapia antiandrogenica. Nella fase in vitro, condotta su una linea cellulare di tumore prostatico, abbiamo verificato i cambiamenti morfologici e funzionali delle cellule indotte a differenziarsi nel fenotipo neuroendocrino (in seguito a somministrazione di acido valproico) tramite l'analisi di markers specifici. Il confronto tra i dati ottenuti in vivo ed i dati ottenuti in vitro ci ha permesso di confermare il ruolo fondamentale dell'indagine immunoistochimica, in senso neuroendocrino, in fase di biopsia prostatica e di affermare che esiste nell'evoluzione del carcinoma prostatico una fase in cui le cellule possono assumere una morfologia 'ibrida', che determinerà attraverso connotazioni neuroendocrine una prognosi nettamente sfavorevole.

Capitolo 1

L'adenocarcinoma prostatico

1.1 Adenocarcinoma prostatico: generalità

L'adenocarcinoma della prostata origina di solito nella porzione periferica della prostata (70%) ed è quindi apprezzabile anche all'esplorazione rettale, meno comune è invece nella zona centrale, che costituisce la parte prevalente della base della prostata, che più spesso è invece invasa dai tumori di grosse dimensioni insorti dalle porzioni limitrofe dell'organo.

L'identificazione macroscopica del tumore non appare sempre agevole. E' possibile identificare il tumore nella zona periferica e centrale, quando questo deforma il profilo o il contorno della ghiandola e mostri un colore biancastro rispetto al tessuto prostatico normale. Le neoplasie nella zona di transizione mostrano un aspetto nodulare simile a quello dei noduli iperplastici. Sulla base del colore delle neoplasie, talora giallastro, è possibile distinguere noduli benigni da quelli maligni.

Il quadro microscopico di gran lunga più frequente del carcinoma della prostata è l'adenocarcinoma acinale. La diagnosi si basa sulla valutazione di alcuni parametri: citologici (nucleari e citoplasmatici), intra-luminari, architetturali e specifici di malignità. Dal punto di vista citologico, usualmente, le cellule presentano nuclei ampi, provvisti di nucleoli prominenti, multipli e marginanti e citoplasma anfofilo. Mucina acida e cristalloidi possono essere presenti nel lume degli acini non neoplastici.

L'adenocarcinoma è costituito da strutture acinari di dimensioni piccole o intermedie che hanno contorno esterno e distribuzione stromale irregolari e dove le cellule basali sono assenti. Gli aspetti morfologici specifici per la diagnosi di carcinoma sono l'invasione perineurale, vascolare e la fibroplasia mucinosa.

La maggior parte dei registri tumori rileva un aumento dell'incidenza del carcinoma prostatico che attualmente, in molti Paesi occidentali, rappresenta il secondo tumore più frequente nel sesso maschile. In alcuni Paesi, come gli Stati Uniti e i Paesi Scandinavi, il carcinoma della prostata rappresenta il tumore più frequente fra i maschi. Da circa venti anni negli USA e in Canada e da circa dieci anni in molti Paesi occidentali industrializzati, anche se con un andamento meno evidente e più lento, l'incidenza ha subito un rapido aumento, fino a circa 10 volte, per poi diminuire ed attestarsi su valori di circa 1.5-2 volte rispetto all'attesa in base al trend storico degli ultimi 30 anni. Tale evenienza si spiega essenzialmente con l'aumentato uso, in questi Paesi, della determinazione dell'antigene prostatico specifico (PSA), in forma di screenin e la conseguente diagnosi di un numero molto elevato di carcinomi asintomatici e pre clinici, anche se il carcinoma prostatico rimane pur sempre la seconda causa di morte per malattia neoplastica fra i maschi negli Stati Uniti. Nei paesi della Comunità Europea il tasso d'incidenza del carcinoma prostatico è di 55 casi per 100.000 e quello di mortalità di 22,6 decessi per 100.000 individui. Il rischio di sviluppare carcinoma prostatico, considerato fino all'età massima di 74 anni, è del 3,9%, e quello di morire per

questa malattia è del 1,2%. La discrepanza tra l'aumento dell'incidenza e la sostanziale stabilità della mortalità, osservato negli ultimi anni, è attribuibile al miglioramento della terapia medica delle forme avanzate. Tale discrepanza conferma che l'anticipazione diagnostica è mediamente di 10 anni e suggerisce che buona parte dei carcinomi identificati in tal modo sia di fatto sovradiagnosticata e destinata, in assenza di screening, a non manifestarsi clinicamente nella vita (carcinoma "latente").

1.2 Eziopatologia

Il principale fattore di rischio per il cancro alla prostata è *l'età*. Il cancro della prostata è raramente diagnosticato prima dei 40 anni. Il test del PSA non è generalmente effettuata su uomini di età inferiore a 50 a meno che non siano presenti fattori di rischio significativi. La probabilità di sviluppare adenocarcinoma prostatico in età diverse è la seguente:

- da 20 a 30 anni: 2-8%
- da 31 a 40 anni: 9-31%
- da 41 a 50 anni 3-43%
- da 51 a 60 anni: 5-46%
- da 61 a 70 anni: 14-70%
- da 71 a 80 anni: 31-83%
- da 81 a 90 anni: 40-73%

Circa il 5-10% di cancro alla prostata è dovuta a *difetti genetici*, infatti gli uomini che hanno una storia familiare, sono più a rischio di sviluppare cancro prostatico. Gli uomini che hanno un parente di primo grado (fratello, padre o figlio) che ha avuto il cancro alla prostata hanno una probabilità 2-3 volte maggiore di svilupparlo. Questo rischio può essere maggiore se al parente è stato diagnosticato il carcinoma prostatico prima dei 60 anni.

L'identificazione dei geni coinvolti nel cancro alla prostata si è rivelato difficile: BRCA1 e BRCA2 risultano esserlo.

Studi americani hanno messo in evidenza come gli uomini afro-americani hanno un tasso più alto di sviluppare il cancro alla prostata rispetto agli uomini caucasici o ispanici, mentre gli indigeni australiani hanno un rischio minore di sviluppare cancro alla prostata rispetto a quelli non-indigeni.

Anche i legami tra il cancro alla prostata e la *dieta* sono stati ampiamente studiati. Risultati significativi indicano che una dieta ricca di grassi animali e a basso contenuto di verdure può contribuire allo sviluppo di cancro della prostata, mentre l'assunzione di soia può avere un modesto effetto protettivo.

1.3 Sintomi e segni clinici

Negli stadi precoci della malattia, la maggior parte dei pazienti è asintomatica. La comparsa di sintomi delle basse vie urinarie (disuria, pollachiuria), solitamente, è ritenuta secondaria a malattia localmente avanzata. L'anuria ostruttiva, o la perdita di funzione di un rene, possono conseguire all'infiltrazione degli ureteri a livello del trigono o dipendere dalla loro compressione all'imbocco della piccola pelvi ad opera dei linfociti iliaci interni metastatici. Qualche volta, parestesie, dolori o deficit motori agli arti inferiori, incontinenza fecale ed urinaria possono essere secondari a compressione midollare da metastasi vertebrali protrudenti nello spazio vertebrale. Solo nel 10-15% dei casi di adenocarcinoma prostatico incidentale, la sintomatologia è di tipo ostruttivo. L'ematuria è presente in meno del 15% dei casi, mentre la ritenzione acuta d'urina viene raramente annoverata fra i sintomi di esordio. La comparsa, invece, di sintomatologia dolorosa riferita allo scheletro può essere espressione di localizzazione ossea secondaria. Sintomi di malattia sistemica, quali perdita di peso e astenia, interessano il 10% dei pazienti.

1.4 Diagnosi ed esami diagnostici

La diagnosi di carcinoma prostatico si basa essenzialmente sulle seguenti indagini: dosaggio del PSA sierico,(57) esplorazione digito-rettale (DRE da digital rectal examination), ecografia trans rettale (TRUS da transrectal ultrasound) e ago biopsia prostatica

PSA

Il PSA è una glicoproteina la cui funzione è quella di produrre la liquefazione dello sperma. Essa è presente solamente nel citoplasma delle cellule epiteliali prostatiche, e quindi è altamente specifica pur non essendo cancro- specifica, in quanto prodotta normalmente dalle cellule ghiandolari.

Il PSA viene generalmente valutato con riferimento a un valore soglia positivo/negativo calcolato sulla base della distribuzione del marcatore nei soggetti normali. Il valore soglia più utilizzato è 4 ng/ml. Tuttavia un dilemma diagnostico critico è rappresentato dalla sovrapposizione fra soggetti con cancro confinato all'organo, e soggetti con ipertrofia prostatica che presentano spesso valori di PSA fra 4 e 10 ng/ml. Inoltre è sempre più consistente il problema di porre diagnosi di carcinoma anche in pazienti con PSA inferiore a 4 ng/ml in quanto il 25-30% dei pazienti con neoplasia confinata alla ghiandola presentano un PSA compreso fra 2,5 e 4 ng/ml (57).

Con la DRE si riescono ad apprezzare solo tumori che originano nella zona periferica. Sfuggono, invece, quei tumori che partono dalla zona di transizione o che non sono molto estesi. L'ecografia trans rettale può essere di ausilio alla DRE grazie al fatto che nel 40% dei casi le aree neoplastiche appaiono ipoecogene. Ciò è dovuto all'elevata cellularità del tessuto neoplastico che produce un

numero minore di echi interni. La biopsia prostatica viene eseguita in tutti i casi in cui vi sia il sospetto di neoplasia prostatica all'atto della DRE e della TRUS, oppure nel caso vi sia un PSA superiore alla norma (2,5 ng/ml per età inferiore ai 60 anni, > 4 ng/ml per età maggiore di 60 anni). Le indagini immunohistochimiche, che possono essere d'ausilio nella definizione dell'immunoprofilo del carcinoma prostatico e quindi della sua diagnosi, includono la determinazione di:

- Antigene prostatico specifico (PSA) e fosfatasi acida prostatica specifica (PSAP); usualmente l'adenocarcinoma della prostata è positivo per PSA e PSAP. Una minoranza di tumori ad alto grado, è negativo per questi due biomarcatori, ma esprime l'RNA messaggero per il PSA;
- Citocheratine ad alto peso molecolare, cioè 34betaE12 (LP34 o citocheratina 903). Queste citocheratine sono presenti nelle cellule dello strato basale, le quali sono assenti nel carcinoma, che risulta negativo a quest'indagine immunohistochimica;
- La p63, proteina nucleare espressa dalle cellule basali, è assente nell'adenocarcinoma;

Un ruolo importante, parlando appunto di neoplasie androgeno dipendenti, lo ricopre la determinazione immunohistochimica in sede di biopsia, del recettore androgenico. A seconda dei valori di immunopositività, si riescono ad avere informazioni sull'origine ma anche sullo sviluppo della neoplasia. Questo soprattutto se si considera che recenti ricerche hanno messo in evidenza che marcatori come il PSA testati a livello sierico possano produrre dei risultati non sempre veritieri, ovvero presentare valori bassi in casi di carcinoma e viceversa valori alti in assenza di neoplasia (58)

Il recettore androgenico è una proteina intracellulare che appartiene a una grande famiglia di fattori di trascrizione indotta da ormoni, che media le azioni biologiche degli androgeni fisiologici quali testosterone e 5 α -diidrottestosterone, i quali svolgono un ruolo fondamentale per la differenziazione, lo sviluppo e il mantenimento degli organi riproduttivi maschili. Il DHT si lega al un recettore citoplasmatico e migra nel nucleo delle cellule prostatiche. Il complesso androgeno-recettore, regola le risposte di crescita negli organi sessuali accessori modulando la trascrizione genica specifica. L'attivazione di questo meccanismo in senso patologico determina l'accrescimento della ghiandola prostatica verso forme non neoplastiche, tipo l'ipertrofia prostatica benigna, e verso forme neoplastiche stimolando la crescita del tumore.

Nella valutazione istologica delle biopsie prostatiche, effettuate per un sospetto clinico di neoplasia, si possono incontrare alcuni problemi diagnostici:

- *Proliferazione microcinare atipica sospetta, ma non diagnostica per malignità*

(cosiddetta ASAP da *atypical small acinar proliferation*). In alcune biopsie prostatiche si può osservare la presenza di focolai costituiti da piccoli acini, la cui morfologia è suggestiva, ma non indicativa della neoplasia. Si tratta in genere di focolai di piccole dimensioni, in cui non si osservano tutti i criteri istologici del carcinoma. In questi casi l'immunoistochimica può essere di ausilio. E' consigliato l'uso di anticorpi contro la p63, proteina nucleare, contro le citocheratine ad alto peso molecolare (34betaE12) e contro la racemasi. I primi due sono specifici per le cellule basali mentre il terzo marker è ritenuto indicativo di trasformazione maligna (57). Quei casi di ASAP con negatività per p63 e 34betaE12 e positività per racemasi vengono considerati altamente sospetti di malignità;

- *Neoplasia intraepiteliale della prostata di alto grado (PIN) vs. adenocarcinoma con pattern 3 di Gleason, variante a grandi acini.* La PIN di alto grado è considerata il precursore diretto dell'adenocarcinoma della zona periferica. E' spesso associata alla presenza di adenocarcinoma. Dal punto di vista citologico ed architetturale può essere simile all'adenocarcinoma a grandi acini. La diagnosi differenziale è possibile con l'ausilio dell'immunoistochimica per le cellule basali. Queste sono assenti nell'adenocarcinoma e sono invece presenti, anche se in numero ridotto, rispetto alla situazione normale, nel PIN. L'identificazione del PIN, nei campioni biotici, impone un'indagine biotica supplementare per la ricerca di eventuale carcinoma concomitante;
- *Iperplasia adenomatosa atipica vs. adenocarcinoma.* L'iperplasia adenomatosa atipica è usualmente presente nella zona di transizione ed è caratterizzata dalla proliferazione di piccoli acini privi delle caratteristiche alterazioni citologiche dell'adenocarcinoma. L'immunoistochimica evidenzia la presenza di occasionali cellule basali.

1.5 La prognosi

Nei pazienti con tumore della prostata, la prognosi, dipende da fattori clinici, di laboratorio (come ad esempio i livelli sierici di PSA), morfologici e molecolari. I parametri morfologici che attualmente rivestono un ruolo fondamentale sono: grado istologico, stadio, stato dei margini chirurgici, dimensioni o volume della neoplasia e l'infiltrazione perineurale. Questi parametri vanno valutati sia su prostatectomia radicale che su biopsie (57).

La probabilità per un uomo di diagnosticare un qualsiasi tipo di cancro della prostata è del (17%). Tuttavia, solo il 3% degli uomini muoiono per cancro alla prostata. Con l'autopsia si è in grado di identificare un terzo degli uomini, affetti da carcinoma prostatico, con età inferiore ad

80 anni e due terzi degli uomini di età superiore a 80. A cinque anni dalla diagnosi, il 99% degli uomini sono ancora vivi, a 10 anni, il 95%.

1.6 Stadiazione e grado Gleason

La stadiazione consiste nella valutazione e definizione del grado di estensione della malattia effettuata attraverso le diverse procedure diagnostiche tipiche del particolare tipo di tumore analizzato. Si tratta di dati molto importanti per la successiva scelta dell'iter terapeutico (1).

La stadiazione di un tumore è clinica e patologica. Per stadiazione clinica si intende quella che è possibile effettuare studiando il paziente e cioè mediante l'esame obiettivo e con l'ausilio di esami di laboratorio e radiologici. La stadiazione patologica si basa sul reperto istologico effettuato sul tumore asportato chirurgicamente.

Il sistema "TNM" è una convenzione universalmente accettata. Si tratta di un sistema di identificazione dello stadio della malattia laddove la "T" con indice da 1 a 4 identifica il volume del tumore e la sua estensione locale, la "N" indica l'interessamento o meno dei linfonodi loco regionali e la "M" l'esistenza o meno di metastasi a distanza.

Classificazione TNM del cancro prostatico
T0: tumore non palpabile (tumore preclinico latente o incidentale)
T1: tumore intracapsulare circondato da tessuto normale
T2: tumore confinato alla prostata ma occupante tutta la ghiandola
T3a: tumore esteso oltre la capsula
T3b: tumore infiltrante le vescicole seminali
T4: tumore infiltrante strutture anatomiche vicine.
N0: nessun interessamento linfonodale
N1: interessamento di un singolo linfonodo regionale omolaterale
N2: interessamento linfonodale regionale multiplo o bilaterale
N3: fissità dei linfonodi regionali interessati
N4: interessamento linfonodi iuxtaregionali.
M0: non evidenza di metastasi a distanza
M1: metastasi a distanza.

Per la neoplasia prostatica il grado istologico viene definito con il sistema di Gleason che è considerato il sistema di riferimento internazionale. Si basa sulla valutazione delle caratteristiche architetturali della neoplasia, riconoscendo cinque diversi pattern (figura 1):

- **Gleason 1:** tumore composto da noduli ben delimitati di ghiandole, strettamente ravvicinate, uniformi, singole e separate l'una dalle altre;
- **Gleason 2:** tumore ancora abbastanza circoscritto, ma con eventuale minima estensione delle ghiandole neoplastiche alla periferia del nodulo tumorale, nel tessuto prostatico non neoplastico;
- **Gleason 3:** tumore che infiltra il tessuto prostatico non tumorale nel quale le ghiandole presentano notevole variabilità di forma e dimensione;
- **Gleason 4:** ghiandole tumorali con contorni non definiti e fuse fra loro;
- **Gleason 5:** tumore che non presenta differenziazione ghiandolare, ma è composto da cordoni solidi o da singole cellule.

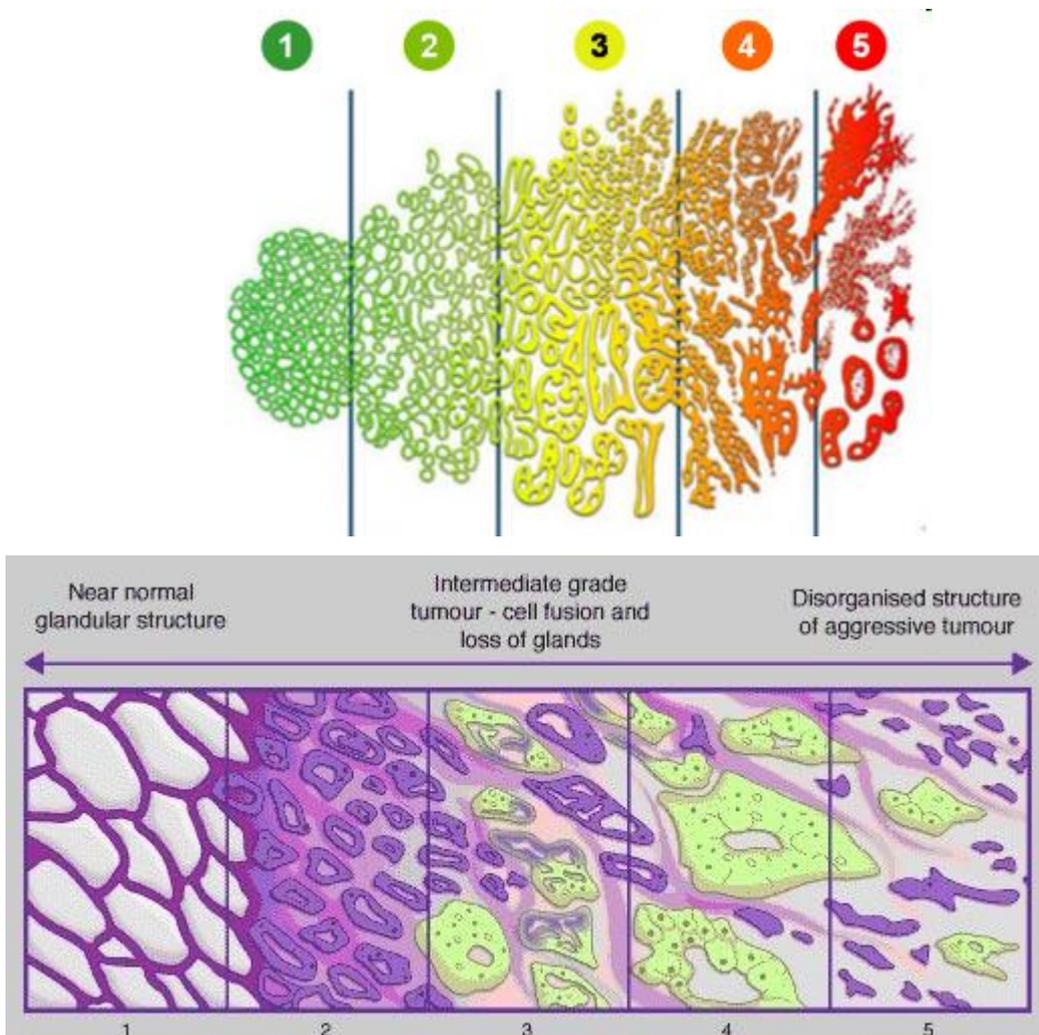


Figura 1: sistema Gleason

Il sistema di Gleason non va utilizzato nei tumori che sono stati sottoposti a trattamento ormonale neo-adiuvante; in questi casi deve essere fatto riferimento al Gleason bioptico precedente la ormono-terapia (57).

1.7 Terapia

Il trattamento medico basato sulla deprivazione androgenica totale è la terapia standard del carcinoma metastatico.

La deprivazione androgenica si ottiene con la castrazione chirurgica o con l'impiego di analogo dell'LHRH (LHRHa, Luteinizing Hormone-Releasing Hormone analogo), che blocca l'asse ipotalamo/ ipofisi/ testicolo/ strutture dipendenti. In alternativa o in associazione alla castrazione chimica, è altrettanto diffuso l'uso di antiandrogeni (flutamide, bicalutamide, ciproterone acetato), che hanno lo scopo di bloccare la funzione del recettore androgenico nelle cellule tumorali. La somministrazione contemporanea di LHRHa e antiandrogeno determina il blocco androgenico totale (57).

Anche gli inibitori dell'enzima 5-alfa-reduttasi sono utilizzati nella terapia del carcinoma prostatico. Il blocco di questo enzima determina una mancata conversione del testosterone in diidrotosterone, che è la forma metabolicamente attiva a livello cellulare. La finasteride inibisce la 5-alfa-reduttasi (l'isoenzima di tipo II), mentre la dutasteride inibisce entrambi gli isoenzimi (tipo I e II).

La deprivazione androgenica è usata per ottenere una riduzione volumetrica della ghiandola e del tumore prima del trattamento locale (trattamento neo adiuvante), il quale è stato dimostrato essere di provata efficacia soprattutto in associazione alla radioterapia. La deprivazione androgenica ha effetto sia sull'epitelio normale che neoplastico dove induce riduzione dell'attività proliferativa e morte cellulare per apoptosi. L'effetto di regressione è correlato con il tipo di trattamento, con la sua durata e con altri parametri come il PSA sierico pre-terapia.

L'effetto morfologico della deprivazione androgenica è rappresentato da picnosi nucleare, da assenza di nucleoli prominenti e da vacuolizzazione citoplasmatica. Gli acini mostrano scomparsa del lume mentre le cellule possono disporsi a formare delle filiere tanto da simulare uno stroma ipercellulato con elementi linfocitari stromali. In casi di difficile interpretazione l'utilizzo dell'immunoistochimica, in particolare di anticorpi contro le Citocheratine, è di ausilio nell'identificazione di cellule residue "nascoste" nello stroma.

Altre forme di terapia ormonale sono:

- farmaci che bloccano la produzione di androgeni nei surreni, come il DHEA, il ketoconazolo e l'amminoglutetimide. Poiché i surreni producono solo il 5% circa degli androgeni circolanti, questi farmaci si usano in genere in combinazione con altri metodi, in grado di bloccare la produzione testicolare di androgeni;

-gli antagonisti del GnRH, che sopprimono direttamente la produzione del GnRH, oppure gli agonisti del GnRH che agiscono con una downregulation dopo un iniziale effetto stimolante. L'abarelix è un esempio di GnRH-antagonista mentre gli agonisti comprendono la leuprolide, la goserelina, la triptorelina, e la buserelina. Inizialmente questi farmaci aumentano la produzione di LH, tuttavia, poiché la somministrazione del farmaco non segue il ritmo giornaliero di produzione dell'ormone, i livelli di LH e GnRH decrescono dopo poche settimane (2).

-L'orchietomia, ossia la rimozione chirurgica dei testicoli.

Dopo l'orchietomia i livelli di testosterone cadono poiché i testicoli producono la maggior parte dell'ormone.

Capitolo 2

I tumori neuroendocrini

2.1 I tumori neuroendocrini: generalità

I tumori neuroendocrini (NET) sono neoplasie relativamente rare, che insorgono a carico del sistema neuroendocrino, un sistema di cellule diffuso in tutto l'organismo, le quali hanno la capacità di secernere i loro prodotti in maniera controllata in risposta ad uno specifico stimolo. Il termine neuroendocrino si riferisce quindi al tipo di cellula dal quale questi tumori originano piuttosto che alla sede di origine. Questi tumori possono svilupparsi in tutte le parti dell'organismo e rappresentano quindi un gruppo eterogeneo, sia dal punto di vista genetico che da quello clinico, di neoplasie con un comportamento intermedio tra le due categorie di tumori benigni e maligni. Per migliorare l'esito clinico, i pazienti dovrebbero essere seguiti da un gruppo di esperti clinici multidisciplinari, tra cui: oncologi, gastroenterologi, endocrinologi, medici di medicina nucleare e chirurghi. I NET si possono presentare con una varietà di sintomi, e la diagnosi può essere ritardata fino a cinque anni in media, in particolare se non è sindromica. Prognosi e risultati clinici attualmente sono basati sul sito primario e sul grado istologico del tumore. La chirurgia radicale per la malattia localizzata è l'unico trattamento curativo conosciuto al momento; mentre terapie sistemiche sono: analoghi della somatostatina (SSA), chemioterapia, terapia con il peptide del recettore radionuclide (PRRT), interferone α (IFN- α). È chiaro che notevoli differenze nella patogenesi molecolare sono evidenti tra i NET nei diversi siti di origine. Negli ultimi anni è stato osservata una risposta diversa dei vari NET alle terapie molecolari mirate (47). Le cellule del sistema neuroendocrino generano dei tumori corrispondenti, e tra questi individuiamo: carcinomi midollari della tiroide, feocromocitomi, paragangliomi extrasurrenali, carcinomi a piccole cellule e carcinomi neuroendocrini puri (46). I tumori neuroendocrini a vari livelli esprimono caratteristiche morfologiche e funzionali diverse dalla loro controparte normale; possono anche esprimere caratteristiche inappropriate, comprese quelle di altre cellule neuroendocrine e di cellule non neuroendocrine (44-45).

Riguardo alle caratteristiche funzionali dei tumori neuroendocrini si possono fare diverse generalizzazioni (46). Prima fra tutte, i tumori esprimono un gran numero di marcatori condivisi, sia morfologici che funzionali, anche quando si presentano in posizioni molto distanti. In secondo luogo, di solito sono multi-ormonali, ogni singolo tumore neuroendocrino produce almeno due ormoni peptidici. Infine, essi producono ormoni peptidici ectopici; questi possono essere classificati come evolutivamente appropriati o evolutivamente non appropriati. Un esempio del primo caso è la bombesina nel cancro umano a piccole cellule ai polmoni; anche se molte cellule neuroendocrine delle vie aeree dell'uomo adulto perdono la capacità di produrre bombesina, quasi tutte le linee

cellulari umane di carcinoma polmonare a piccole cellule sono caratterizzate da produzione di bombesina (48).

Un esempio di un neuropeptide evolutivamente inappropriato è il peptide intestinale vasoattivo in feocromocitomi umani, VIP. Questo è normalmente un marcatore di cellule nervose, ma non di cellule neuroendocrine nei mammiferi adulti. Tuttavia, feocromocitomi umani molto spesso producono VIP sia in vivo che in vitro (49).

Vi sono anche prove di segnali ambientali che possono alterare l'ormone o il profilo di neurotrasmettitori di tumori cellulari neuroendocrini in vitro (48-49). È quindi importante comprendere i meccanismi di trasduzione del segnale normalmente impiegati dalle cellule neuroendocrine per interpretare le risposte ai segnali ambientali e i modi in cui questi meccanismi siano alterati in risposta ad agenti esogeni in condizioni normali e patologiche.

2.2 Classificazione dei tumori neuroendocrini

Sul piano istopatologico, i NET si suddividono in:

- NET ben differenziati: hanno una bassa o bassissima attività proliferativa, per cui si associano generalmente a buone prospettive di sopravvivenza a lungo termine. La loro natura meno aggressiva, ma comunque maligna, fa sì che questi tumori possano dare metastasi, anche molto tempo dopo l'identificazione del tumore primitivo;
- NET scarsamente differenziati: hanno un'alta attività proliferativa ed un più elevato grado di malignità, per cui si associano generalmente ad una maggiore probabilità di evolvere verso la fase metastatica.

Da un punto di vista clinico, i NET vengono distinti in:

- NET funzionanti, o secernenti, i quali si manifestano con una sindrome da iperproduzione di un determinato peptide;
- NET non-funzionanti, o non secernenti, (circa il 70% del totale), così definiti in quanto non secernenti peptidi biologicamente attivi.

Tra i **NET secernenti** quelli più diffusi sono i:

- GEP-NET (tumori neuroendocrini del tratto gastro-enterico pancreatico), i quali includono:
 - I tumori neuroendocrini dello stomaco;
 - I tumori neuroendocrini del duodeno-digiuno prossimale;

- I tumori neuroendocrini del digiuno distale-ileo-cieco;
- I tumori neuroendocrini dell'appendice;
- I tumori neuroendocrini del colon-retto;
- I tumori neuroendocrini del pancreas.

I NET-GEP sono usualmente sporadici, ma possono talvolta presentarsi in associazione ad altri tumori, nell'ambito di una Neoplasia Endocrina Multipla di tipo 1 (MEN1), che è una sindrome genetica caratterizzata dall'associazione di iperparatiroidismo legato ad un adenoma e/o iperplasia delle paratiroidi, iperplasia e/o tumori ipofisari e NET del tratto GEP (IV).

I **NET-GEP non funzionanti** invece, non si associano alla presenza in circolo di specifiche sostanze ormonali e, per tale motivo, non si manifestano con una sintomatologia caratteristica. Queste forme neoplastiche possono comunque provocare sintomi aspecifici imputabili alla massa tumorale, come dolore addominale, ittero, occlusione intestinale o calo ponderale. Per questi motivi, vengono spesso diagnosticati tardivamente o in via occasionale nel contesto di indagini strumentali routinarie o effettuate per altre patologie. I tumori neuroendocrini non funzionanti più frequenti sono quelli del pancreas, dove troviamo forme di grosse dimensioni perché non dando una sindrome clinica identificabile si notano solo quando infiltrano organi vicini o danno dolore per l'effetto massa che sviluppa e spesso ci sono già metastasi presenti (IV).

2.3 I marcatori tumorali

I marcatori tumorali sono proteine, ormoni o altre sostanze presenti nel tumore o circolanti nell'organismo che possono segnalare la presenza di un tumore o di alcune sue caratteristiche. Si tratta di sostanze, infatti, che vengono sintetizzate direttamente dalle cellule neoplastiche: più raramente sono prodotte dall'organismo in risposta allo sviluppo del tumore. In alcune forme tumorali questi esami permettono di stabilire il grado di aggressività della neoplasia, anche indipendentemente dalle sue dimensioni. Più diffusa è la loro utilizzazione durante o dopo la cura allo scopo di stabilire se è in atto una ripresa della malattia. Mentre le altre indagini diagnostiche (esame istologico, radiografie, ecografie, RM) evidenziano direttamente la presenza di un tumore, i marcatori tumorali ne rilevano la presenza soltanto indirettamente. Ma proprio perché il loro segnale è indiretto, i markers possono avere un grande valore clinico. In una patologia così insidiosa come il tumore, essi possono lanciare un segnale di allarme molto prima che compaiano quei segni

clinici che mettono in allarme il paziente o il medico e talvolta anche prima che sia possibile identificarlo con altri strumenti diagnostici.

I marcatori utilizzati nello studio dei tumori neuroendocrini sono:

➤ **NSE (enolasi neurone specifica):**

Sebbene la enolasi neurospecifica (NSE) non sia un marcatore neuronale esclusivo, può essere utilizzata per l'identificazione di tumori dei nervi periferici, neurali e neuroendocrini, quali neuroblastomi, retinoblastomi, melanomi desmoplastici maligni, cancro polmonare a piccole cellule (50). Le enolasi sono state suddivise in tre gruppi principali in base alla posizione che occupano: la enolasi non neuronale (NNE o α), la enolasi muscolo specifica (MSE o β) e la enolasi neurospecifica (NSE o γ). L'anticorpo marca i tumori originati da o contenenti neuroni, cellule gangliari e nervi periferici. Per il carcinoma della prostata viene usata NSE neurospecifica che individua la presenza della sub unità gamma. Tuttavia possono essere marcati anche i tumori che non sono di origine neuronale, come meningiomi, medulloblastomi, astrocitomi, glioblastomi, oligoastrocitomi, oligodendrogliomi, adenomi pituitari, neurinomi, ependimomi, meningosarcomi, gliosarcomi e metastasi di varia origine (ad esempio melanomi, carcinomi a piccole cellule del polmone e carcinomi indifferenziati). Infine, la proteina è presente nei tumori a cellule germinali, come il carcinoma in situ del testicolo, il seminoma e il carcinoma embrionale (50).

➤ **CROMOGRANINA A**

La cromogranina A è una proteina che, al pari delle catecolamine viene secreta dalle cellule della midollare del surrene e del sistema nervoso simpatico. Il suo significato biologico è legato al controllo, maturazione, stabilizzazione e secrezione degli ormoni immagazzinati nei granuli densi ed allo sviluppo dei tessuti neuroendocrini. Il gene codificante la proteina è di 439 amminoacidi, con massa molecolare pari a 48kDa, è localizzato sul cromosoma 14. È stata descritta per la prima volta nel 1965 da Banks e Helle come proteina solubile isolata nei granuli cromaffini della midollare del surrene e nei neuroni del sistema nervoso simpatico (61). Tutte le cromogranine sono raccolte all'interno di granuli elettrondensi, contenenti anche altri ormoni peptidici, con i quali la CgA è cosecreta.

Studi successivi hanno dimostrato che la distribuzione di tale proteina era ben più complessa di quanto non si pensasse, essa infatti è contenuta nell'ipofisi (25%), nel pancreas (5%), nello stomaco (5%), nell'intestino (5%) e nelle rimanenti ghiandole endocrine (1%). In piccola

quantità è stata isolata anche dalle cellule neuroendocrine della ghiandola mammaria, del polmone e della prostata, nelle ghiandole sottomandibolari, nella milza, nei linfonodi nel timo e nel fegato. La distribuzione tissutale delle altre cromogranine non è stata ancora del tutto definita, ma sembra che esse siano presenti in molti tessuti. Il ruolo fisiologico di queste molecole non è chiaro; probabilmente esse intervengono nella regolazione della funzione dei granuli secretori; inoltre potrebbero essere precursori di peptidi biologicamente attivi (pro-ormoni). E' stato dimostrato che le cromogranine sono marcatori immunocitochimici dei tessuti neuroendocrini e quindi hanno valore diagnostico nei tumori che da questi derivano. In particolare si è visto che la CgA, largamente distribuita nelle cellule endocrine e neuroendocrine che producono peptidi, è un utile marcatore istologico di tumore endocrino benigno e maligno di varia origine, compreso il tumore prostatico.

2.4 Trattamento

Le opzioni di trattamento dipendono da vari fattori, come lo stadio del tumore, il tipo di tumore, i possibili effetti collaterali, le preferenze del paziente e la salute generale.

La chirurgia è sicuramente il trattamento elettivo, particolarmente efficace nelle forme biologicamente attive, in quanto, la rimozione del tumore primitivo, eventualmente associata all'asportazione delle metastasi, consente di ottenere una piena remissione dei sintomi. Consiste nella rimozione del tumore, con una piccola quantità di tessuto sano circostante.

La chirurgia laparoscopica è meno invasiva e utilizza tre o quattro piccole incisioni in cui è inserito un laparoscopio (un tubo sottile e illuminato) collegato ad una videocamera, attraverso una apertura, per guidare il chirurgo. Strumenti chirurgici vengono inseriti attraverso le altre aperture per eseguire l'intervento.

La radioterapia viene generalmente utilizzata quando un tumore neuroendocrino è diffuso o è in una posizione che rende difficile o impossibile l'intervento chirurgico. Gli effetti collaterali da radioterapia possono includere affaticamento, reazioni cutanee lievi, disturbi di stomaco e diarrea. La maggior parte degli effetti collaterali scompaiono al termine del trattamento.

La chemioterapia utilizza farmaci che distruggono le cellule tumorali, di solito fermando la capacità di crescere e dividersi. Un regime chemioterapico consiste solitamente di un numero specifico di cicli per un periodo di tempo stabilito. Un paziente può ricevere un farmaco alla volta o combinazioni di diversi farmaci contemporaneamente. Ci sono molti studi clinici in corso per studiare nuovi farmaci per i tumori neuroendocrini.

La terapia medica si avvale innanzitutto di farmaci capaci di controllare la sintomatologia, ma anche di farmaci quali gli analoghi della somatostatina (octreotide e lanreotide) in grado di agire come sintomatici, antiormonali, antineoplastici. Questi farmaci rappresentano l'unico tipo di terapia per quei tumori nei quali non è possibile intervenire chirurgicamente e sono un valido ausilio per la terapia chirurgica nel caso di persistenza di sintomi dopo l'intervento ed in presenza di metastasi non resecabili. Sono invece di supporto alla chirurgia nella fase preoperatoria, in attesa della localizzazione del tumore, nella fase intraoperatoria e postoperatoria per il controllo delle crisi da carcinoide scatenate dall'anestesia o dalla stessa manipolazione chirurgica.

Recenti studi hanno trovato che una combinazione di fluorouracile (Adrucil, 5-FU), doxorubicina (Adriamicina), e streptozocina (Zanosar) può ridurre gli effetti collaterali del trattamento

Capitolo 3

I tumori neuroendocrini della prostata

Deprivazione androgenica e/o trattamento antiandrogenico, determinerebbero nell'adenocarcinoma prostatico, incremento ed iperattivazione delle cellule neuroendocrine, come rilevato in immunohistochimica e dai rilievi sierici di cromogranina A, parallelamente alla ridotta espressione di recettori per gli androgeni da parte dell'oncotipo epiteliale ed alla progressiva acquisizione di un pattern ormono- refrattario (13)

Delle ammine biogene e dei peptidi ormonali sovra espressi nei tumori neuroendocrini prostatici, alcuni come serotonina, somatostatina, bombesina, calcitonina, sono propri del citotipo neuroendocrino prostatico, altri definiti ectotipi (ACTH, ADH, encefaline, endorfine, pro gastrina ecc.) assumono attitudini secretive atipiche da parte di cellule neoplastiche particolarmente differenziate. La somatostatina, ammina biogena propria di subpopolazioni cellulari neuroendocrine, oltre ad agire da neurotrasmettitore vasoattivo, è associata alla trasformazione maligna delle cellule epiteliali, tramite interazione con il recettore serotoninico (16-17).

La somatostatina ha effetti antiproliferativi sulle cellule epiteliali prostatiche, sia direttamente, inducendo tramite il legame con i sottotipi recettoriali SSTR3 e SSTR5, l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi, sia indirettamente, inibendo tramite blocco ipofisario del rilascio di GH, la produzione epatica e stromale prostatica di IGF 1, potente mitogeno nei confronti del citotipo epiteliale (18 20). Inoltre svolgerebbe un ruolo modulatorio sull'attività secretiva delle cellule neuroendocrine (19)

La ridotta espressione di CD10 (*neutral endopeptidasi*, NEP) per ipermetilazione del suo promotore genico, nell'oncotipo epiteliale androgeno-indipendente, comporta minor degradazione idrolitica dei neuro peptidi prodotti dalle cellule neuroendocrine, risultandone un'accentuazione dei loro effetti (21-22). Il decremento dell'espressione di marker come CD10, correlandosi allo sviluppo del fenotipo epiteliale ormono-refrattario, costituisce un marker di androgeno insensibilità tumorale (23).

Oltre ai neuro peptidi presi in considerazione, modelli sperimentali, hanno rilevato la differenziazione neuroendocrina a partire da meccanismi molecolari ben definiti. La differenziazione neuroendocrina sarebbe indotta da tre differenti segnali: deplezione androgenica, attività dell'interleuchina 6 ed incremento dei livelli di AMP ciclico. L'attività di queste molecole attiverebbe tutta una serie di segnali trasduzionali tipo la protein Chinasi A, Stat3 ed ERK/MAPK che indurrebbero differenziazione e conseguente espressione di markers neuroendocrini (13).

(figura 2)

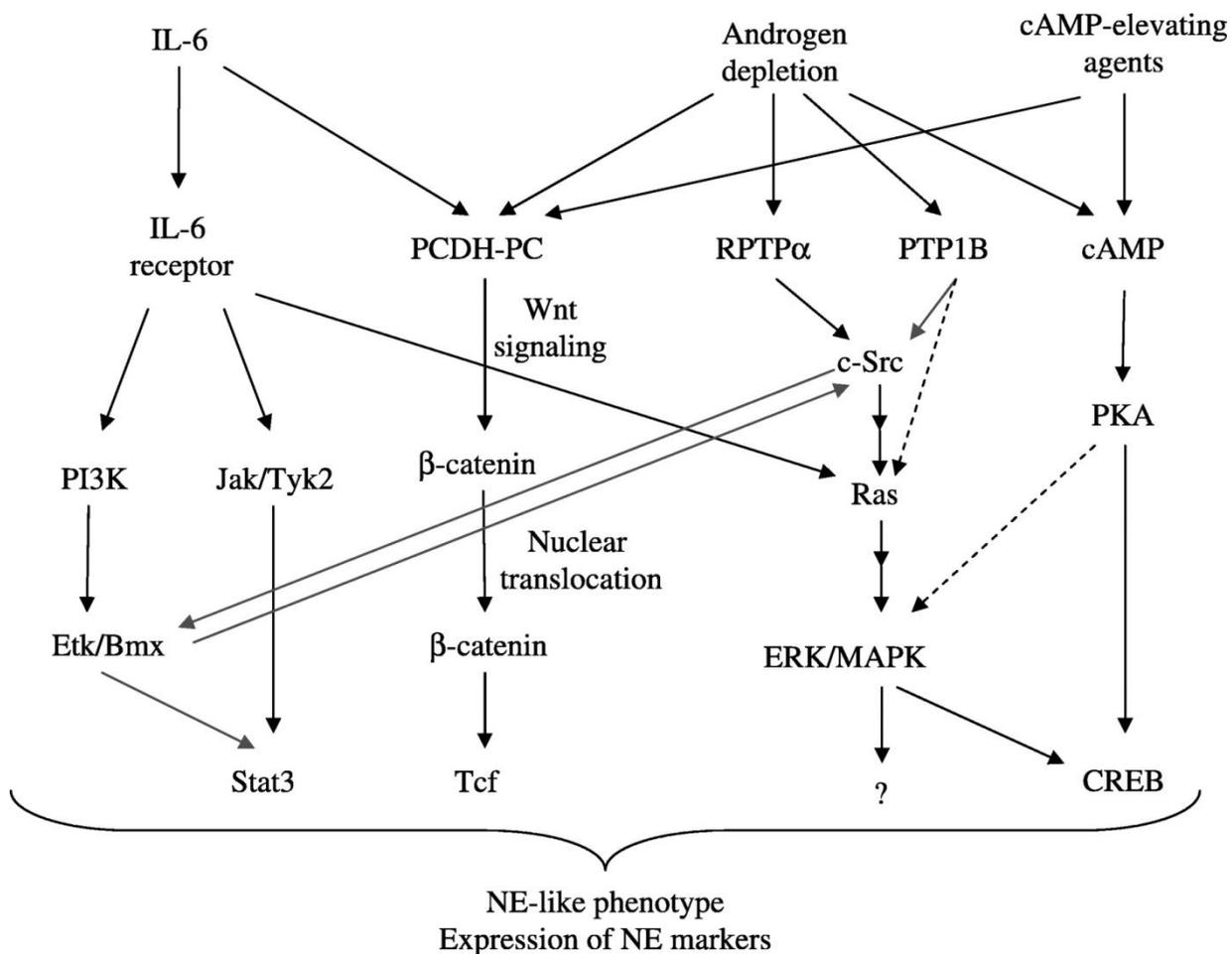


Figura 2: segnali trasduzionali associati con la neurodifferenziazione
(T.C. Yuan et al. Endocrine-Related Cancer 2007)

Connotazioni neuroendocrine dei carcinomi prostatici suggerirebbero una prognosi sfavorevole. Il comportamento aggressivo potrebbe essere ricondotto alla più frequente differenziazione neuroendocrina in carcinomi di elevato grado e stadio, e/o alla più rapida progressione tumorale mediata da fattori di crescita (VEGF *vascular endothelial growth factor*, EGF *epithelial growth factor*, KGF *keratinocyte growth factor*, IGF *insulin-like growth factor*), il cui stimolo proliferativo verrebbe amplificato dai prodotti delle cellule neuroendocrine (bombesina, serotonina, calcitonina ecc.) (24-25). Accentuati effetti antiapoptotici favorevoli l'evoluzione neoplastica, potrebbero essere indotti dalla sovra espressione del proto oncogene bcl- 2 nell'oncotipo epiteliale androgeno-refrattario, amplificata da prodotti delle cellule neuroendocrine a valenza inibitoria sull'apoptosi, quale la survivina (26-27 -28). Risulta interessante, a questo proposito, la costatazione di stretti rapporti di contiguità tra agglomerati di cellule neuroendocrine e foci di maggior attività proliferativa epiteliale, come rilevato dal parallelo incremento di concentrazioni tissutali di enolasi neurono- specifica e bcl- 2 (27). Selettivi vantaggi antiapoptotici di cellule carcinomatose particolarmente differenziate, potrebbero conseguire a sregolata espressione del gene PARM

(*prostatic androgen- repressed message*) incrementando l'attività telomerasica, oltre che a sovra espressione di bcl- 2 (29)

Intensa attività immunohistochimica per il VEGF è stata rilevata insieme alla cromogranina A, in cluster di cellule neuroendocrine nell'ambito di PIN di alto grado e carcinoma prostatico, suggerendo come popolazioni di cellule neuroendocrine siano in grado di modulare direttamente la neuro angiogenesi (24).

La somatostatina al contrario, esercita un ruolo inibitorio sulla cinetica cellulare ed è in grado di rimuovere gli effetti antiapoptotici di vari prodotti delle cellule neuroendocrine, rendendo l'oncotipo epiteliale prostatico suscettibile, in determinate condizioni, a trattamenti antineoplastici (24).

3.2 Acido valproico (VPA): caratteristiche e meccanismo d'azione

Recenti studi hanno riportato che l'Acido Valproico ha la capacità di indurre neuro differenziazione in cellule di tumore prostatico (61). È un farmaco molto potente usato generalmente nel trattamento dell'epilessia e dei disordini bipolari. Nuove frontiere di ricerca hanno analizzato l'azione dell'acido in varie patologie anche su base genetica. Tutto è cominciato alla fine del 2001, quando un gruppo di studiosi ha scoperto che il VPA può inibire l'azione di certi enzimi nucleari chiamati istone deacetilasi (HDACs). Questi enzimi zinco-dipendenti rimuovono dagli istoni i gruppi acetilici aggiunti da un'altra classe di enzimi, le istone acetiltrasferasi (HATs). Mentre l'azione delle HATs è quella di attivare l'espressione genica, quella delle HDACs è di inibirla. Esattamente bloccando le HDACs, si permette ad uno o più geni di continuare ad esprimersi, o si permette l'espressione di geni che normalmente non dovrebbero appartenere ad una determinata risposta biochimica. L'acido valproico bloccando le HDAC agisce a livello della cromatina modificando la sua struttura in una forma "aperta" che favorisce la trascrizione e porta all'attivazione dell'espressione genica (60-61-62) (figura 3)

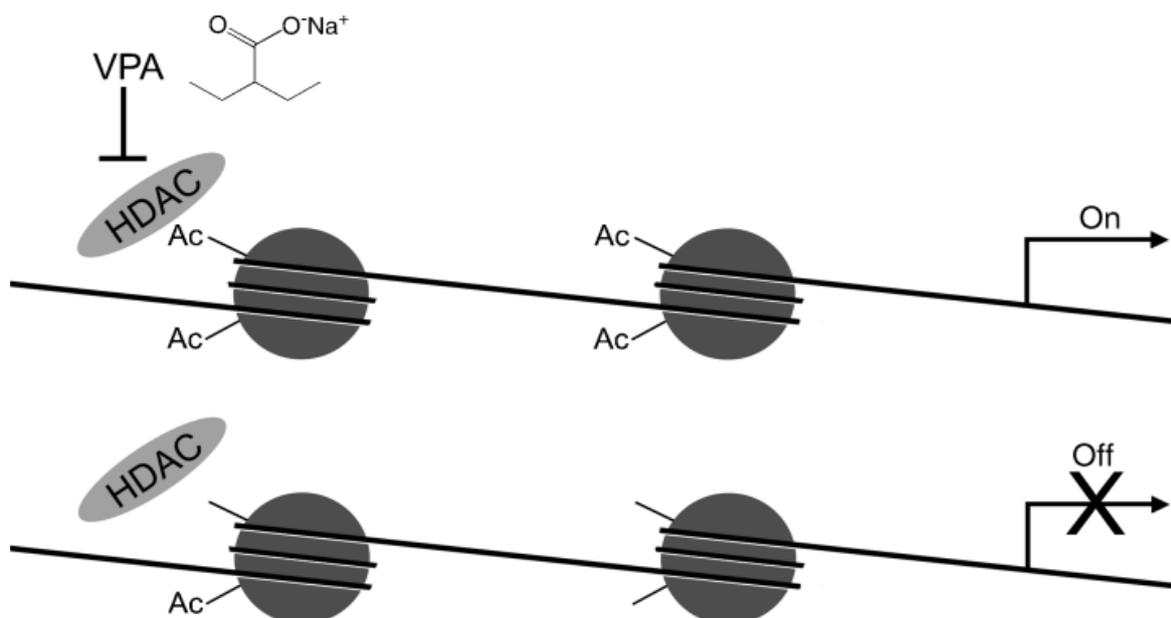


Figura 3. Meccanismo dell'acido valproico (VPA) sull'espressione genica mediante inibizione della istone deacetilasi (J. Van Bergeijk et al. Chem Biol Drug Des 2006)

Nelle cellule LNCaP esso promuove una differenziazione neuroendocrina caratterizzata da un aumento nell'espressione dell'enolasi neurone-specifica (NSE), una diminuzione di PSA e dell'espressione del recettore degli androgeni (AR), suggerendo un ruolo di tale farmaco nella risposta agli androgeni. (60-61)

3.3 Fenotipo morfofunzionale delle cellule neuroendocrine della prostata

Cellule di tipo endocrino-paracrino sono state individuate nella prostata sessant'anni fa, queste cellule sono molto numerose alla nascita in tutto il contesto ghiandolare, scomparendo però nella zona periferica per poi riapparire alla pubertà. Sono particolarmente numerose tra i 25 e i 45 anni d'età, prevalendo nei dotti maggiori periuretrali rispetto al tessuto acinare periferico (30). Esse costituiscono la terza popolazione di cellule ghiandolari prostatiche dopo le cellule epiteliali luminali-esocrine e basali (24-31)

La caratterizzazione morfologica identifica due tipi cellulari: uno aperto, a fiaschetta (flask-shake opened type), rappresentativo nel compartimento secretorio e provvisto di sottili prolungamenti citoplasmatici, che raggiungono il lume ghiandolare, in analogia con le cellule epiteliali sensoriali gustative ed olfattive; l'altro chiuso (close type) sito in sede profonda epiteliale, a diretto contatto con la rete capillare vascolare, privo di allungamenti. Entrambi i tipi cellulari però sono dotati di finissime arborizzazioni che si dipanano al di sotto e tra le cellule epiteliali adiacenti.

L'ipotesi di una loro origine ectodermica per migrazione dalla cresta neurale ritenuta infondata dai sostenitori della differenziazione tridirezionale della cellula staminale in citotipo epiteliale basale,

citotipo epiteliale esocrino e citotipo neuroendocrino (13-33) (stem pluripotent cell model), è stata recentemente rivalutata sulla base di rilievi nell'embrione, di una migrazione sequenziale di cellule immunoreattive alla cromogranina A, dalla cresta neurale ai paragangli iuxtaprostatici e, da questi, al mesenchima e all'epitelio dutto-acinare della prostata, senza condividere quindi con l'epitelio ghiandolare prostatico l'origine del seno urogenitale (12-32).

Indipendentemente dall'origine embriologica, neuro ectodermica o endodermica, le cellule neuroendocrine sono dotate di un fenotipo comune, caratterizzato dall'espressione simultanea di marcatori neuronali (cromogranine, sinaptofisina, enolasi neurono-specifica) ed ormonali peptidici, che vengono rilevati tramite:

- *microscopia ottica*: argirofilia indotta dalle cromogranine A,B,C, ed argentaffinità laddove è presente serotonina;
- *microscopia elettronica a trasmissione*: granuli secretori citoplasmatici, a nucleo denso di cromogranine, nonché piccole vesciche chiare contenenti sinaptofisina, analoghe alle vescicole presinaptiche dei neuroni;
- *immunoistochimica*: selettiva differenziazione tra marcatori neuronali, comuni a tutte le cellule neuroendocrine e marcatori specifici quali ammine biogene (serotonina, dopamina) e peptidi ormonali (somatostatina, calcitonina, catecolamina, calcitonin-gene related peptide CGRP, bombesina, parathyroid hormone-related peptide PTHrP), propri delle diverse sottopopolazioni cellulari neuroendocrine;
- *ibridazione in situ*: individuazione di mRNA diretti alla sintesi di prodotti neuroendocrini (tipo cromogranine) e di composti recettoriali (ad esempio i recettori somatostatinici).

L'acquisizione del fenotipo ormonoproduttivo caratteristico dei vari isotipi neuroendocrini è un evento differenziativo terminale, per cui la molteplicità degli ormoni sintetizzati non implica necessariamente policlonalità dei citotipi differenti.

Il ruolo funzionale delle cellule neuroendocrine consiste nel modulare con modalità paracrina, l'accrescimento, la differenziazione e la secrezione delle strutture ghiandolari prostatiche, in un network con vari ormoni.

In talune sottopopolazioni cellulari sono espressi recettori per fattori di crescita, in particolare per EGF, mentre sono assenti recettori per gli androgeni (androgeno-indipendenza).

A livello del collicolo seminale il maggior numero di cellule neuroendocrine presenti nel tessuto otricolare, piuttosto che nei grossi dotti prostatici, e nei dotti eiaculatori, suggerisce un loro coinvolgimento nella regolazione della fertilità.

3.4 La diagnosi differenziale

La diagnosi di differenziazione neuroendocrina, in patologia neoplastica della prostata, emerge solamente all'esame istologico, nonostante sia ormai consolidata l'affidabilità della determinazione sierica dei marcatori neuroendocrini, sia generici (cromogranina A, enolasi neurone specifica) sia fenotipo-specifici per le diverse subpopolazioni cellulari neuroendocrine.

Il viraggio a volte da alte a basse concentrazioni plasmatiche di PSA, in parallelo con l'incremento di marcatori neuroendocrini, riflette l'acquisizione del pattern neuroendocrino da parte della neoplasia che, quasi sempre, coincide con la riduzione dell'espressione recettoriale per gli androgeni nell'oncotipo epiteliale, o con la graduale prevalenza di cloni cellulari originariamente privi di tali recettori (12-24).

La cromogranina A si configura come precoce marker di iperattivazione del citotipo neuroendocrino, correlata a progressione e metastatizzazione del carcinoma prostatico in fase di ormone indipendenza, anche se a volte per carcinomi particolarmente indifferenziati si è rivelata presenza di cromogranina B (34-35).

L'enolasi neurone specifica costituirebbe, secondo alcuni autori, un marcatore più attendibile per il cancro prostatico localmente circoscritto. In realtà circa l'affidabilità dei markers tumorali utili nella diagnosi, le opinioni sono tutt'altro che univoche, tanto da non accreditare alcun significato prognostico alla cromogranina A nelle fasi avanzate di carcinoma prostatico, in cui invece, i livelli ematici di enolasi neurone specifica potrebbero risultare talmente affidabili da essere assunti quali indicatori di sensibilità al trattamento radiante palliativo delle localizzazioni metastatiche ossee. Si potrebbe però obiettare che il decremento talora osservato di enolasi neurone specifica, ma non di cromogranina A dopo radioterapia palliativa, è attribuibile invece a radio suscettibilità di citotipi prostatici non necessariamente neuroendocrini, che esprimono isomeri enolasici tra i quali gli anticorpi anti-NSE che possono legarsi indistintamente in immunoassay (36).

Il trattamento androgeno-ablativo intermittente, comporta un più tardivo incremento dei livelli tissutali dell'mRNA per la cromogranina A e della cromogranina A, rispetto alla deprivazione androgenica ininterrotta, a causa di minore attivazione delle cellule neuroendocrine. Medesimo risultato verrebbe conseguito dalla ionoterapia antiandrogena non steroidea (bicalutamide) (37).

La diagnosi di localizzazione (sede primitiva e metastasi) dei tumori neuroendocrini si avvale di tecniche di immagine morfo-funzionale, tra le quali troviamo:

- Scintigrafia recettoriale per la somatostatina(38).
- Immunoscintigrafia "three step" con anticorpi monoclonali anticromogranina A
- PET, β positron emission tomography, con ^{11}C -5-OH-triptofano(40).

3.5 Terapia

Due concetti generali guidano la scelta mirata dei vari approcci terapeutici:

- il citotipo neuroendocrino, che è caratterizzato da terminalità differenziativa, status post- mitotico in fase G0, attitudini antiapoptotiche, assenza di recettori per gli androgeni;
- i prodotti neuroendocrini, che sono in grado di esercitare influenza di opposta valenza sulla citocinetica della componente epiteliale prostatica.

Ne conseguono da un lato, la resistenza dell'oncotipo neuroendocrino a trattamenti che presuppongono cellule proliferanti, integrità del sistema apoptotico (chemioterapia, radioterapia) e sensibilità alla manipolazione ormonale (terapia androgeno –ablattiva e antiandrogena) e, dall'altro, la suscettibilità dell'oncotipo epiteliale prostatico alla farmaco manipolazione neuroendocrina.

Così per i rarissimi tumori neuroendocrini "puri" della prostata (carcinoide *oat cell carcinoma*), come per i più frequenti tumori neuroendocrini d'altra sede (intestino, pancreas, ghiandole endocrine ecc.), solo la chirurgia riveste, per le forme localizzate, un ruolo curativo.

Risulta invece finalizzata al controllo dei sintomi ed alla limitazione della progressione tumorale, la terapia recettoriale con analoghi somatostatinici di sintesi (octreotide, lanreotide, vapreotide-RC160, octastatine), dotati di emivita più lunga di quella della somatostatina naturale e associati talora a somministrazione di α - interferon.

La chemioterapia (streptozotocina, clorozotocina, etoposide, cisplatino, doxorubicina ecc.), in riferimento a quanto premesso, non trova un razionale impiego in tali neoplasie e risulta mal tollerata. Tuttavia qualche sporadico successo è stato segnalato, associando ai chemioterapici (carboplatino etoposide) un analogo somatostatinico (lanreotide). Dei cinque sottotipi recettoriali somatostatinici, octreotide e lanreotide legano selettivamente il sottotipo 2 la cui interazione media gli effetti antiproliferativi cellulari e il sottotipo 5, nonché in misura minore il sottotipo 3; mentre hanno bassa affinità per il sottotipo 1. L'assenza di espressione del recettore 2 comporta insensibilità tumorale all'analogo somatostatinico. Selettive affinità per il sottotipo recettoriale 4 da parte degli analoghi somatostatinici recentemente sviluppati, fanno prefigurare un loro impiego terapeutico per il carcinoma della prostata a differenziazione neuroendocrina (41).

Si è pensato anche di ripristinare qualora fosse assente nel carcinoma prostatico a differenziazione neuroendocrina, l'espressione del recettore CD10 (neuro- endopeptidasi), allo scopo di inattivare i peptidi neuroendocrini favorenti la progressione tumorale (22-23).

La suscettibilità dell'oncotipo epiteliale prostatico alla terapia recettoriale somatostatinica è stata ampiamente rilevata. Concorrerebbero a ciò vari meccanismi, tra i quali l'inibizione diretta della crescita tumorale prostatica tramite interazioni della somatostatina con specifici recettori di

membrana delle cellule epiteliali prostatiche, in particolare i sottotipi recettoriali 1 e 5 sono maggiormente rappresentati nel cancro prostatico localmente circoscritto, mentre quelli 2 e 5 sono prevalenti nelle localizzazioni metastatiche).

Gli analoghi della somatostatina (octreotide, lanreotide ecc.) possono essere impiegati in ionoterapia o in associazione a:

- LH-RH agonisti o antiagonisti (Cetrorelix), di cui potenziano gli effetti, quando ancora persiste una certa sensibilità dell'oncotipo epiteliale prostatico al trattamento androgeno ablativo (42-43);
- Estrogeni (etinilestradiolo), dotati di effetti antigonadotropi ed anche direttamente citotossici sull'oncotipo epiteliale prostatico;
- Corticosteroidi glicocorticoidi (desametasone), data la presenza, in cellule tumorali androgeno-refrattarie di recettori mutanti, responsivi ai glicocorticoidi (43)

Capitolo 4

Materiali e Metodi

Materiali e metodi

Per il nostro studio sono stati utilizzati preparati istologici in possesso dell'archivio dell'Unità Operativa di Anatomia Patologica dall'Azienda Ospedaliera di Cosenza.

La ricerca è stata sviluppata in due fasi: una prima fase sperimentale "in vivo" e seconda fase sperimentale "in vitro".

A) L'analisi dei campioni biotici ha previsto:

- [1] La valutazione dello status immunofenotipico
- [2] La caratterizzazione morfologica in microscopia confocale
- [3] L'analisi del profilo terapeutico

B) L'analisi dei dati in vitro ha previsto:

- [1] Lo sviluppo di colture cellulari di LNCaP sia wild type che sottoposte a trattamento sperimentale per la differenziazione neuroendocrina
- [2] L'analisi del fenotipo cellulare tramite microscopia ottica e valutazione dell'espressione proteica tramite tecnica di Western Blot

4.1 Prima fase sperimentale

Per la valutazione del profilo immunofenotipico sono stati esaminati 200 casi di biopsie di ghiandola prostatica neoplastica precedentemente tipizzate come:

1. Adenocarcinoma prostatico ben differenziato
2. Adenocarcinoma prostatico poco differenziato
3. Neoplasia intraepiteliale benigna di alto grado (PIN)

La composizione del campione è descritta nella seguente tabella 1:

Tipi di Neoplasia	Numero casi	Percentuale
Adenocarcinoma prostatico ben differenziato	90	45%
Adenocarcinoma prostatico poco differenziato	40	20%
Neoplasia intraepiteliale benigna di alto grado	70	35%

Tabella 1

Unitamente , sono stati esaminati i prelievi bioptici provenienti da 250 casi di pazienti affetti da adenocarcinoma prostatico poco e ben differenziato, sottoposti a terapia antiandrogenica per controllarne l'esito del trattamento.

La composizione del campione è descritta nella tabella 2:

Tipi di Neoplasia	Numero casi
Adenocarcinoma prostatico ben differenziato	170
Adenocarcinoma prostatico poco differenziato	80

Tabella 2

Su entrambi i gruppi di pazienti riportati in Tabella 1 e 2 sono stati effettuati saggi di immunoistochimica ed immunofluorescenza per testare i seguenti markers :

- Recettore androgenico
- Cromogranina A

4.2 Allestimento dei campioni biologici

Dal momento in cui si effettua il prelievo bioptico a quello in cui si osservano i preparati colorati con reazioni immunoistochimiche al microscopio ottico, sono necessari diversi passaggi per la corretta preparazione del materiale da trattare. Per l'analisi dei campioni istologici si utilizzano le normali procedure di allestimento delle sezioni di diagnostica istomorfologica. Queste consistono in una procedura di fissazione, processazione caratterizzata da disidratazione, chiarificazione ed infiltrazione, inclusione in paraffina e in ultimo taglio al microtomo.

4.2.a Fissazione

Dopo il prelievo, i campioni sono stati fissati con formalina tamponata al 4%. La formaldeide risulta essere il fissativo più adatto per l'immunoistochimica in quanto possiede un elevato grado di penetrazione, non provoca eccessivo indurimento dei tessuti e non dissolve i lipidi.

La formalina determina legami crociati fra le molecole costituenti i tessuti, alterandone così la configurazione spaziale e determinando quindi come conseguenza l'impossibilità da parte degli anticorpi specifici di legarsi all'epitopo e quindi creare reattività aspecifiche. E' necessario perciò intervenire con sistemi che consentano di recuperare l'antigenicità. Per ottenere una buona

morfologia e prevenire il mascheramento degli antigeni, il tempo di fissazione è critico, dovrebbe essere il più breve possibile e risulta compreso tra 2 e 24 ore a seconda delle dimensioni dei pezzi.

4.2.b Processazione

La fase di processazione dura circa 12 ore, viene eseguita con il processore automatico e comprende le seguenti fasi: disidratazione, chiarificazione ed infiltrazione.

La disidratazione del tessuto avviene utilizzando in serie alcool a concentrazione progressivamente crescente, dal 25% al 100%, per tempi di permanenza, in ciascuna concentrazione, variabili da 15 minuti a un'ora a seconda delle dimensioni dei pezzi.

La chiarificazione avviene nello xilene, comunemente usato nei laboratori per le procedure di routine. I tempi di permanenza nei diafanizzanti, benché in funzione delle dimensioni del pezzo, non devono essere troppo lunghi. Quando i campioni ne sono completamente imbevuti, acquistano un aspetto trasparente (diafano). Questa caratteristica permette di riconoscere se il pezzo è stato completamente disidratato. Se dopo una adeguata chiarificazione è rimasta acqua nei pezzi, la loro parte centrale rimane invece opaca e bianchiccia. In tal caso è opportuno effettuare una nuova disidratazione perché una quota di acqua è ancora presente nelle aree opache.

L'infiltrazione consiste nella permanenza del pezzo chiarificato nel mezzo di inclusione fuso per un periodo sufficientemente lungo da consentire la penetrazione nei più profondi interstizi del campione, dapprima occupati dalle molecole di acqua e poi progressivamente sostituite da concentrazioni crescenti di alcoli e infine da agenti diafanizzanti. Lo scopo di questi passaggi è quello di trasformare i tessuti che hanno composizione ed elasticità diversa in una massa omogenea affinché, durante il taglio, la lama non incontri differenza di consistenza.

4.2 c Inclusione

Il pezzo ben impregnato viene posto in una apposita formella di materiale plastico o metallico e ricoperto con il mezzo d'inclusione fuso, al quale può essere aggiunto un supporto che funga da base di aggancio per il microtomo. Il tutto viene lasciato solidificare.

Il mezzo usato è la paraffina per la sua maneggevolezza e la sua economicità. Per evitare deformazioni del campione durante il taglio, la paraffina deve possedere alcune caratteristiche di durezza; per questa ragione spesso si utilizzano paraffine combinate con composti plastici (histowax, paraplast) che, essendo molto purificate, presentano infiltrazione ottimale e maggiore consistenza al taglio. Per risultati migliori si consiglia l'inclusione in paraffina pura perché essa può essere completamente e facilmente rimossa dal tessuto al momento della colorazione.

Per migliorare la consistenza del mezzo di inclusione, prima del taglio il blocchetto di paraffina può essere raffreddato a -20°C. Per evitare l'arricciamento della sezione, è consigliabile utilizzare una

vaschetta di plastica riempita di acqua e applicata alla lama, la quale permetterà alla sezione appena tagliata di stendersi per essere poi raccolta agevolmente sul vetrino. Le sezioni vengono fatte essiccare mediante incubazione per una notte a 37° C o per 1 ora a 60°C. Quindi possono essere conservate a temperatura ambiente.

4.2 d Taglio al microtomo

Il campione incluso in un blocchetto solidificato è pronto per essere tagliato con un microtomo. Vengono utilizzati due tipi di microtomi a slitta e a rotazione. Le lame rappresentano lo strumento di taglio vero e proprio, di conseguenza una lama non sufficientemente affilata produce cattive sezioni anche dai preparati migliori. Risulta quindi importante la qualità dell'affilatura. La velocità di taglio dipende dal mezzo di inclusione utilizzato e può essere progressivamente aumentata dai preparati congelati, a quelli inclusi in paraffina tenera o in celloidina fino ai mezzi più consistenti. E' pertanto consigliabile ricercare di volta in volta la velocità di taglio ottimale, correggere l'inclinazione della lama, verificarne l'accurata fissazione al suo supporto e controllare la temperatura dell'ambiente. Lo spessore di una sezione in paraffina è di 3-4µm.

4.3 Microscopia ottica

Per poter osservare i campioni al M.O, i vetrini sono stati sparaffinati e sottoposti alla colorazione ematossilina-eosina, (come riportato in tabella 3), atta a mettere in evidenza le diverse tipologie cellulari e le strutture di quest'ultime. Le sezioni sono state successivamente osservate e fotografate al microscopio ottico Olympus BX51 attraverso il sistema di digitalizzazione di immagine Dotslide-virtual microscopy .

Protocollo di sparaffinatura e colorazione per Microscopia Ottica	
Xilolo	1 passaggio da 5'
Etanolo assoluto	2 passaggi da 2'
Etanolo al 95%	1 passaggio da 2'
Acqua distillata	1 passaggio da 2'
Emallume di Mayer	1 passaggio da 4'
Acqua corrente	1 passaggio da 6'
Eosina 1% acquosa	1 passaggio da 1'
Acqua corrente	1 passaggio da 1'
Disidratazione in etanolo assoluto	3 passaggi da 1'
Diafanizzare in Xilolo	2 passaggi da 5'
Montaggio automatizzato	

Tabella 3

4.4 Immunoistochimica

L'immunoistochimica è una tecnica che riveste un ruolo molto importante nella routine del laboratorio di anatomia patologica; è in grado infatti di individuare specifiche molecole o strutture del compartimento intra ed extra cellulare. La tecnica immunoistochimica si basa sul principio di coniugazione antigene-anticorpo in addizione poi con sistemi di rivelazione (enzimatici, fluorescenti) che ne rendono visibile l'avvenuta reazione al microscopio.

Esistono metodiche dirette o indirette. Nelle metodiche dirette si utilizza un unico anticorpo marcato e diretto contro la molecola da ricercare. Nelle metodiche indirette si utilizzano due anticorpi: il primo diretto contro la molecola da ricercare, il secondo, coniugato con il marcatore, diretto contro il primo anticorpo. Nelle metodiche indirette è necessario che il secondo anticorpo provenga da specie differenti da quella da cui è stato prodotto il primario perché altrimenti non sarebbe riconosciuto come antigene. Il primo tentativo che ha dato successo fu quello della coniugazione dell'anticorpo secondario con un enzima in grado di convertire un substrato solubile in ambiente acquoso, insolubile con sua conseguente precipitazione nella sede della reazione antigene-anticorpo. Il primo enzima proposto a tale scopo fu la perossidasi di rafano, combinata con un substrato costituito da una amina aromatica (diaminobenzidina tetraidrocloruro = DAB). Successivamente vennero proposti altri enzimi quali: la glucosio ossidasi, la fosfatasi alcalina e la beta-galattosidasi. Il vantaggio di questo metodo era rappresentato dalla rapidità della reazione, essendo in grado l'enzima di convertire in pochi minuti una quantità enorme di substrato cromogeno che in seguito a precipitazione rende possibile la visualizzazione dell'immunocomplesso. Le caratteristiche antigeniche del preparato assumono fondamentale importanza nell'immunoistochimica dato che tale metodica si basa sulla formazione degli immunocomplessi; una corretta esecuzione del protocollo per l'allestimento dei campioni biologici, contribuisce al mantenimento dell'antigenicità delle molecole.

Nel nostro esperimento è stata applicata la metodica indiretta.

4.5 Tecnica di immunoenzimatica: metodica manuale

Dai preparati di tessuto fissati in formalina ed inclusi in paraffina, si sono ottenute sezioni dello spessore di 4 μm , le quali sono state raccolte su appositi vetrini polarizzati. I preparati così ottenuti vengono poi asciugati mediante trattamento in stufa a 37°C over night.

4.5 a Smascheramento antigenico

Alcune volte può succedere che, a causa dei processi che subisce il materiale biologico, dal momento del prelievo fino all'effettuazione della reazione immunoistochimica, l'antigenicità possa essere modificata, ovvero l'antigene pur essendo presente nel tessuto non è in grado di formare il complesso immune. A tale scopo si procede con la fase di smascheramento antigenico. Tra le tecniche più recenti di recupero dell'antigenicità riscontriamo l'utilizzo del bagno termostato che prevede il riscaldamento delle sezioni istologiche in un bagnomaria, combinando una temperatura di 98 °C con l'utilizzo dei tamponi citrato a pH 6,0 e EDTA a pH 8,0. Nel nostro caso lo smascheramento antigenico è stato effettuato mediante strumento PT-link, Pre-Treatment Module for Tissue Specimens. Con questo nuovo strumento PT link non occorre effettuare la sparaffinatura manuale (come riportato nel paragrafo 4.4.1), si utilizzano soluzioni di tampone trisfosfato da preparare al momento in quantità di circa 2 litri.

4.5 b Inibizione della perossidasi endogena

Per le reazioni immunoenzimatiche è necessario l'uso di anticorpi coniugati con un enzima oppure sistemi che veicolano una molecola enzimatica usata come tracciante. È necessario che l'enzima sia reperibile in forma pura, abbia un basso peso molecolare, non denaturi l'immunoglobulina vettrice, conservi la propria attività dopo coniugazione, formi legami stabili con l'anticorpo utilizzato e risulti assente nei tessuti. Anche se è difficile riscontrare in un unico enzima tutte queste caratteristiche, vi sono quattro molecole che più le rispettano, una di queste è la perossidasi. Si tratta di un enzima ottenuto dal rafano che forma con l'immunoglobulina legami covalenti, ed ha la funzione di catalizzare reazioni di ossido-riduzione, che prevedono l'ossidazione di un cromogeno da parte di elettroni rilasciati da un substrato. È proprio per questo motivo che dopo lo smascheramento, il passaggio fondamentale è bloccare la perossidasi endogena, che essendo presente nel tessuto, dà luogo a reazioni aspecifiche non causata dal legame Ag-Ab. Per questo motivo le sezioni sono state trattate con una soluzione costituita da perossido di idrogeno (H₂O₂) 1,5% già pronta all'uso e fornita dalla ditta Dako, atta ad inibire l'attività perossidasi endogena. Le sezioni vengono immerse nella soluzione appena preparata per 5 minuti a temperatura ambiente, e successivamente accuratamente lavate in acqua distillata e immerse in tampone PBS per 5 minuti.

4.5 c Applicazione degli anticorpi e del sistema di rivelazione

Le sezioni precedentemente lavate con PBS vengono trattate con gli anticorpi primari (di cui si specifica in Tab 6), poste in camera umida a temperatura ambiente e lasciate ad incubare. Successivamente le sezioni vengono lavate con tampone PBS e applicato il sistema di rilevazione.

Terminata l'incubazione, le sezioni vengono nuovamente lavate con il tampone e immerse in una soluzione costituita dal tampone di riferimento in cui vengono disciolti 50 milligrammi di 3-3'-Diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB) con H₂O₂ (100µl/100ml Tampone PBS). Il sistema DAB contiene diaminobenzidina che produce un colore marrone nel sito dell'antigene riconosciuto dall'anticorpo primario. Il colore marrone deve essere visibile nel campione di controllo positivo nel punto in cui è prevista la presenza dell'antigene bersaglio. I passaggi specifici previsti per l'immunoenzimatica sono riportati nella seguente tabella 4:

Per tutte le determinazioni sono stati utilizzati controlli positivi e negativi forniti dalle aziende produttrici gli anticorpi.

Incubazione con Anticorpo primario	30' in camera umida
Lavaggio in tampone PBS	1 passaggio di 5'
Applicare il sistema di rilevazione (Anticorpo secondario legato all'enzima)	30' a temperature ambiente
Lavaggio in Tampone PBS	1 passaggio di 5'
Applicazione del cromogeno diluito (DAB)	1 passaggio di 10'
Lavaggi in acqua distillata	1 lavaggio di 5'

Tabella 4

Nella tabella 6 sono elencati gli anticorpi utilizzati nella sperimentazione:

Anticorpo primario	Specie host	Diluizione	Casa produttrice
Anti- recettore Androgenico (AR)	Topo	1:75	Dako
Anti-Cromogranina –A (CgA)	Coniglio	Pronto all'uso	Dako
Anti NSE	Topo	Pronto all'uso	Dako

Tabella 6

4.5 d Colorante di contrasto

Una volta terminato il trattamento delle sezioni con l'anticorpo primario e applicato il sistema di rilevazione, le sezioni vengono contrastate con Ematossilina di Mayer. La colorazione di contrasto prevede il seguente protocollo:

- ✓ Immergere i vetrini in un bagno di ematossilina. Incubare per 2-5 minuti a seconda dell'intensità di ematossilina usata;
- ✓ Risciacquare rapidamente i vetrini con delicatezza in un bagno di acqua distillata o deionizzata;
- ✓ Porre i vetrini in un bagnomaria con acqua del rubinetto per 5'. Assicurarsi che tutta l'ematossilina residua sia stata eliminata;

A seconda della durata dell'incubazione e dell'intensità dell'ematossilina utilizzata, la colorazione di contrasto determinerà una colorazione variabile dei nuclei cellulari dal blu pallido al blu scuro. Una colorazione di contrasto eccessiva o incompleta può interferire con una corretta interpretazione dei risultati.

3.5 e Montaggio

Per il montaggio viene utilizzato il montatore automatico che ricopre i vetrini con un film plastificato.

4.6 Metodica immunoenzimatica automatizzata

I preparati di tessuto fissati in formalina ed inclusi in paraffina possono anche essere trattati con una metodica immunoenzimatica automatizzata. In questo caso precedentemente viene sempre effettuato lo smascheramento antigenico mediante strumento PT-link e successivamente le sezioni vengono caricate in un coloratore automatico che provvede ad effettuare la sparaffinatura e l'inibizione delle perossidasi endogene con le stesse caratteristiche della metodica manuale. Le sezioni vengono quindi lavate in acqua e poste in Tampone PBS, caricate nell'immunocoloratore Dako Autostainer (figura 1) e trattate con l'anticorpo specifico, con il reagente secondario e con il polimero contenente l'enzima di rivelazione.

Il programma dura all'incirca due ore e dipende dal numero di vetrini da trattare. Va ricordato che l'Autostainer effettua in modo del tutto automatizzato anche la colorazione di contrasto dei vetrini, quindi una volta terminato il programma si procede semplicemente con la fase di montaggio.



Figura 1 Dako Autostainer plus

4.7 Tecnica dell'immunofluorescenza

Le sezioni in paraffina destinate alla microscopia confocale sono state sottoposte alla tecnica dell'immunomarcatura indiretta (o immunofluorescenza indiretta). Prima di applicare il protocollo, i campioni sono stati sparaffinati e portati all'acqua utilizzando il protocollo di routine.

Nella tecnica di immunomarcatura indiretta, prima dell'incubazione con l'anticorpo primario, le sezioni vengono trattate con il siero normale proveniente dalla specie in cui è stato sviluppato l'anticorpo secondario per saturare eventuali siti antigenici aspecifici.

L'anticorpo primario è stato lasciato sulle sezioni overnight e sostituito, il giorno successivo, con un anticorpo secondario coniugato con la fluoresceina isotiocianato, al fine di monitorare l'espressione proteica. La fluoresceina isotiocianato che ha un proprio spettro di assorbimento e uno di emissione, è uno dei principali fluorocromi utilizzati nelle tecniche biologiche; infatti dopo essere stata eccitata ad una lunghezza d'onda di 495 nm, emette fluorescenza verde con lunghezza d'onda di 519 nm.

I nuclei delle cellule sono stati marcati con ioduro di propidio, un intercalante delle basi del DNA che emette fluorescenza di colore rosso. Le sezioni sono state poi osservate al microscopio confocale a scansione laser Leica TCS SP2. I passaggi specifici previsti per l'immunomarcatura indiretta sono riportati in tabella 7.

Protocollo di immunomarcatura indiretta	
Lavaggi in Tampone PBS	3 passaggi di 5'
Coprire le sezioni con Normal Serum 1:50	10' in camera umida
Incubazione con Anticorpo Primario	Overnight a 4°C in camera umida
Lavaggi in Tampone PBS	3 passaggi di 5'
Anticorpo secondario	30' in camera umida
Lavaggi in tampone PBS	3 lavaggi di 5'
Ioduro di propidio	1 lavaggio di 30''
Lavaggi in Tampone PBS	3-4 lavaggi veloci

Tabella 7

Per la fluorescenza sono stati utilizzati gli stessi anticorpi usati per l'immunoistochimica, coniugati con i diversi fluorocromi come indicato nelle tabelle 8/9 .

PRIMA FLUORESCENZA

Anticorpo primario	Specie host	Diluizione	Casa produttrice	Anticorpo secondario
Anti-AR	Mouse	1:50	Dako	TRIC anti mouse in goat
Anti-Cg-A	Rabbit	1:50	Dako	FITC anti-rabbit in goat

Tabella 8

SECONDA FLUORESCENZA

Anticorpo primario	Specie host	Diluizione	Casa produttrice	Anticorpo secondario
Anti-AR	Mouse	1:50	Dako	TRIC anti mouse in goat
Anti-Cg-A	Rabbit	1:50	Dako	FITC anti-rabbit in sheep

Tabella 9

4.8 Seconda fase sperimentale

Lo studio “in vitro” è stato condotto sulla linea cellulare di tumore prostatico LNCaP.

Abbiamo realizzato tre colture cellulari:

- [1] coltura cellulare wild type
- [2] coltura cellulare in mezzo deprivato di androgeni
- [3] coltura cellulare trattata con acido valproico

4.9 Cellule LNCaP

Sono cellule isolate da adenocarcinoma prostatico e prelevate tramite agoaspirazione da lesione metastatica di un linfonodo, sono androgeno-sensibili prelevate per la prima volta da un maschio caucasico nel 1977. Si tratta di cellule epiteliali aderenti che crescono facilmente in vitro sia in aggregati e sia come singole cellule; la linea cellulare è abbastanza stabile, le caratteristiche maligne sono ben mantenute e per questo vengono utilizzate da più tempo per gli studi in campo oncologico. Sono sensibili agli androgeni, infatti presentano specifici recettori degli androgeni essenziali per la loro crescita; ma il dato importante che le rende elettive per lo studio del carcinoma prostatico è che possono essere trasformate in cloni androgeno indipendenti se vengono mantenute “in vitro” in assenza di questi ormoni.

La differenziazione funzionale è messa in evidenza dall'espressione dell'antigene prostatico specifico (PSA) e dalla Fosfatasi acida prostatica umana (hAP). Sono entrambi antigeni di differenziazione dell'epitelio prostatico che indicano la presenza di recettori androgenici attivi nelle cellule. Rappresentano l'unica linea cellulare in commercio che esprimendo la hPAP consente lo studio della trascrizione di questo gene e di geni androgeno dipendenti.

4.10 Condizioni sperimentali

[1] Coltura cellulare Wild type

Le cellule LNCaP vengono mantenute in coltura in piastre nel mezzo RPMI 1640 arricchito del 5% di fetal bovin serum, dell'1% di penicillina/streptomicina e dell'1% di glutammina. Le cellule piastrate vengono mantenute in un incubatore a 37°C, in atmosfera umidificata al 95%, contenente il 5% di CO₂.

[2] Coltura cellulare in mezzo deprivato di androgeni

Per l'ottenimento della differenziazione neuroendocrina le cellule LNCaP sono state mantenute in coltura in piastre nello stesso mezzo RPMI 1640, deprivato di androgeni per 6/12 mesi. Dopo tale

periodo, l'osservazione delle cellule al microscopio ottico ci ha confermato il cambiamento della morfologia verso il fenotipo neuroendocrino (figure 2-3)

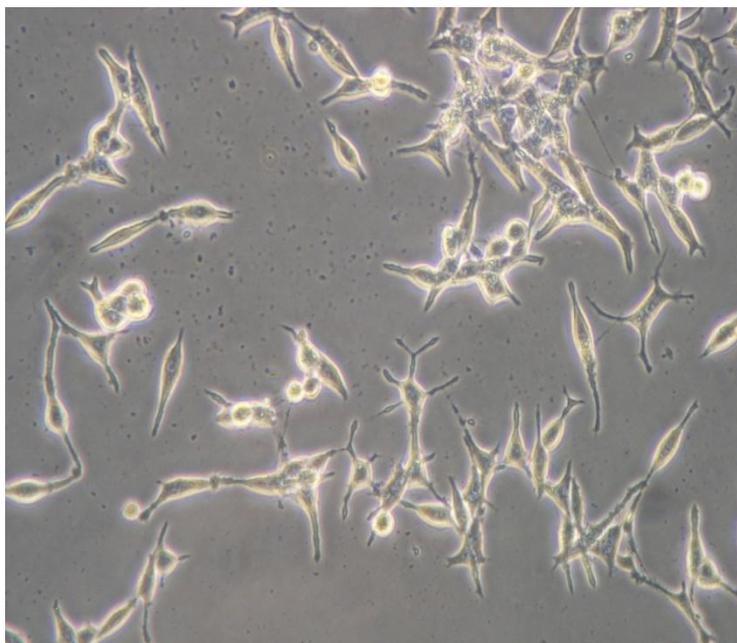


Figura 2:LNCap coltura Wild type, osservate al microscopio ottico (20x)

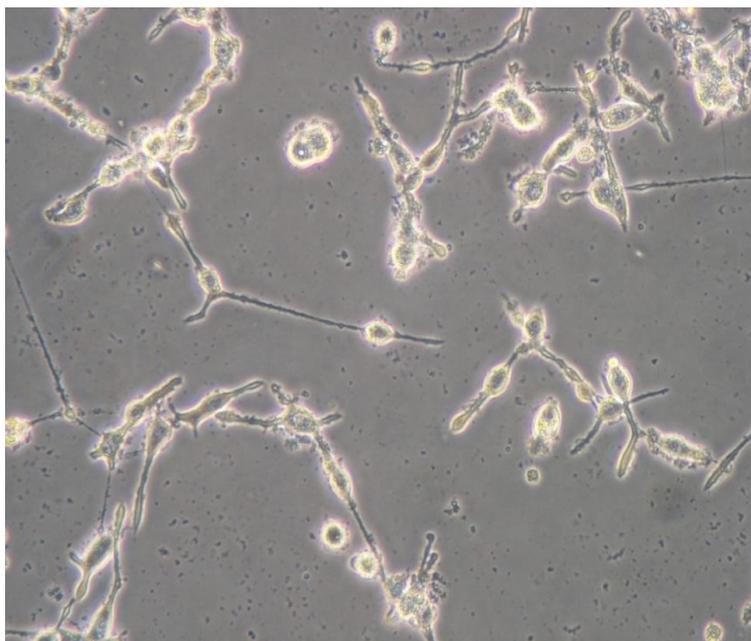


Figura 3: Forma assonale delle LNCap in coltura deprivata di androgeni (20x)

[3] **Coltura cellulare con acido valproico**

Un ulteriore metodo, alternativo al precedente, è il trattamento della linea cellulare LNCaP con acido valproico (1mM) , un inibitore delle deacetilasi, che consente di ottenere una completa differenziazione cellulare neuroendocrina in tempi molto più ristretti : 48/72 ore. Per tale motivo nel nostro studio abbiamo utilizzato quest'ultimo approccio metodologico che ha prodotto gli stessi risultati mostrati nella figura 3.

Protocollo sperimentale

Le cellule LNCaP , una volta piastrate sono state monitorate nella loro crescita tramite osservazione al microscopio e dopo aver raggiunto una confluenza pari al 70% (generalmente dopo 24h dalla piastratura) sono state rinnovate per 24h con un mezzo di coltura RPMI1640 deprivato di siero. Il giorno seguente un set cellulare di controllo continuava la sua crescita nel mezzo di cui sopra, mentre un secondo set veniva trattato per differenti tempi (24/48/72 ore) con acido valproico (1mM). Al termine dell'incubazione le cellule venivano raccolte , lisate e processate per l'analisi di W.B.

4.11 Preparazione degli estratti proteici cellulari e western blot

Dalle cellule, lisate con RIPA BUFFER arricchito di inibitori specifici per le proteasi, sono state estratte le proteine e dosate spettrofotometricamente secondo metodo Bradford (595nm).

Le proteine sono state separate su gel di poliacrilammide alla concentrazione dell'8% con SDS (SDS-PAGE). L'elettroforesi è stata condotta a voltaggio costante (100 V) per circa 2 ore.

Le proteine separate sono state trasferite su di un filtro di nitrocellulosa ed incubate di volta in volta con l'anticorpo primario specifico per la proteina di interesse.

Dopo incubazione con l'anticorpo secondario, coniugato alla perossidasi di rafano, le bande proteiche sono state rivelate mediante il kit ECL PLUS che contiene il substrato della perossidasi e il luminolo, il quale, in presenza di agenti ossidanti, esibisce chemiluminescenza ("ECL plus Western blotting detection system" e lastre HyperfilmTM, PerkinElmer Life Sciences).

Il segnale chemiluminescente viene impresso su lastra autoradiografica, utilizzando soluzioni di sviluppo e di fissaggio in camera buia.

Gli anticorpi utilizzati per la verifica delle proteine epiteliali e neuroendocrine sono descritti nella tabella seguente (tabella 10):

Anticorpo primario	Specie	Diluizione	Casa produttrice
Anti-AR	Murino	1:1000	Dako
Anti-Cg-A *	Topo	1:500	Prodotto in lab. [Corti et al.1996]
Anti-NSE	Murino	1:1000	Dako
Anti-PSA	Coniglio	1:1000	Dako
Anti-Ck 18	Murino	1:1000	Dako

Tabella 10

*L'anti-cromograninaA è un anticorpo monoclonale anti-mouse (5A8) , diretto verso il dominio NH2-terminale, specifico per l'uomo come riportato in letteratura [Corti et al., 1996 ; Pelagi et al., 1989]

Risultati

La nostra ricerca si è basata sulla valutazione di 450 casi totali di neoplasie prostatiche analizzate in tre anni di lavoro. Tale dato, rappresentativo di una casistica molto rilevante ci consente di dire che i risultati ottenuti e l'analisi eseguita, sono estremamente attendibili trattandosi di un valido campione d'indagine che considera come fondamentale il ruolo dei marcatori neuroendocrini in sede di biopsia.

Analizzeremo di seguito i risultati ottenuti nelle due diverse fase sperimentali

PRIMA FASE SPERIMENTALE CONDOTTA SU CAMPIONI BIOPTICI:

Risultati di immunoistochimica ed immunofluorescenza

La tabella riportata sintetizza i risultati ottenuti per i diversi tipi di neoplasie:

Tipo di neoplasia	N casi	Positività AR	Positività Cg-A
Neoplasia intraepiteliale benigna di alto grado	70	64	6
Adenocarcinoma prostatico ben differenziato	90	82	8
Adenocarcinoma prostatico poco differenziato	40	10	30
Totale	200		

Tabella n 1

Partendo dall'analisi delle sezioni colorate con ematossilina-eosina è stata effettuata una valutazione delle caratteristiche morfologiche della neoplasia intraepiteliale benigna, dell'adenocarcinoma prostatico poco differenziato e dell'adenocarcinoma prostatico ben differenziato. Tutti i dati sono stati confrontati con un tessuto di controllo non neoplastico tipizzato come iperplasia ghiandolare atipica, che presenta ghiandole prostatiche con aspetti funzionali costituite da cellule cilindro cubiche, distribuite su monostrato e circondate da membrana basale di tipo muscolare liscio. Le caratteristiche nel complesso ricordano la struttura ghiandolare del tessuto prostatico normale (Figura 1). Nel PIN il parenchima è formato da gruppi di ghiandole mostranti

displasia nucleare di alto grado che rimane circoscritta al tessuto ghiandolare (figura 2); nell'adenocarcinoma ben differenziato il parenchima è costituito da ghiandole neo formate disomogenee nella struttura ma simili alla ghiandola prostatica normale. Le cellule appaiono ipercromiche e displastiche (figura 3); nell'adenocarcinoma poco differenziato (figura 4) il parenchima è formato da cellule parzialmente disposte a formare ghiandole , per la maggior parte distribuite in filiere. Il quadro mostra una citologia marcatamente atipica completamente dissimile dalla ghiandola prostatica normale .

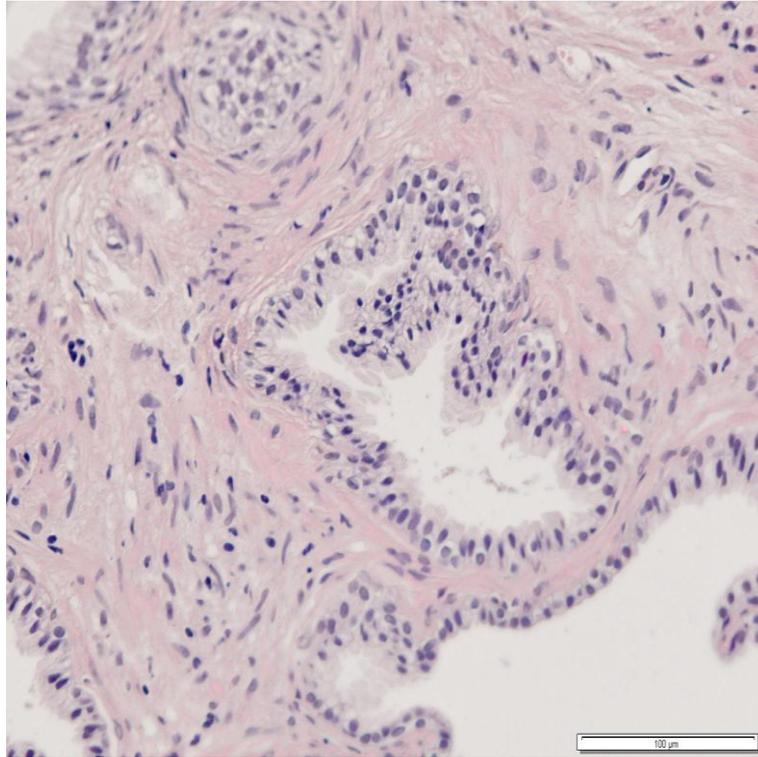


Figura 1: Iperplasia ghiandolare atipica, colorazione ematossilina-eosina

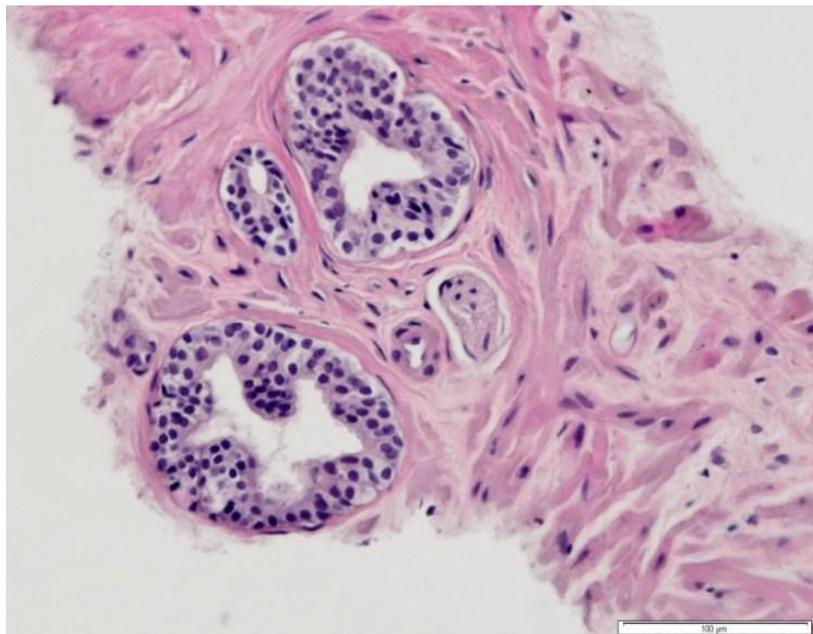


Figura 2: Iperplasia ghiandolare benigna di alto grado, colorazione ematossilina-eosina (10x)

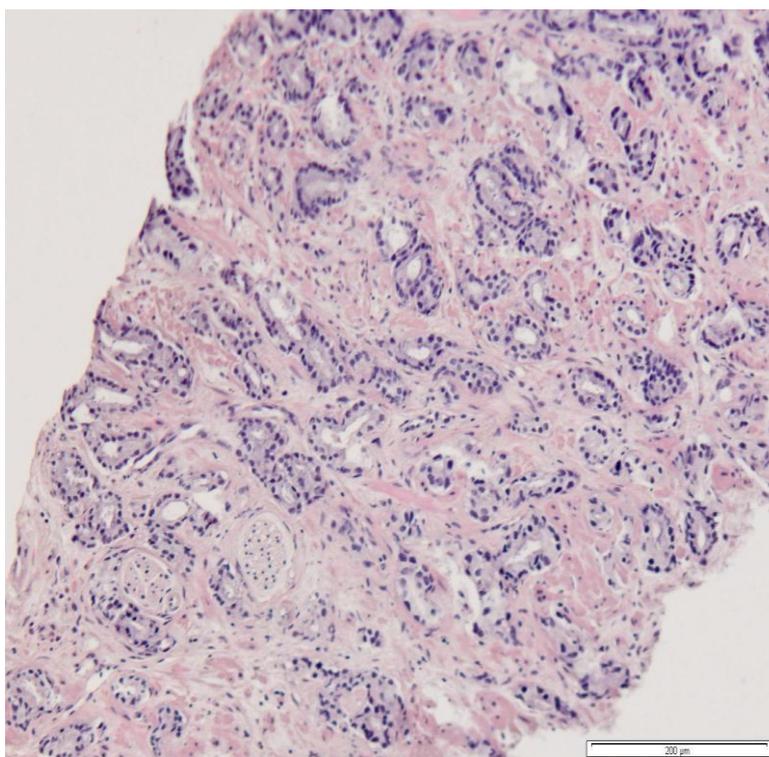


Figura 3: Adenocarcinoma ben differenziato colorazione ematossilina-eosina (10x)

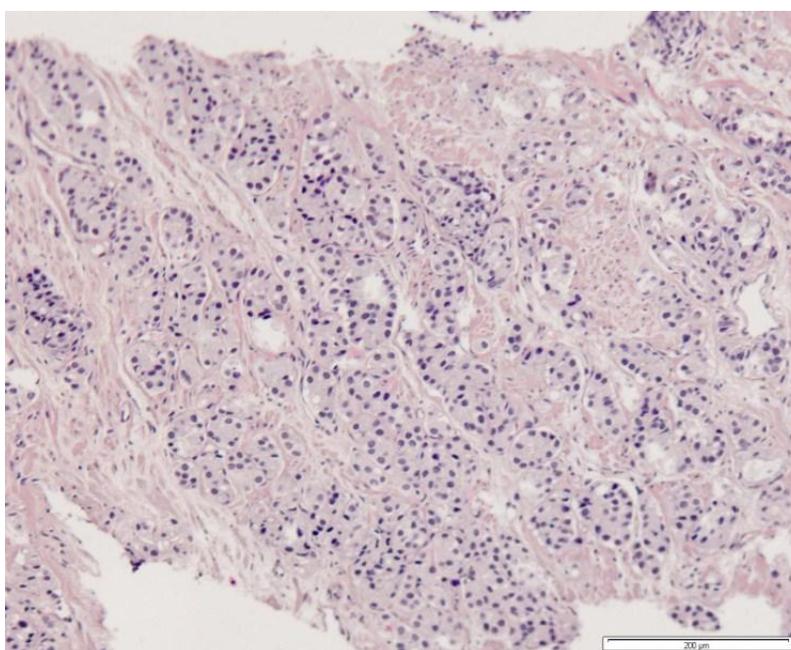


Figura 4: adenocarcinoma poco differenziato con colorazione ematossilina-eosina (10x)

Per lo studio funzionale del recettore androgenico e della cromogranina A i campioni sono stati sottoposti ad analisi di immunohistochimica.

L'immunofenotipizzazione ha messo in evidenza come per il PIN e l'adenocarcinoma ben differenziato si siano ottenute alte positività del recettore androgenico (Figura 5/7) e scarsa o assente positività della cromograninaA localizzata solo in piccole zone del tessuto ghiandolare (Figura 6/8).

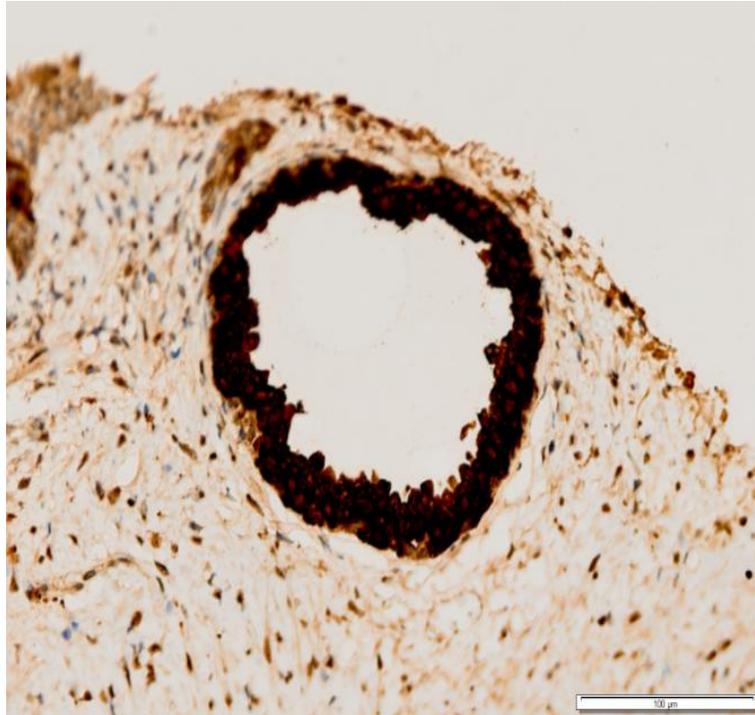


Figura 5: Alta positività del recettore androgenico nel PIN

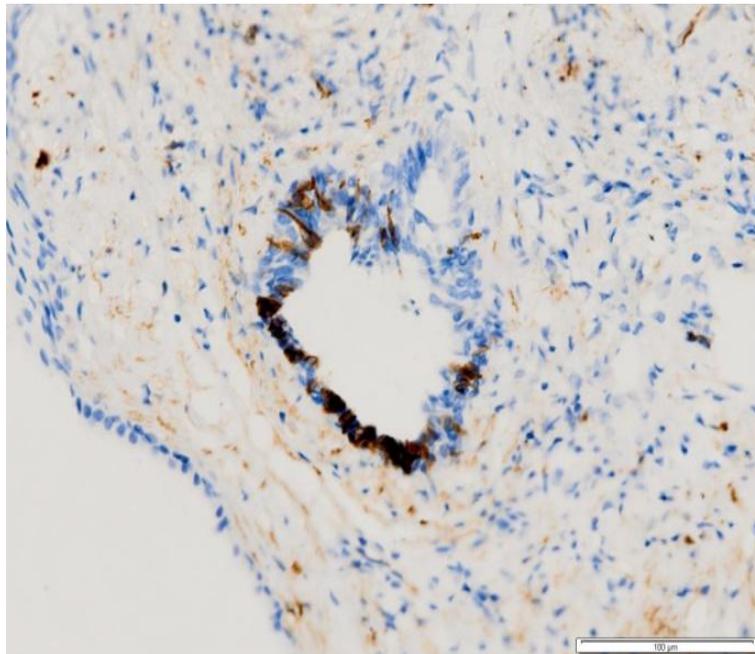


Figura 6: Scarsa positività della CromograninaA nel PIN

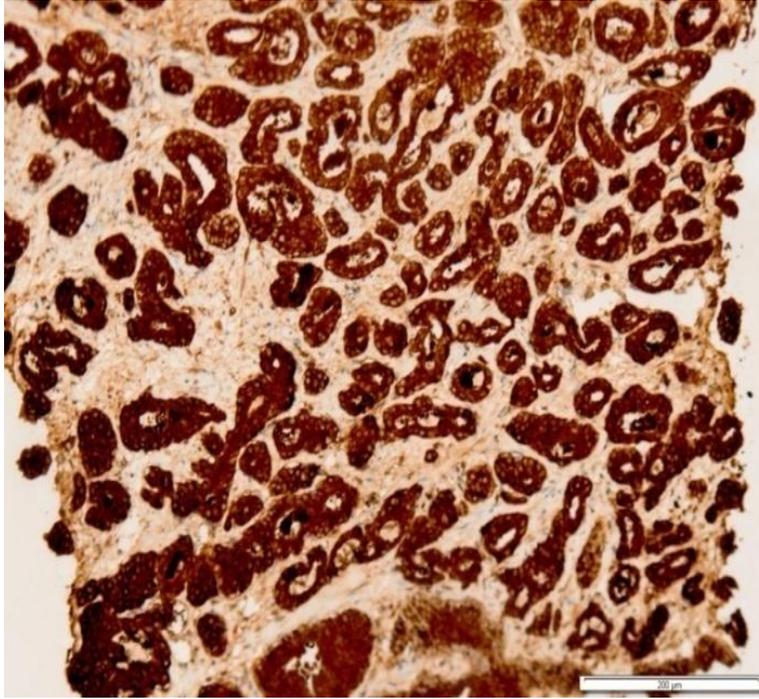


Figura 7:Alta positività del recettore androgenico in un adenocarcinoma ben differenziato

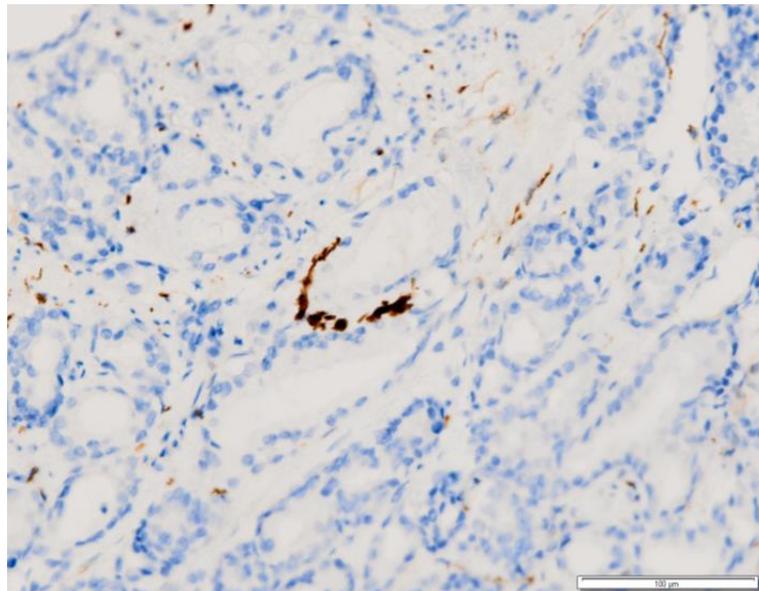


Figura 8: Scarsa positività della cromogranina in un adenocarcinoma ben differenziato

Al contrario, per l'adenocarcinoma poco differenziato si sono ottenute altissime positività per la cromograninaA che appare molto più distribuita all'interno di tutto il tessuto ghiandolare (Figura 9) e bassa positività del recettore androgenico che oltre ad essere meno presente risulta meno distribuito nel tessuto prostatico (Figura 10).

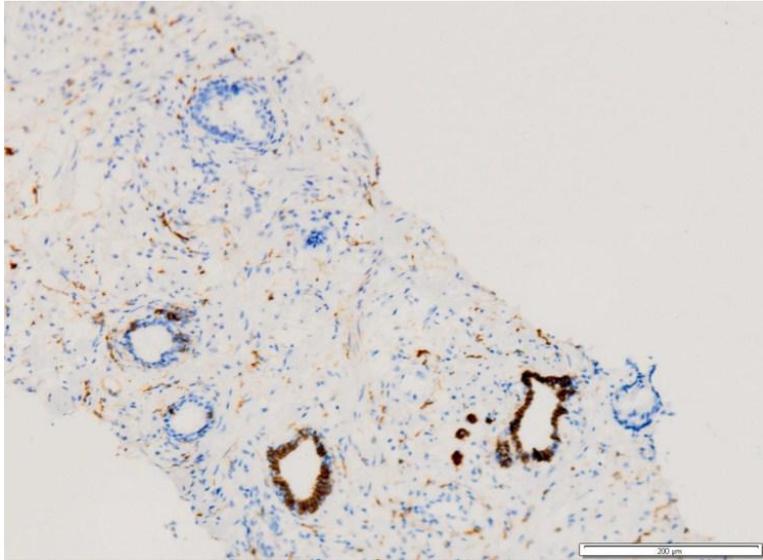


Figura 9: alta positività della cromograninaA in un adenocarcinoma poco differenziato

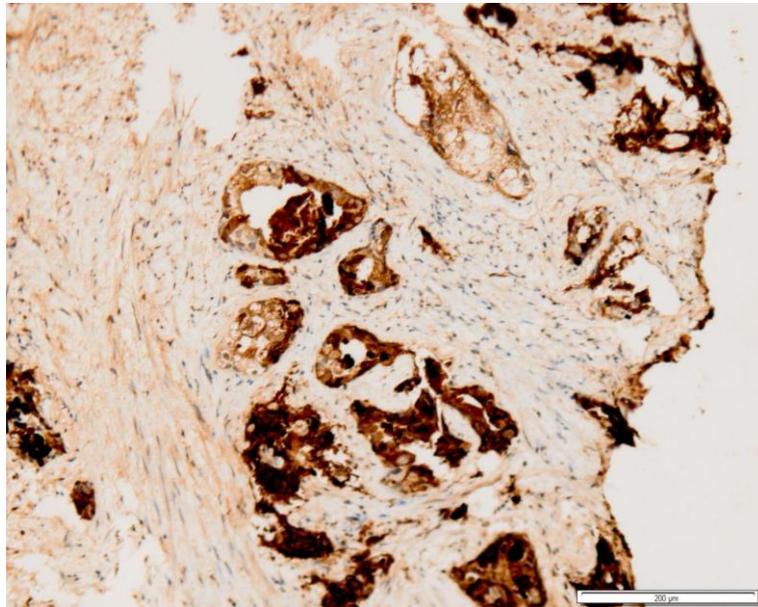


Figura 10: bassa positività del recettore androgenico in un adenocarcinoma poco differenziato

All'immunoistochimica successivamente abbiamo affiancato la microscopia confocale. Le figure mostrano come la positività del recettore androgenico mantenga lo stesso pattern di espressione in tutti e tre i casi di neoplasia. Esattamente si può apprezzare una marcata espressione a livello stromale ed epiteliale (figure 11/12/13).

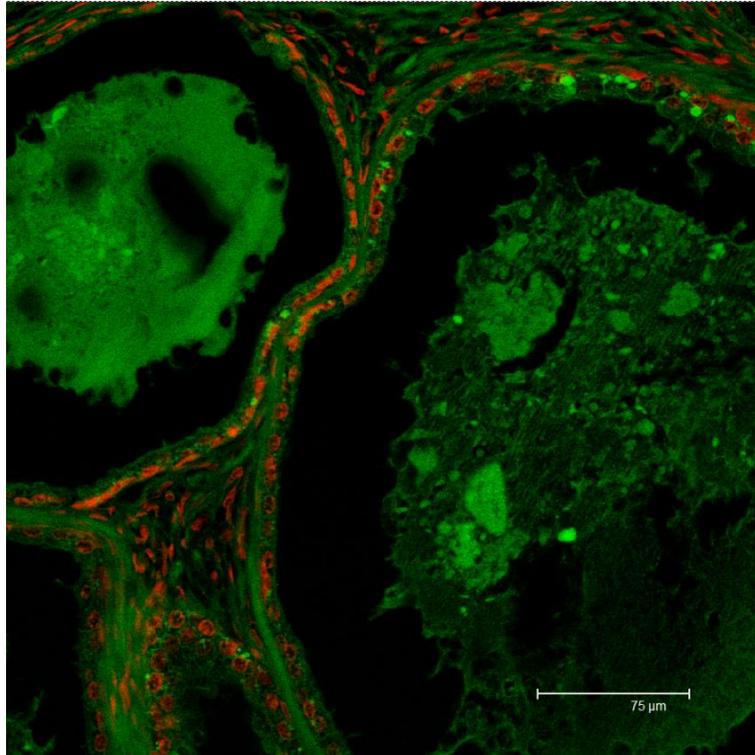


Figura 11: Immunolocalizzazione (20x) del recettore androgenico nel PIN

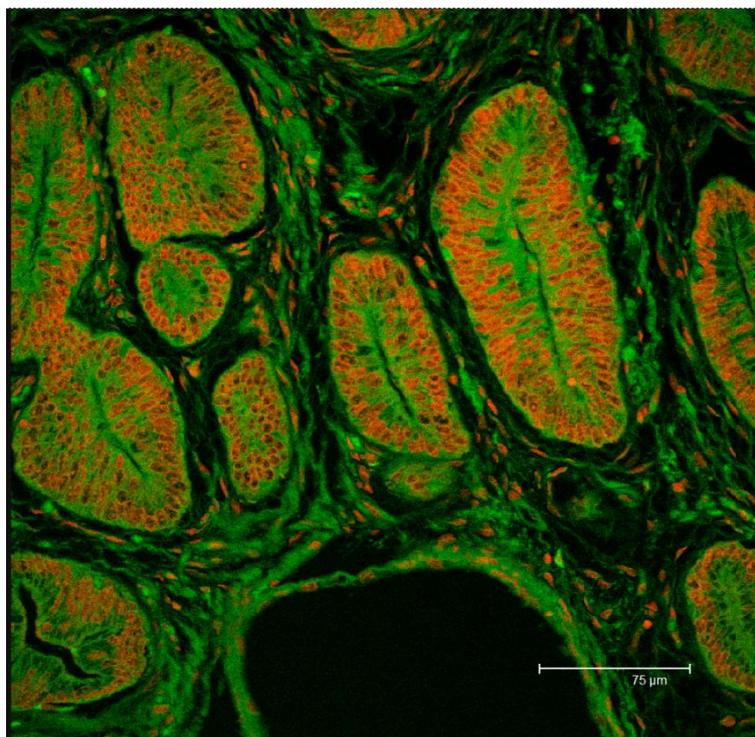


Figura 12: Immunolocalizzazione (20x) del recettore androgenico in un adenocarcinoma ben differenziato

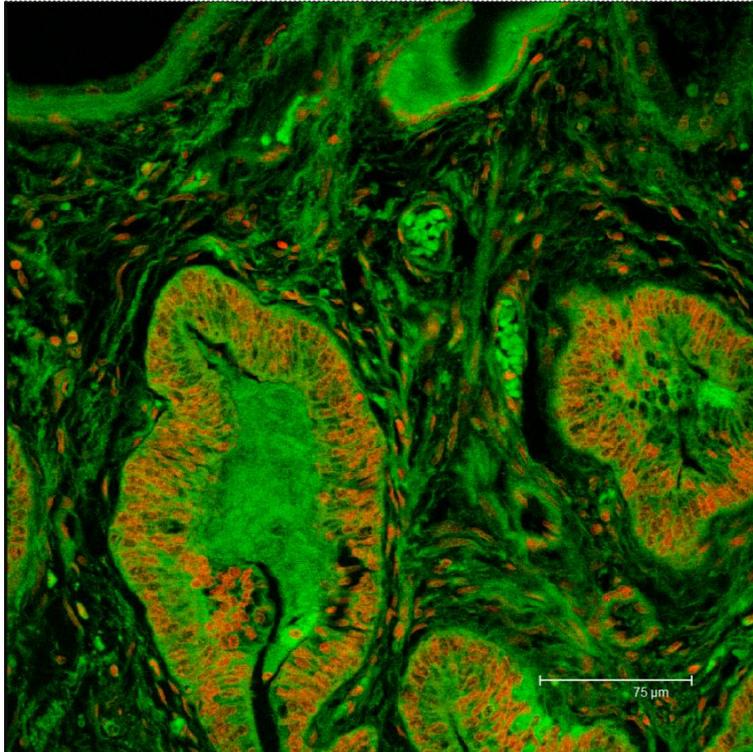


Figura 13: Immunolocalizzazione (20x) del recettore androgenico in un adenocarcinoma poco differenziato

La cromograninaA nel PIN è poco espressa: sono apprezzabili deboli segnali provenienti da poche cellule epiteliali che formano il dotto (figura14)

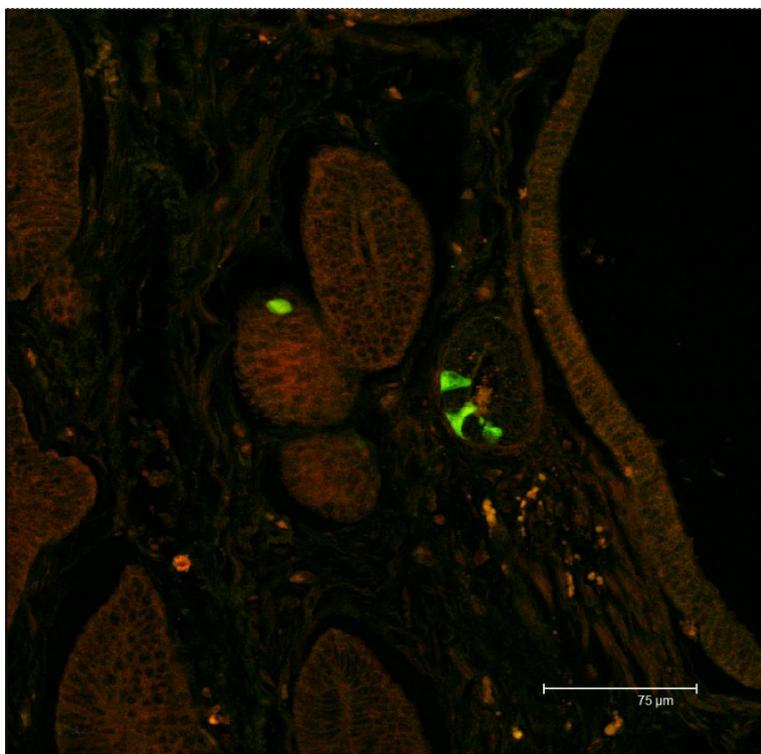


Figura 14: Immunolocalizzazione (20x) con cromograninaA nel PIN

Nel caso dell'adenocarcinoma ben differenziato si può notare come l'immunomarcatura sia localizzata a livello delle cellule epiteliali dei dotti prostatici, con modesta intensità (figura 15)

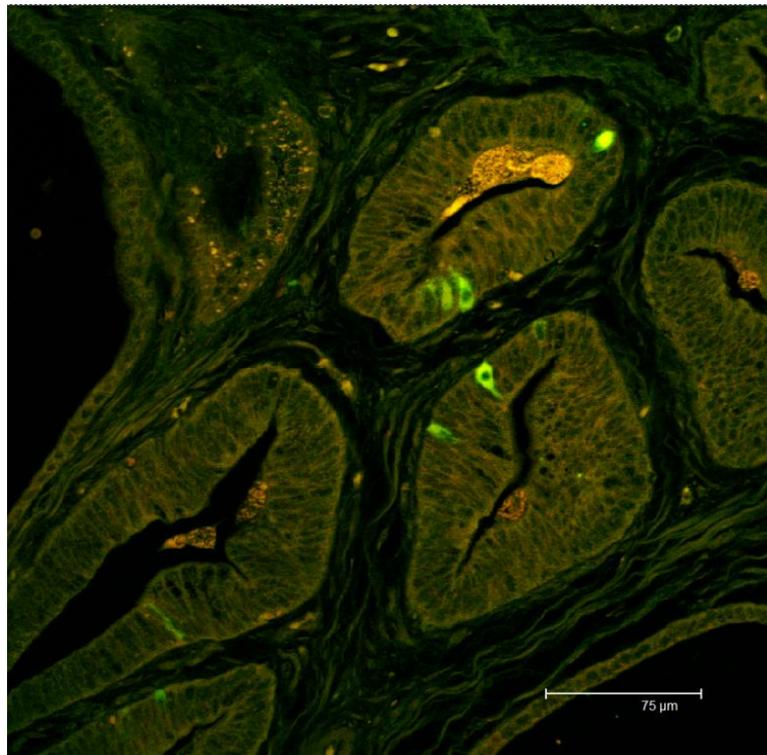


Figura 15: Immunolocalizzazione (40x) con cromogranina in un adenocarcinoma ben differenziato

Nell'adenocarcinoma poco differenziato l'espressione della cromograninaA è apprezzabile sempre a livello delle cellule epiteliali dei dotti prostatici, non lo è a livello stromale, ma è molto più marcata rispetto al caso precedente (figura 16).

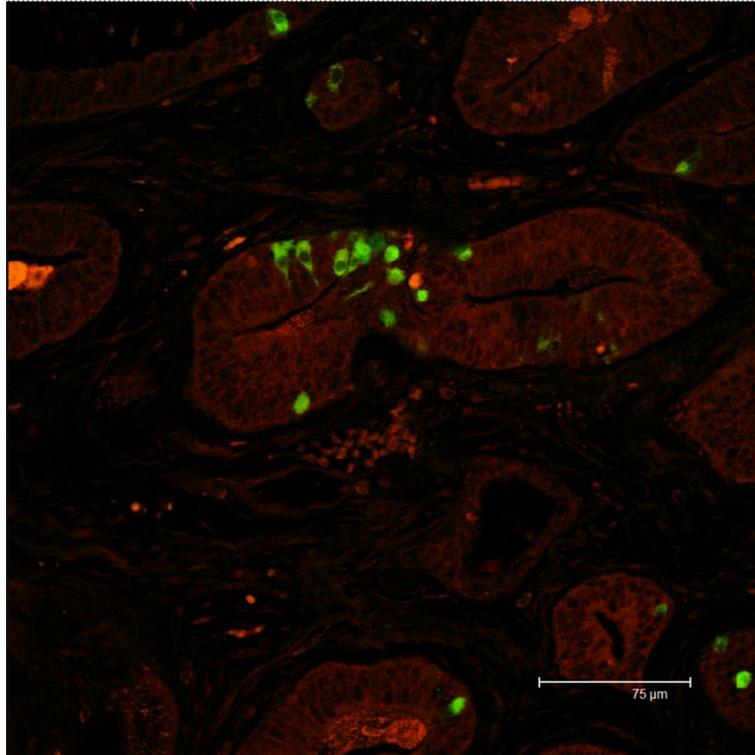


Figura 16: Immunolocalizzazione (40x) con cromogranina in un adenocarcinoma poco differenziato

L'immunofluorescenza ci ha consentito di poter testare contemporaneamente i due marcatori. Tutto ciò è stato reso possibile in quanto gli anticorpi utilizzati sono di due diverse specie, pertanto abbiamo fatto uso contemporaneamente due anticorpi secondari di cui uno coniugato con il FITC (verde) per la cromogranina A e l'altro con il TRITC (rosso) per il recettore androgenico.

L'immunolocalizzazione nell'adenocarcinoma ben differenziato mostra una pronunciata espressione del recettore androgenico sia a livello stromale che delle cellule epiteliali dei dotti ed una modesta espressione della cromograninaA soprattutto a livello dei dotti e molto limitata invece nello stroma (figura 17).

Nell'adenocarcinoma poco differenziato abbiamo riscontrato ridotta o assente espressione del recettore androgenico a livello stromale e nelle cellule epiteliali dei dotti ed una intensa e marcata immunopositività della cromograninaA (figura 18).

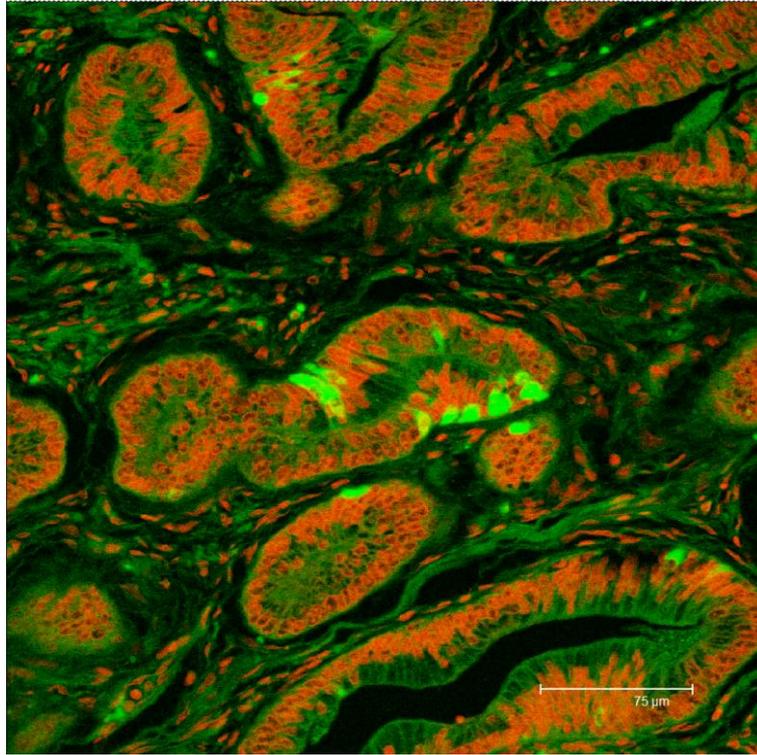


Figura 17: Immunolocalizzazione (40x) con recettore androgenico e cromogranina in adenocarcinoma ben differenziato.

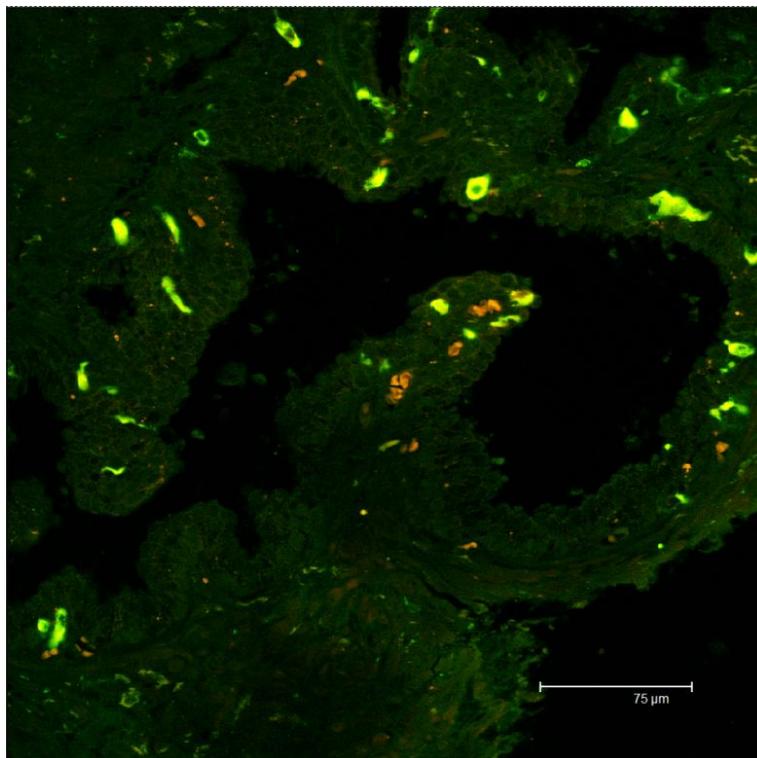


Figura 18: Immunolocalizzazione (40x) con recettore androgenico e cromogranina in adenocarcinoma poco differenziato

Analisi del profilo terapeutico

Completate le valutazioni immunofenotipiche, si è proceduto all'analisi di campioni provenienti da pazienti sottoposti a terapia antiandrogenica. In genere la terapia viene somministrata solo a pazienti anziani che riportano le seguenti caratteristiche cliniche:

- pazienti con diagnosi di T3
- pazienti in fase metastatica
- pazienti con carcinoma inoperabile con grado Gleason elevato

Da sottolineare che i soggetti giovani possono effettuare la terapia antiandrogenica solo se presentano il quadro clinico summenzionato.

Sul set di campioni neoplastici, descritti in tabella 2, trattati con antiandrogeni abbiamo voluto verificare:

1. il grado di incidenza della resistenza antiandrogenica
2. il profilo immunofenotipico in fase di diagnosi

Tipi di Neoplasia	Numero casi
Adenocarcinoma prostatico ben differenziato	170
Adenocarcinoma prostatico poco differenziato	80

Tabella 2

I risultati ottenuti sono stati i seguenti:

- su 170 pazienti affetti da adenocarcinoma ben differenziato, il 20% non ha risposto alla terapia perché presentava alti livelli di positività neuroendocrina, mentre l'80% ha beneficiato della terapia perché presentava bassi livelli di positività neuroendocrina.
- su 80 pazienti affetti da adenocarcinoma poco differenziato, il 10% non ha risposto alla terapia perché presentava alti livelli di positività neuroendocrina, mentre il 90% ha beneficiato della terapia perché presentava bassi livelli di positività neuroendocrina.

Le immagini seguenti mettono in evidenza il sorprendente risultato ottenuto rispetto ai campioni finora analizzati, che evidenzia un pattern di positività della cromograninaA completamente opposto.

Infatti nell'adenocarcinoma ben differenziato la positività neuroendocrina che nei precedenti campioni era scarsa, sia pur in una ristretta percentuale di casi, appare ora intensa (figura 19).

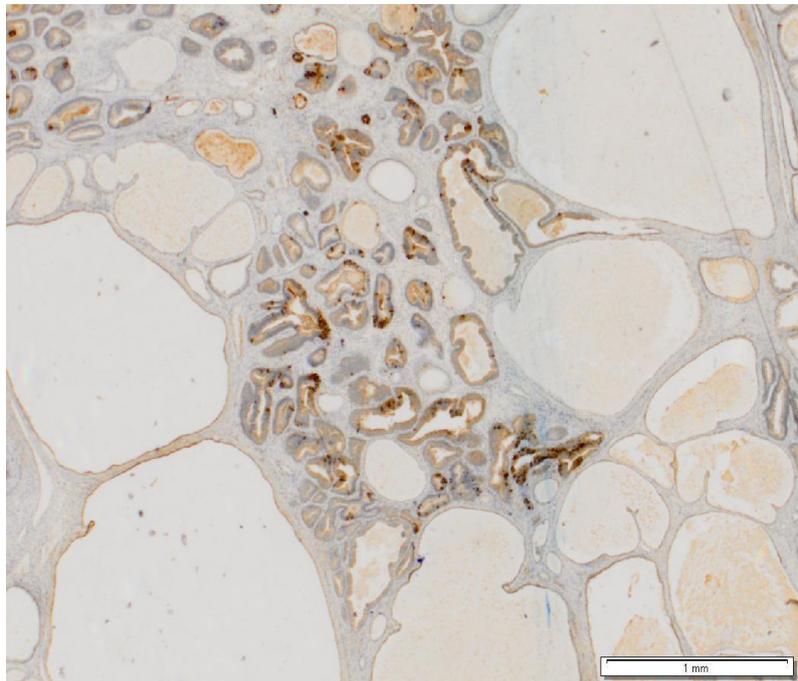


Figura 19: marcata positività alla cromograninaA in un adenocarcinoma ben differenziato

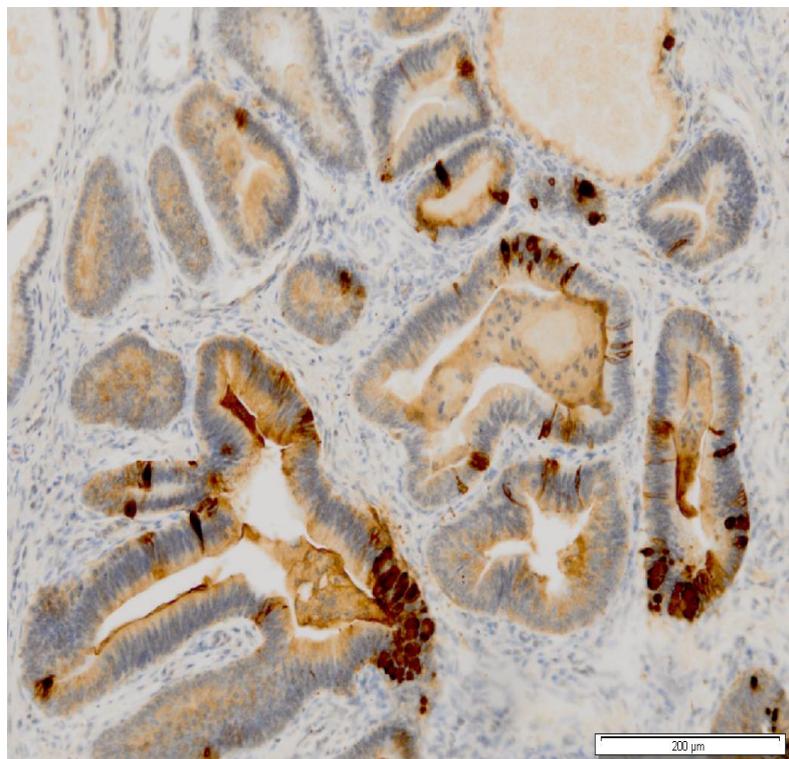


Figura 20: marcata positività alla cromograninaA in un adenocarcinoma ben differenziato

Al contrario nell'adenocarcinoma poco differenziato abbiamo riscontrato una scarsa o addirittura assenza di positività della cromograninaA (figura 21).

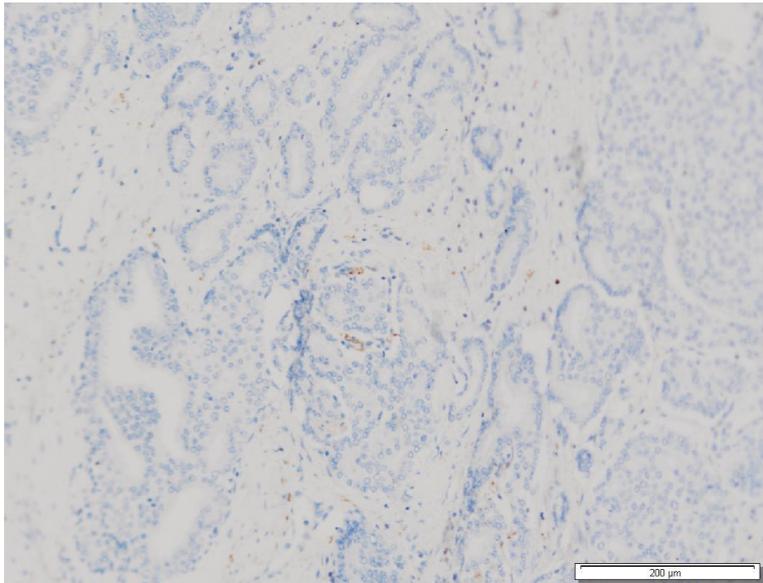


Figura 21: scarsa positività alla cromograninaA in un adenocarcinoma poco differenziato

SECONDA FASE SPERIMENTALE CONDOTTA SU CAMPIONI CELLULARI

Risultati della linea cellulare LNCaP

Le cellule tumorali prostatiche in condizioni di base, a partire dal momento della semina su piastra, assumono già dopo 24 h la tipica morfologia di cellule ben adese al substrato, come si può osservare in figura 22, raggiungendo una confluenza di circa il 70% alla 48° h (figure22/23)

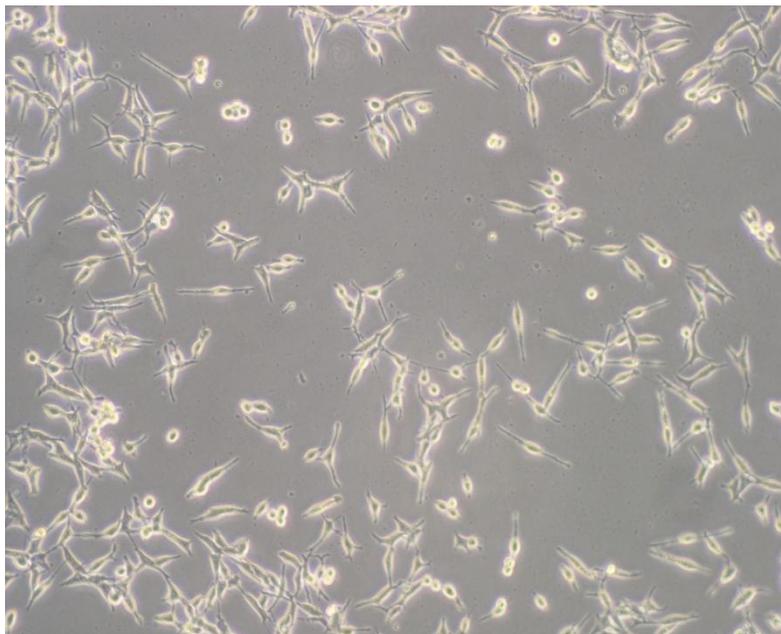


Figura 22: LNCaP in coltura, osservate al microscopio ottico (4x)

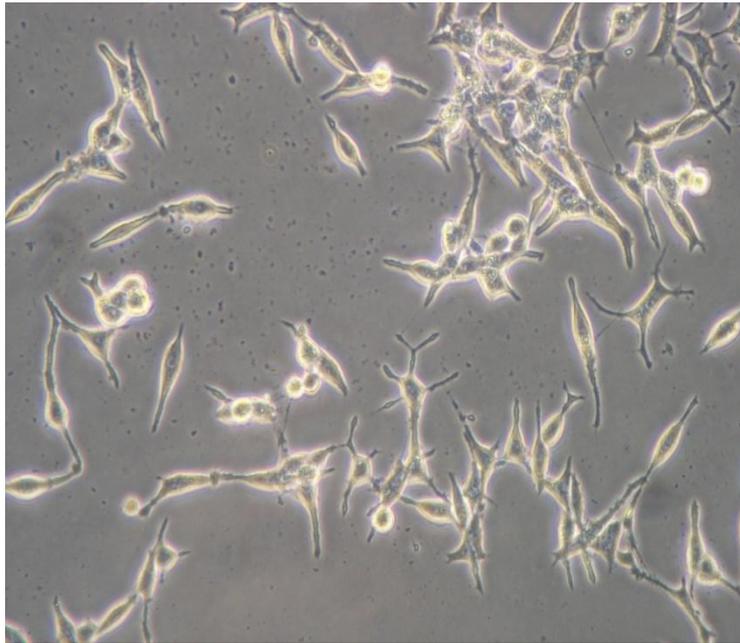


Figura 23:LNCap in coltura, osservate al microscopio ottico (20x)

Le stesse cellule, mantenute in un mezzo deprivato di androgeni per un periodo di 6 mesi, rallentano la crescita e l'adesione al substrato ed assumono una morfologia nettamente differente da quella originaria, esse infatti presentano lunghe propaggini simili ad assoni che tendono a raggiungere e toccare altre cellule vicine (figure 24/25):

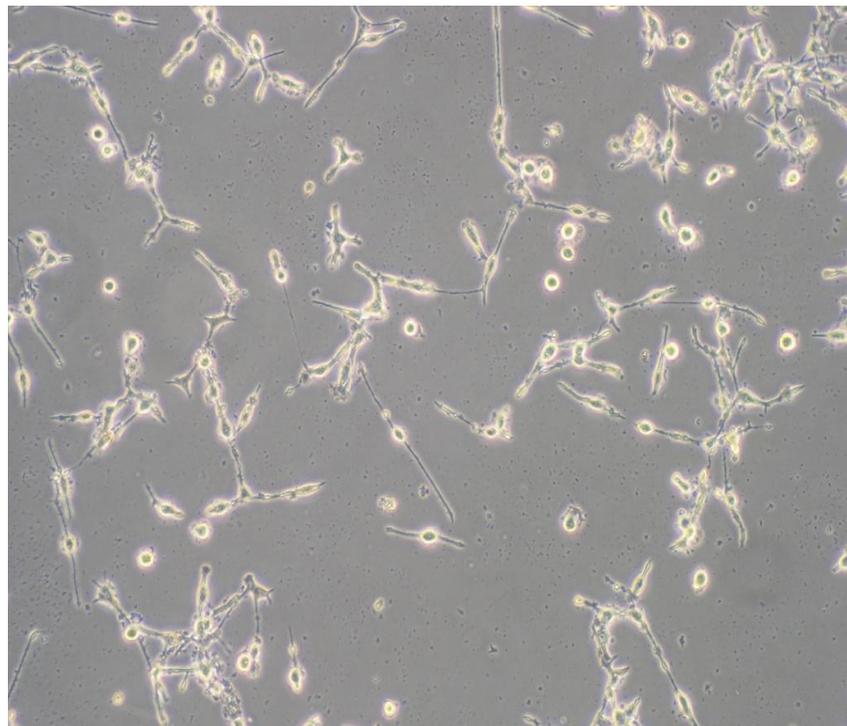


Figura 24: Forma assonale delle LNCap in coltura deprivata di androgeni osservate al microscopio ottico (10x)

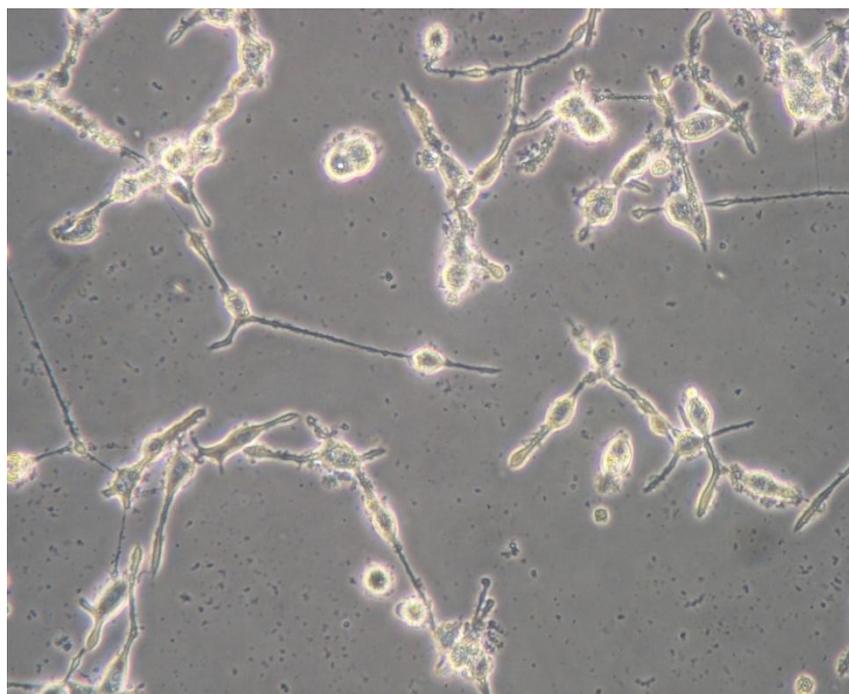


Figura 25: Forma assonale delle LNCap in coltura deprivata di androgeni (20x)

Come messo in evidenza nelle figure le cellule ripropongono una morfologia neuronale-simile.

La stessa differenziazione neuronale si ottiene trattando le colture per 48-72 ore con acido valproico (1mM), un acido che, come anticipato, agisce da inibitore delle deacetilasi. Sulle colture wild type e su queste ultime così trattate sono stati dosati i markers del citotipo epiteliale e i markers del citotipo neuroendocrino.

Markers del fenotipo epiteliale

Nell'analisi dei markers epiteliali oltre al recettore androgenico abbiamo testato il PSA e la citocheratina 18.

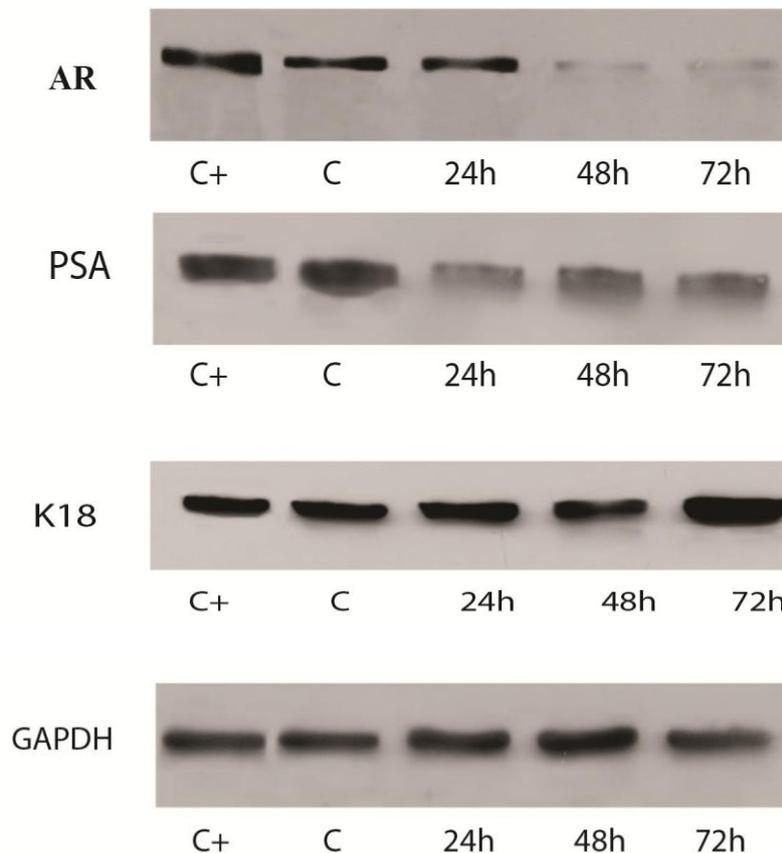


Figura 26 Cellule LNCaP trattate, per i tempi indicati in figura, con Acido Valproico (1mM). Il GAPDH è usato come controllo di loading. L'immagine di W.B. è rappresentativa di n. 3 determinazioni

I livelli di espressione del recettore androgenico così come il PSA, proteina androgeno dipendente, risultano decrementati dal trattamento con Acido Valproico. La citocheratina 18 si mantiene stabile fino a 48 h, per poi aumentare a 72h (figura 26).

Le Citocheratine sono considerate fra i più diffusi marcatori di differenziazione epiteliale. In immunocistochimica consentono la diagnosi del tipo di epitelio che si è trasformato in carcinoma e la conseguente caratterizzazione del tipo di tumore. Nel carcinoma della prostata la citocheratina può trovare grande riscontro solo se valutata nell'insieme dei markers neuroendocrini, altrimenti non darebbe ulteriori informazioni se non sulla componente epiteliale della neoplasia. Per questo motivo è stata testata in vitro e non in vivo.

Markers del fenotipo neuroendocrino

Nell'analisi dei markers neuroendocrini oltre alla cromogranina A abbiamo testato anche l'NSE(gamma) enzima presente nelle cellule neuronali nonché nelle cellule che vanno incontro a differenziazione neuroendocrina, che risulta spesso associata ad un alto grado Gleason e al fenotipo ormono-resistente.

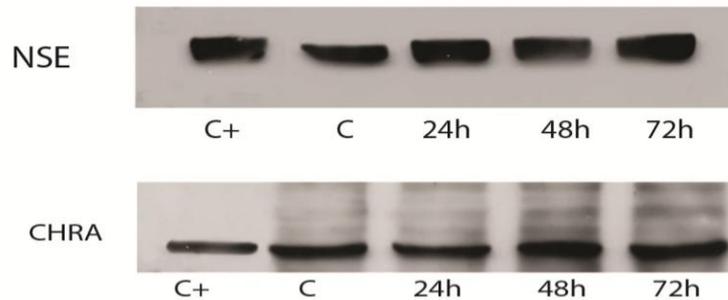


Figura 27 Cellule LNCaP trattate, per i tempi indicati in figura, con Acido Valproico (1mM). Il GAPDH è usato come controllo di loading. L'immagine di W.B. è rappresentativa di n. 3 determinazioni.

Dopo 48-72 ore si è verificata un aumento sia della Cromogranina A che di NSE (figura 27).

Essendo l'NSE altamente specifica per la differenziazione neuroendocrina abbiamo deciso di testarla anche in immunohistochimica e di confrontarla con i valori di positività della cromograninaA al fine di correlare i dati ottenuti in vitro con i risultati dei campioni biotici.

Sorprendentemente nell'adenocarcinoma poco differenziato essa ha mostrato ridotta o assente positività (figura 28), rispetto ai valori della cromograninaA che invece risultano molto alti (figura 29).

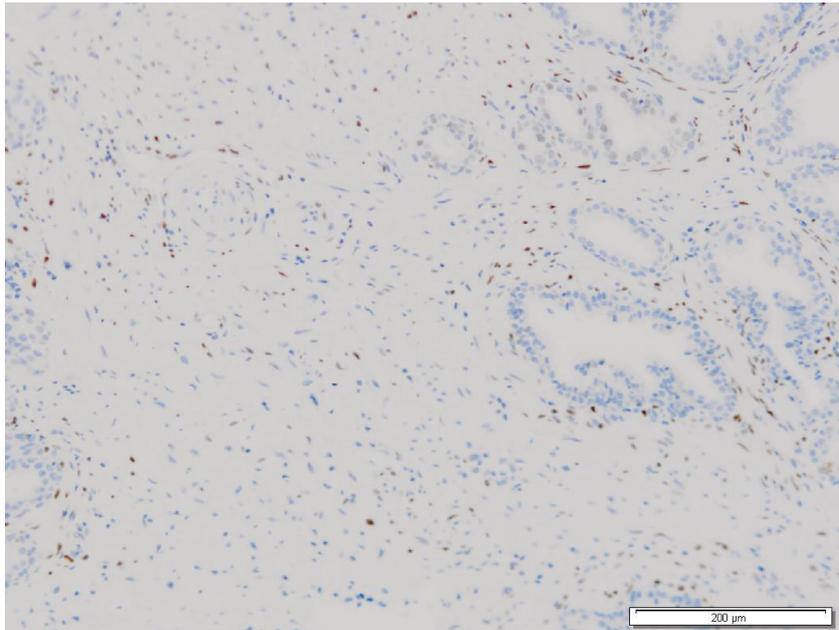


Figura 28 ridotta/assente positività di NSE in un adenocarcinoma poco differenziato

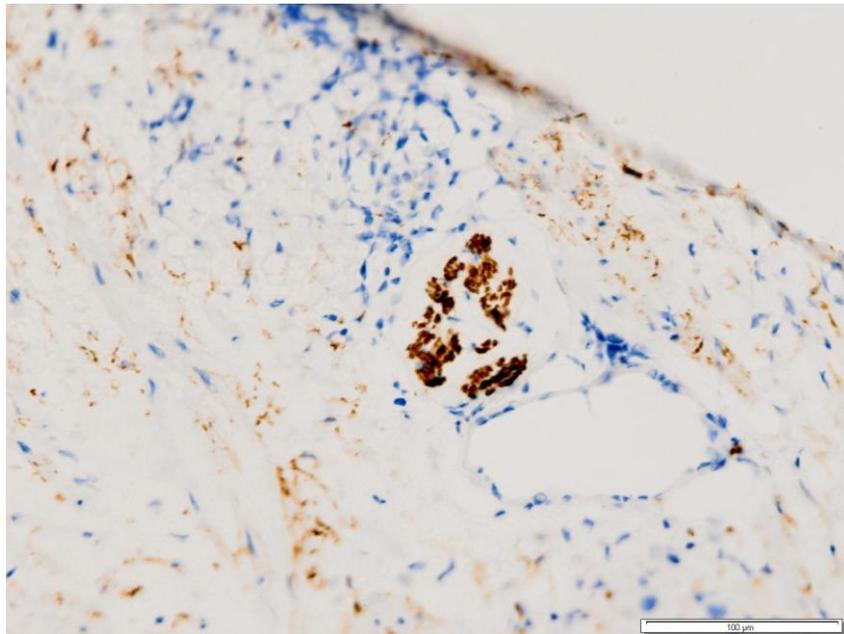


Figura 29: marcata positività della cromograninaA in un adenocarcinoma poco differenziato

Considerazioni e conclusioni

L'adenocarcinoma prostatico rappresenta la 'neoplasia elettiva' per quanto riguarda il processo di differenziazione neuroendocrina, dal momento che lo sviluppo della neoplasia, a partire dalla condizione di ormono- dipendenza, progredisce per stadi successivi verso l'ormono- resistenza e la successiva differenziazione nel fenotipo neuronale.

Il meccanismo alla base della differenziazione neuroendocrina (NE) nel carcinoma prostatico non è del tutto noto, ma sembra che la stessa terapia di deprivazione androgenica, specie se somministrata secondo schemi continuativi e non intermittenti, possa selezionare i cloni di cellule NE, già normalmente presenti nel tessuto prostatico, e favorirne indirettamente la crescita (13).

L'iperattivazione delle cellule neuroendocrine come conseguenza di un trattamento antiormonale può essere evidenziata e confermata con analisi immunoistochimiche, ricercando sostanze da loro prodotte all'interno del tessuto. Nello sviluppo dell'adenocarcinoma inoltre bisogna tener presente lo stretto rapporto che esiste tra il compartimento epiteliale e il citotipo neuroendocrino. La grande differenza tra i due citotipi è la dipendenza dell'uno e l'indipendenza dell'altro dagli androgeni. Questo rappresenta un punto di fondamentale importanza se si vuole comprendere come la ghiandola prostatica, già a partire da uno stadio di iperplasia ghiandolare benigna, possa subire delle modificazioni morfologiche tali da far acquisire all'oncotipo epiteliale caratteristiche strettamente neuroendocrine tipo l'androgeno refrattarietà. L'analisi dello status immunofenotico assume un ruolo cardine per comprendere l'evoluzione della neoplasia , soprattutto se si considera che a livello sierico nessun markers di tipo neuroendocrino, compresa la cromogranina A (58), ha mostrato una stretta relazione tra l'aumento del valore serico e la presenza o progressione dell'adenocarcinoma prostatico.

In base ai risultati da noi ottenuti in immunoistochimica ed in immunofluorescenza si può chiaramente affermare che nelle aree prostatiche normali l'espressione del recettore androgenico è uniformemente distribuita a livello delle cellule epiteliali dei dotti prostatici e parzialmente presente nello stroma; mentre l'espressione della cromograninaA è quasi assente. Nei campioni che mostrano progressivamente PIN, adenocarcinoma ben differenziato ed adenocarcinoma scarsamente differenziato, l'espressione del recettore androgenico, seppur distribuita nelle cellule epiteliali dei dotti e nello stroma, mostra segnali fluorescenti più deboli ed in alcune aree assenti; mentre l'espressione della cromograninaA assume caratteristiche completamente diverse sia per quanto riguarda l'intensità del segnale che per la sua valenza funzionale. Infatti l'analisi della contemporanea espressione dei due markers ci ha fornito il dato più importante, non solo in termini

quantitativi bensì qualitativi. La morfologia delle cellule epiteliali dei dotti che esprimono la cromograninaA, risulta essere diversa rispetto alle cellule che non la esprimono, in quanto iniziano ad assumere una forma più affusolata con presenza di piccoli prolungamenti citoplasmatici.

Tutti i dati di immunistochemica sono stati confermati dalla microscopia confocale , che ha messo in risalto la dinamicità delle cellule prostatiche all'interno di un processo di differenziazione neuroendocrina . Non esiste una soluzione di continuità tra le diverse forme di carcinoma prostatico, ma vari stadi di modificazioni morfologiche che possono coesistere tra di loro.

A livello diagnostico il valore predittivo di questi markers diventa molto efficace in quanto prima di un completo differenziamento verso il citotipo neuroendocrino, l'analisi istochimica rivela la tendenza alla trasformazione e quindi fornisce dati fondamentali che possono influenzare la progressione neoplastica.

Se si considera che sia nei casi di adenocarcinoma poco differenziato, sia nei casi di adenocarcinoma ben differenziato la terapia farmacologica è basata esclusivamente sulla deplezione degli androgeni, si capisce bene come una modificazione morfo-funzionale dell'assetto recettoriale, possa rendere le cellule prostatiche neoplastiche non aggredibili e quindi non controllabili.

I risultati ottenuti da pazienti sottoposti a terapia antiandrogenica hanno confermato come all'interno della ghiandola prostatica il numero di cellule neuroendocrine può aumentare a prescindere dal grado di differenziazione della neoplasia.

Si evidenzia così la stretta dipendenza che lo sviluppo della neoplasia ha con l'attività di queste cellule.

I due markers principali: AR e cromograninaA, che caratterizzano il dinamismo e l'evoluzione stessa della neoplastica prostatica , hanno trovato riscontro nei dati in vitro ottenuti sulle cellule LNCaP. Quando la cellula assume la morfologia neuroendocrina, indotta sperimentalmente dal trattamento con acido valproico, l'espressione dell'AR decrementa mentre il livello della cromogranina A incrementa. Un'altra proteina ben conosciuta ed utilizzata nel monitoraggio delle patologie prostatiche sia benigne che maligne è il PSA sierico. La sua sintesi, unicamente riservata alla ghiandola prostatica, è dipendente dagli androgeni, pertanto la terapia antiandrogenica ne abbassa significativamente la produzione (58). In accordo con quanto riportato, il dato di decremento della PSA ritrovato nelle cellule LNCaP sottoposte a valproato ben si correla con la diminuzione dell'AR, confermando anche "in vitro" la stretta correlazione tra i due markers. L'aumento della citocheratina 18 indotto dal valproato, in immunistochemica può trovare applicazione solo se la sua positività viene valutata insieme alla positività del recettore androgenico per confermare l'origine epiteliale della neoplasia. La negatività , al contrario, soprattutto nei casi di adenocarcinoma poco differenziato potrebbe dare indicazione di una probabile evoluzione neuroendocrina, ma comunque

a livello tissutale non può essere considerato come parametro dirimente in un processo di trasformazione della neoplasia in senso neuroendocrino. Pertanto, lo studio di questa proteina merita maggiori approfondimenti sia su linee cellulari di tumore prostatico che su campioni bioptici. Una ineguale espressione di gamma enolasi è stata ottenuta dai dati in vitro rispetto a quanto ritrovato nei campioni tissutali. In particolare, l'enzima incrementa in seguito a differenziazione neuroendocrina solo nella linea cellulare LNCaP. Questo dato, assume un'importanza fondamentale perché stiamo parlando di un markers altamente specifico per la differenziazione neuroendocrina come comprovato da altri studi (13). Il fatto che l'NSE abbia mostrato scarsa o assente positività in casi di adenocarcinoma poco differenziato non lo classifica tra i markers di elezione da utilizzare per la diagnosi neuroendocrina nel carcinoma della prostata. Questi risultati supportano e confermano la nostra ipotesi iniziale di ricerca, che attribuisce alla cromogranina A un ruolo fondamentale nella diagnosi istologica ed in sede di biopsia, soprattutto se si considera che recentissime ricerche hanno verificato che i valori sierici della cromogranina A non sono predittivi nella diagnosi del carcinoma scarsamente differenziato.

In conclusione la presenza di foci di cellule neuroendocrine è dimostrabile in tutti gli adenocarcinomi prostatici ed il loro numero aumenta nelle forme meno differenziate del tumore epiteliale.

La differenziazione neuroendocrina aumenta progressivamente durante la storia naturale del tumore ed è sempre correlata con la comparsa del fenotipo ormono-refrattario e con la maggiore aggressività tumorale.

Considerando che all'interno di una neoplasia possono coesistere oncotipi diversi, ovvero epiteliale e neuroendocrino, la valutazione dello 'status immunoistochimico neoplastico' diventa un parametro dirimente e fondamentale non solo da un punto di vista diagnostico ma soprattutto prognostico. Modificazioni morfo-funzionali dell'assetto recettoriale, possono rendere le cellule prostatiche neoplastiche non aggredibili e quindi non controllabili da un punto di vista della progressione neoplastica. Una mancata valutazione dei markers neuroendocrini potrebbe rendere nulla qualsiasi terapia antiandrogenica. Questo risulterebbe fortemente invalidante per il paziente soprattutto se si considera che tale terapia può essere utilizzata anche come "riduttiva" neoadiuvante.

Come confermato sia dal dato cellulare che dal dato immunoistochimico possiamo affermare che esiste nell'evoluzione del carcinoma prostatico una fase in cui le cellule prostatiche assumono una morfologia 'ibrida', che determinerà attraverso connotazioni neuroendocrine una prognosi nettamente sfavorevole.

In conclusione, dal momento che la presenza di aree focali di differenziazione neuroendocrina nell'ambito degli adenocarcinomi sembra avere una significativa influenza sotto il profilo dell'evoluzione neoplastica e della prognosi, è importante capire precocemente quali sono gli eventi molecolari che indirizzano la cellula verso un nuovo citotipo funzionale proprio per adottare in tempo le scelte terapeutiche innovative più adeguate .

Bibliografia

- 1) Edge S.B., Compton C.C., 2010. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 17: 1471-1474.
- 2) Loblaw D.A., 2004. American Society of Clinical Oncology recommendations for the initial hormonal management of androgen-sensitive metastatic, recurrent, or progressive prostate cancer. *J Clin Oncol* 22 (14): 2927-41.
- 3) Tammela T., 2004. Endocrine treatment of prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92 (4): 287-95.
- 4) Seregini E., 2011. State of the art of palliative therapy. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 55(4): 411-9.
- 5) Hillegonds D.J., 2007. The management of painful bone metastases with an emphasis on radionuclide therapy. *J Natl Med Assoc* 99 (7): 785-94.
- 6) Portenoy R.K., 2011. Treatment of cancer pain. *Lancet* 377 (9784): 2236-47.
- 7) Miyoshi Y., Uemia H., Kitami K., Satomi Y., Krrbota Y., Hosaka M., 2001. Neuroendocrine differentiated small cell carcinoma presenting as recurrent prostate cancer after androgen deprivation therapy. *BJU Int* 88: 982-83.
- 8) Yashi M., Ishikawa S., Ochi M., Tokue A., 2002. Small cell-neuroendocrine carcinoma may be more a phenotype in advanced prostate cancer. *Urol Int* 69: 166-8.
- 9) Almagro U.A., Tieu T.M., Remeniuk E., Kveck R., Stumpf K., 1986. Argiophilic carcinoid-like prostatic carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 110: 916-9.
- 10) Tash J.A., Reuter V., Russo P., 2002. Metastatic carcinoid tumor of the prostate. *J Urology* 167: 2526-7.
- 11) Casella H., Bubendorf L., Sauter G., Moch H., Mihatsch M.J., 1998. Gasser Th. Focal neuroendocrine differentiation lacks prognostic significance in prostate core needle biopsies. *J Urologie* 160: 406-10.
- 12) Abrahamsson P.A., 1999. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Prostate* 39: 135-48.
- 13) Yuan T.C., Veeramani S., Lin M.F., 2007. Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. *Endocr Relat Cancer* 14 (3): 531-47.
- 14) Ro J.Y., Tetu B., Ayala A.G., 1987. Small cell carcinoma of the prostate. *Cancer* 59: 977-82.
- 15) Helpap B., Kollermann J., 1999. Undifferentiated carcinoma of the prostate with small cell features. *Virchows Arch A* 434: 385-90.
- 16) Julius D., Livelli T.J., Jessel T.M., Axel R., 1989. Ectopic expression of the serotonin 1C receptor and the triggering of malignant transformation. *Science* 244: 1057-62.

- 17) Seuwen K., Pouyssegur J., 1990. Serotonin as a growth factor. *Biochem Pharmacol* 39: 985-90.
- 18) Hansson J., Abrahamsson P.A., 2003. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Scand J Urol Nephrol* 37 (suppl. 212): S28-36.
- 19) Hoosein N.M., Logothetis C.J., Chung L.W., 1993. Differential effects of peptide hormones bombesin, VIP and somatostatin analog RC-160 on the invasive capacity of the human prostatic carcinoma cells. *J Urology* 149: 1209-377.
- 20) Pollak M.N., Schally A.V., 1998. Mechanisms of antineoplastic action of somatostatin analogs. *Proc Soc Exp Biol Med* 217: 143-52.
- 21) Dai J, Shen R., Sumitomo M., Goldberg J.S., Geng Y., Navarro D. et al., 2001. Tumor-suppressive effects of neutral endopeptidase in androgen-independent prostate cancer cells. *Clin Cancer Res*; 7: 1370-77.
- 22) Papandreu C.N., Usmani B., Geng Y., Bogenrieder T., Freeman R., Wilk S. et al., 1998. Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent prostate cancer progression. *Nat Med* 4: 50-7.
- 23) Fredland S.J., Sekigson D.B., Liu A.Y., Pantuck A.J., Paik S.H. et al., 2003. Loss of CD10-neutral endopeptidase is a frequent and early event in human prostate cancer. *Prostate* 55: 71-80.
- 24) Di Sant'Agnese P.A., 1996. Neuroendocrine differentiation in the precursor of prostatic cancer. *Eur Urol* 30: 503-09.
- 25) Bologna M., Festuccia C., Muzi P., Biordi L., Ciomei M., 1989. Bombesin stimulates growth of human prostatic cancer cells in vitro. *Cancer* 63: 1714-20.
- 26) Bonkhoff H., Remberger K., 1996. Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. *Prostate* 28; 98-106.
- 27) Segal N.H., Cohen R.J., Haffeje Z., Savage N., 1994. Bcl-2 protooncogene expression in prostate cancer and its relationship to the prostatic neuroendocrine cells. *Arch Pathol Lab Med* 118: 616-8.
- 28) Xing N., Quian J., Bostwick D., Bergstrain E., Young C.Y., 2001. Neuroendocrine cells in human prostate overexpress the anti-apoptosis protein survivin. *Prostate* 48: 7-15.
- 29) Cornet A.M., Henon E., Reiter E.R., Bruyninx M., Nguyen V.N., Hennyuy B.R. et al., 2003. Prostatic androgen repressed message- 1 (PARM-1) may play a role in prostatic cell immortalization. *Prostate*; 56: 220-230.
- 30) Cohen R.J., Glezerson G., 1992. Prostate-specific antigen and acid phosphatase in neuroendocrine cells of prostate cancer. *Arch Pathol Lab Med* 116: 65-6.

- 31) Xue Y., Smedts F., Verhofstad A., Debruyne P., De La Rosette J., Schalken J., 1998. Cell kinetics of prostate exocrine and neuroendocrine epithelium and their differential interrelationship: new perspectives. *Prostate* 8 (suppl.): S62-70.
- 32) Aumuller C., Leonharth M., Janssen M., Konrad L., Bjartel A., Abrahamsson P.A., 1999. Neurogenic origin of prostate neuroendocrine cells. *Urology* 53: 1041-48.
- 33) Van Leenders G.J., Schalken J.A., 2001. Stem cell differentiation within human prostate epithelium: implications for prostate carcinogenesis. *BJU Int* 88 (suppl.): S435- 42.
- 34) Angelsen A., Syeveresen U., Strdsberg H., Haugen O.A., Hjhnerod O.K., Waldum H., 1997. Use of neuroendocrine serum markers in the follow-up of patients with cancer of the prostate. *Prostate* 31: 110-17.
- 35) Berruti A., *et al.*, 2000. Circulating neuroendocrine markers in patients with prostate carcinoma. *Cancer* 88: 2590-7.
- 36) Saint-Andrè J.P., Valo I., Guytent S., 2002. Characterization histologique des tumeurs neuroendocrines. *Rev Praticien* 52: 250-5.
- 37) Sciarra A., Monti S., Gentile V., Mariotti G., Cardi A., Voria A., *et al.*, 2003. Variation in chromogranin-A serum levels during intermittent versus continuous androgen deprivation therapy for prostate adenocarcinoma. *Prostate* 55: 168-79.
- 38) Kalkner K.M., Nilsson S., Westin J.E., 1998. 111-In-DTPA-octreotide scintigraphy in patients with hormone-refractory prostatic adenocarcinoma can predict therapy outcome with octreotide treatment. *Anticancer Res* 18: 513-6.
- 39) Hara T., Kosaka N., Kishi H., 1998. PET imaging of prostate cancer using 11-C-choline. *J Nucl Med* 39: 990.
- 40) Adams S., Baum R.P., Hertal A., Wenisch H., Staib-Sebler E., Hermann C., 1998. Intraoperative gamma-probe detection of neuroendocrine tumors. *J Nucl Med* 39: 1155-60.
- 41) Hansson J., Abrahamsson P.A., 2003. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Scand J Urol Nephrol* 37 (suppl. 212): S28-36
- 42) Barcena D.G., Schally A.V., Buehfil M.V., Morales A.C., Hernandez V., Cornejo-Cardenas I., *et al.*, 2003. Response of patients with advanced prostatic cancer to administration of somatostatin analog RC-160 (vapeotide) at the time of relapse. *Prostate* 56: 183-91.
- 43) Schally A.V., Redding T.W., 1987. Somatostatin analogs as adjuncts to agonist of LH-RH in the treatment of experimental prostate cancer. *P Natl Acad Sci USA* 84: 7275-9
- 44) DeLellis R.A., Tischler A.S., and Wolfe H.J., 1984. Multidirectional differentiation in endocrine neoplasms. *J. Histochem. Cytochem* 32: 899-904.

- 45) Di Sant'Agnese P.A., de-MesyJensen KL, 1987. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Hum. Pathol* 18: 849-856.
- 46) Gould V.E., DeLellis R.A., 1983. The neuroendocrine cell system: Its tumors, hyperplasias and dysplasias. In: *Surgical Pathology*, SG Silverberg (ed). John Wiley and Sons, New York, 1487-1501.
- 47) Kulke M.H., Mayer R.J., 1999. Carcinoid tumors. *N Engl J Med* 340 (11): 858–868.
- 48) Tischler A.S., 1983. Gut peptide production by tumor cell lines in culture. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 82 18: 33- 43.
- 49) Tischler A.S., Lee Y.C., Perlman R.L., Costopoulos D., Slayton V.W., and Bloom S.R., 1984. Production of “ectopic” vasoactive intestinal peptide-like and neurotensin- like immunoreactivity in human pheochromocytoma cell cultures. *J. Neuroscience* 4: 1398-1404.
- 50) Kang J-L, Meyts E.R., Skakkebaek N.E., 1996. Immunoreactive neuron-specific enolase (NSE) is expressed in testicular carcinoma-in-situ. *J Pathol* 178:161–5.
- 51) Leong A., Cooper K., Leong F., 1999. *Manual of diagnostic antibodies for immunohistology*. London: Oxford University Press 101-2.
- 52) Poggi A. CD Guide. CD56. In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, *et al.*, editors. *Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan*. New York: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 1155-6.
- 53) Tsang W.Y., Chan J.K.C., Ng C.S., Pau M.Y., 1996. Utility of a paraffin section-reactive CD56 antibody (123C3) for characterization and diagnosis of lymphomas. *Am J Surg Pathol* 20:202-10.
- 54) Prieto V.G., Lugo J., McNutt N.S. Intermediate- and low-molecular-weight keratin detection with the monoclonal antibody MNF116. An immunohistochemical study on 232 paraffin-embedded cutaneous lesions. *J Cutan Pathol* 1996; 23:234-41
- 55) Goddard M.J., Wilson B., Grant J.W., 1991. Comparison of commercially available cytokeratin antibodies in normal and neoplastic adult epithelial and non-epithelial tissues. *J. Clin Pathol* 44: 660-3.
- 56) Gown A.M., Vogel A.M., 1984. Monoclonal antibodies to human intermediate filament proteins II. Distribution of filaments in normal human tissues. *Amer J Pathol* 114: 309
- 57) Marks R.A., Koch M.O., Lopez-Beltran A., Montironi R., Juliar B.E., Cheng L., 2007. The relationship between the extent of surgical margin positivity and prostate specific antigen recurrence in radical prostatectomy specimens. *Human Pathol* 36 (8): 1207-1211.

- 58)** De Nunzio C., Albisinni S., Presicce F., Lombardo R., Cancrini F., Tubaro A., 2014. Serum levels of chromogranin A are not predictive of high-grade, poorly differentiated prostate cancer: Results from an Italian biopsy cohort. *Urol Oncol* 32 (2): 80-4.
- 59)** Bice W.S., Prestidge B.R., Kurtzman S.M., *et al.*, 2008. Recommendations for permanent prostate brachytherapy with (131) Cs: a consensus report from the Cesium Advisory Group. *Brachytherapy* 7 (4): 290–6.
- 60)** Sidana A., Wang M., Chowdhury W.H., Toubaji A., Shabbeer S., Netto G., Carducci M., Lupold S.E., Rodriguez R., 2011. Does Valproic Acid Induce Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer? *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011:607480.
- 61)** Valentini A., Biancolella M., Amati F., *et al.*, 2007. Valproic acid induces neuroendocrine differentiation and UGT2B7 upregulation in human Prostate carcinoma cell line. *Drug Metabolism and Disposition* 35 (6): 968–972.
- 62)** Van Bergeijk J., Haastert K., Grothe C., Claus P., 2006. Valproic acid promotes neurite outgrowth in PC12 cells independent from regulation of the survival of motoneuron protein. *Chem Biol Drug Des* 67: 244-247.
- 63)** Winkler H., Fischer-Colbrie R., 1992. The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 49 (3): 497-528.