

Test mRNA PCA3^{DD3} / mRNA PSA Score

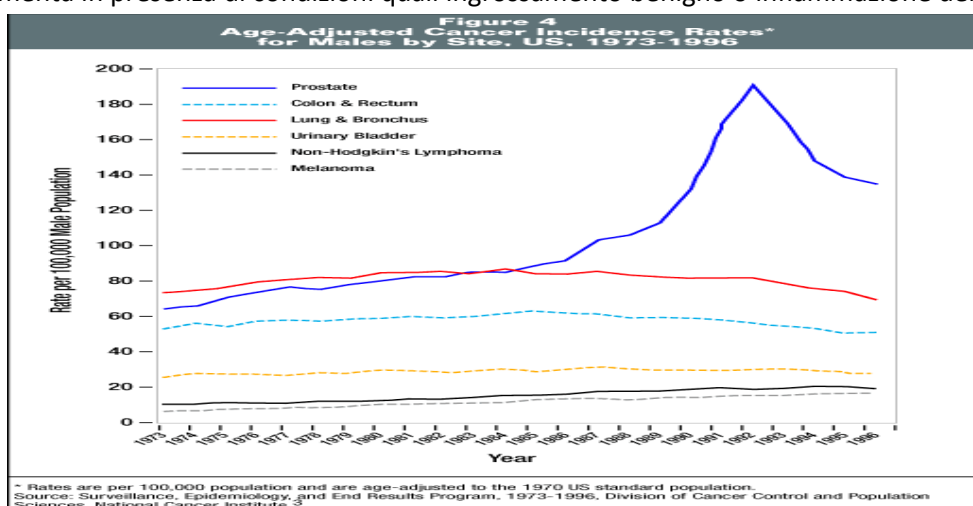
PCA3: un nuovo esame basato sull'espressione dei geni facilita la decisione del medico sull'opportunità o meno di consigliare l'esecuzione di una biopsia prostatica.

A cura di: D. Labella

Parole chiave (keywords)= mRNA PCA3 DD3, PSA mRNA KLK3, Real Time PCR quantitativa, ratio-score.

Il cancro della prostata (PCa) è il cancro più comune nell'uomo, risulta essere la seconda causa di morte nella popolazione occidentale e fra i più frequenti tumori correlati all'avanzare dell'età (Figura in basso). Nella maggior parte dei casi, il PCa è asintomatico. Solo una minoranza dei tumori della prostata progredisce rapidamente ed è potenzialmente letale. Occorre quindi individuare questi tumori prima che si diffondano al di fuori della prostata.

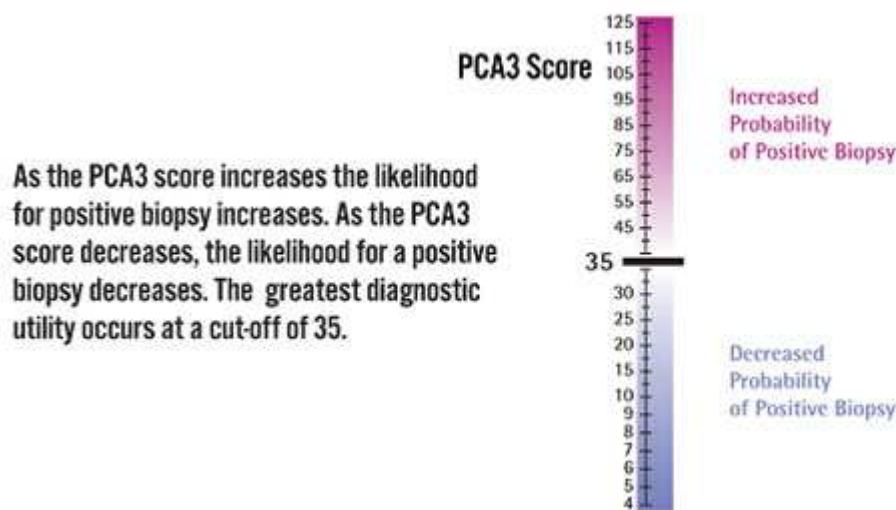
La biopsia prostatica è invasiva ma è il solo metodo valido per diagnosticare il PCa. Per stabilire la necessità di eseguire una biopsia sono attualmente utilizzati il dosaggio sierico dell'antigene specifico della prostata (PSA e free-PSA) e l'esplorazione digitale rettale (DRE), ormai largamente accettati come metodi effettivi per la diagnosi "precoce" del tumore. Anche se spesso risultano essere poco specifici e quindi non sempre attendibili come test di screening ma vanno poi approfonditi con la biopsia. Fino ad oggi, solo un valore di PSA inferiore rispetto al valore di riferimento specifico per l'età (2.5-6.5 ng/mL) poteva escludere la necessità di biopsia. Pertanto, per individuare i tumori a rischio di rapida progressione, i medici devono consigliare la biopsia prostatica a molti pazienti. Questo comporta due conseguenze indesiderate. In primo luogo, la biopsia può causare dolore, sanguinamento e infezione. In secondo luogo ed in modo più importante l'esecuzione di molte biopsie può portare alla diagnosi di molti tumori "indolenti" e condurre ad un trattamento non necessario. Inoltre sono stati riscontrati diversi casi in cui un elevato valore di PSA circolante corrispondeva ad una biopsia negativa mentre casi in cui il livello di PSA circolante era normale mentre la biopsia indicava una trasformazione oncogenica. In aggiunta la percentuale di tumori negli uomini con un livello di PSA compreso tra 2,5 e 4 ng/mL sottoposti a sistematica biopsia è di circa 20-23% (**Babajan R.J. et al.: J. Of Urology 2001-165; Catalona W.J. et al.: JAMA 1997-277;**). Negli studi di screening sulle popolazioni è stato stimato che circa ¼ dei tumori sfuggiti allo screening e con livelli di PSA da 0-4ng/mL hanno caratteristiche aggressive e sono organo-confinati. Inoltre esistono casi in cui l'aumento del PSA sierico è causato da ingrossamenti, infiammazioni della prostata, ed iperplasie benigne. Il Prostate Cancer gene 3 (PCA3) è un nuovo test basato sullo studio dell'espressione genica effettuato su cellule prostatiche in un campione di urina. Il PCA3 è altamente specifico per il PCa e, contrariamente al PSA, non aumenta in presenza di condizioni quali ingrossamento benigno o infiammazione della prostata.



IL PCA3 (mRNA del gene 3 del cancro della prostata PCA3^{DD3} o DD3^{PCA3}) è un mRNA specifico del tessuto prostatico che viene iper-espresso nelle cellule tumorali della prostata con un aumento medio di circa 66 volte superiore alla norma rispetto al tessuto benigno adiacente; mentre l'mRNA del gene KLK3 codifica per il PSA e la sua espressione rimane invariata nelle cellule normali benigne ed in quelle cancerose. Questa differente caratteristica di espressione tra PCA3 e PSA viene usata per standardizzare e normalizzare la quantità (concentrazione) di RNA specifico della prostata utilizzata per il test molecolare.

Gli mRNA vengono estratti e quantificati dalle cellule prostatiche contenute nelle urine dopo massaggio prostatico (DDR) mediante reazione di retrotrascrizione inversa (cDNA) e successiva amplificazione Real Time PCR con primers e sonde (TaqMan probe) altamente specifici e selettivi; il risultato quantitativo espresso in copie/mL si ottiene interpolando i valori di fluorescenza ottenuti dai campioni su una curva di calibrazione costruita su 5 pts durante la stessa reazione con dei calibratori a concentrazioni di RNA note. E' stata dimostrata l'applicabilità di analisi molecolari quantitative basate su PCA3 da sedimenti di urina e da urina intera. (*Hessel D et al. : European Urology 2003-44; Groskopf J. Et al.: Clin Chem.-2006*).

Il valore quantitativo risultante dal test sia per l'mRNA di PCA3 che per l'mRNA di PSA viene rapportato per normalizzare il risultato e la ratio (score) risultante viene confrontata su una tabella di valutazione del rischio, che stabilisce la probabilità di trovare una successiva biopsia prostatica positiva. Il dato è rafforzato dall'evidenza che l'espressione del mRNA PCA3 è indipendente dal volume della prostata, dal livello circolante di antigene specifico (PSA) e dal numero di biopsie già eseguite precedentemente. Inoltre l'mRNA di PCA3 è praticamente non espresso nelle cellule della maggior parte dei tessuti dell'organismo incluso i testicoli.



PCA3 score < 20 NEGATIVO

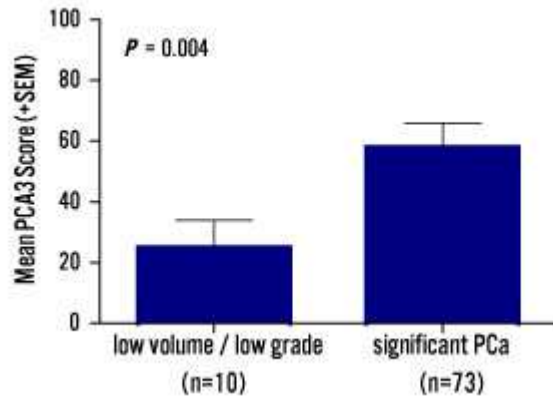
Condizione di rischio diminuito di ottenere un esito di biopsia positivo

20 > PCA3 score < 50 BORDERLINE

Condizione non certa di valutazione del rischio rispetto ad una successiva biopsia prostatica l'esame deve essere ripetuto nel tempo.

PCA3 score > 50 POSITIVO

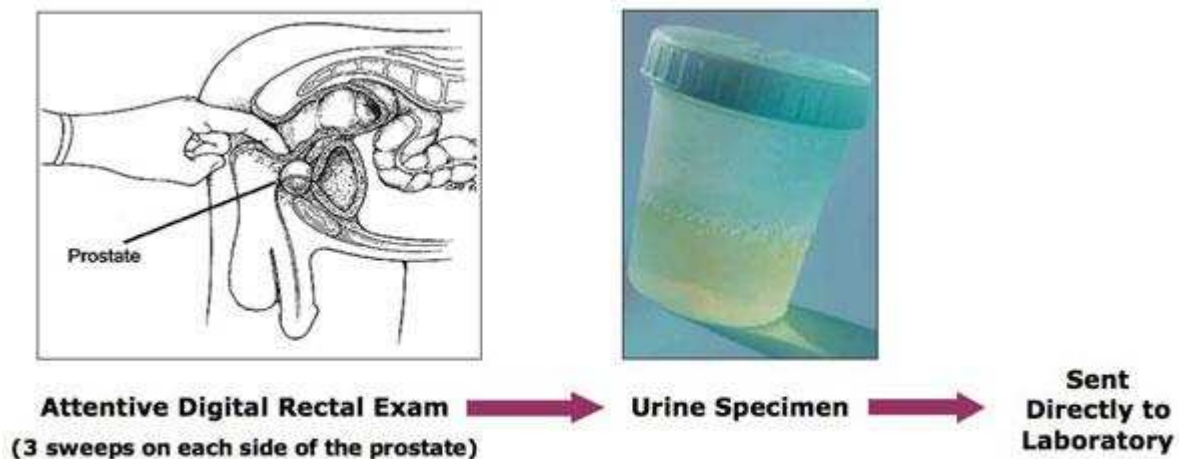
Condizione di rischio aumentato di ottenere un esito positivo in una successiva biopsia prostatica. Più aumenta lo score più aumenta la probabilità di biopsia della prostata positiva.



L'esame per avere naturalmente una maggiore precisione predittiva deve essere ripetuto nel tempo.

Prelievo, raccolta, trasporto e conservazione del campione:

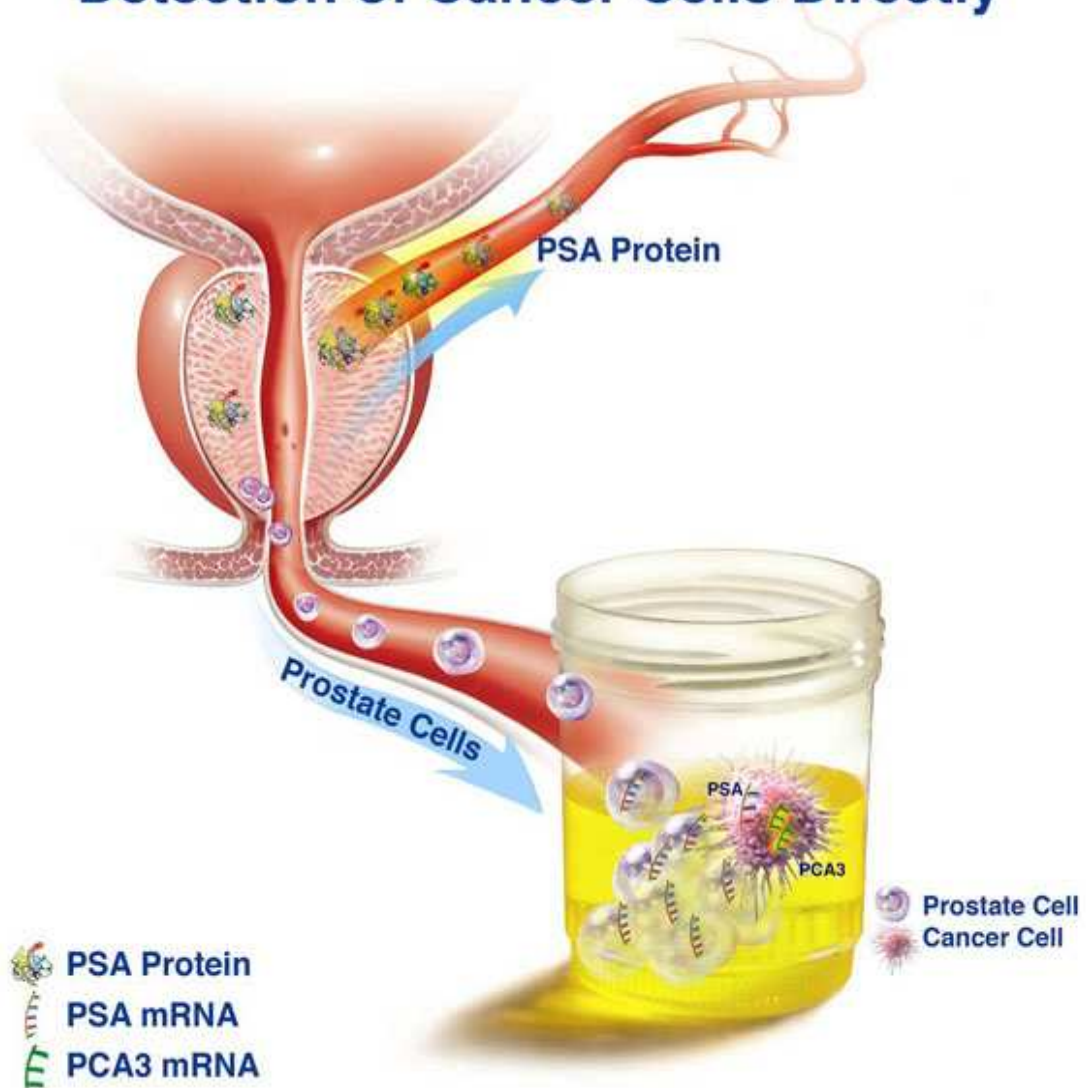
L'esame utilizza l'intera raccolta di urina a seguito di manipolazione digito-rettale (DRE) consistente in tre pressioni per ciascun lobo prostatico. Il DRE libera le cellule della prostata attraverso il sistema dei dotti di quest'ultima nel tratto urinario dove possono essere raccolte nell'urina di primo getto. Inoltre si consiglia di chiedere al paziente di bere una gran quantità di acqua (almeno 500ml) per ottenere un volume di urina sufficiente. Eseguire esattamente tre pressioni per ciascun lobo prostatico partendo dalla base e procedendo verso l'apice e dalla linea laterale a quella mediana comprimendo una superficie di circa 1cm (questa operazione non va intesa come massaggio prostatico). Dopo il DRE, chiedere al paziente di raccogliere l'urina di primo getto (circa 20-30mL). Il volume minimo di campione richiesto è di 2,5-5,0 mL ; volumi inferiori non garantiscono l'adeguato numero di cellule prostatiche da sottoporre ad esame e di conseguenza un risultato non attendibile. **Campioni di urina raccolti senza o insufficiente manipolazione prostatica hanno dimostrato uno scarso livello informativo.**



I campioni di urina dovrebbero essere trattati nel più breve tempo possibile, in alternativa possono essere conservati in frigorifero in un intervallo di temperatura $+2^{\circ}\text{C} > T < 8^{\circ}\text{C}$, possono essere conservati non oltre 14gg. non congelare i campioni.

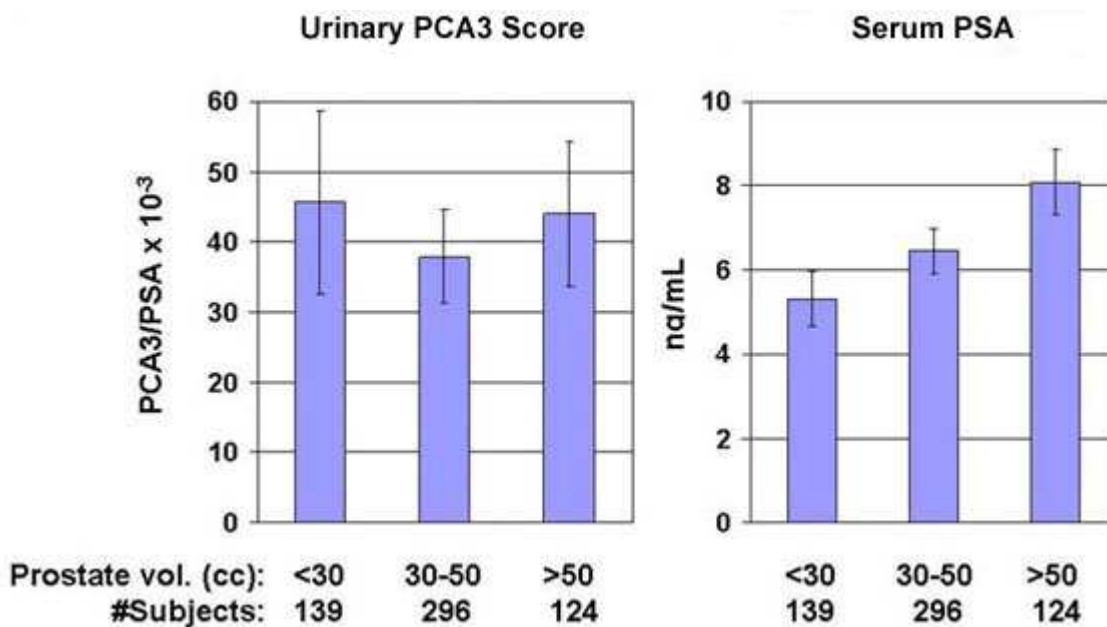
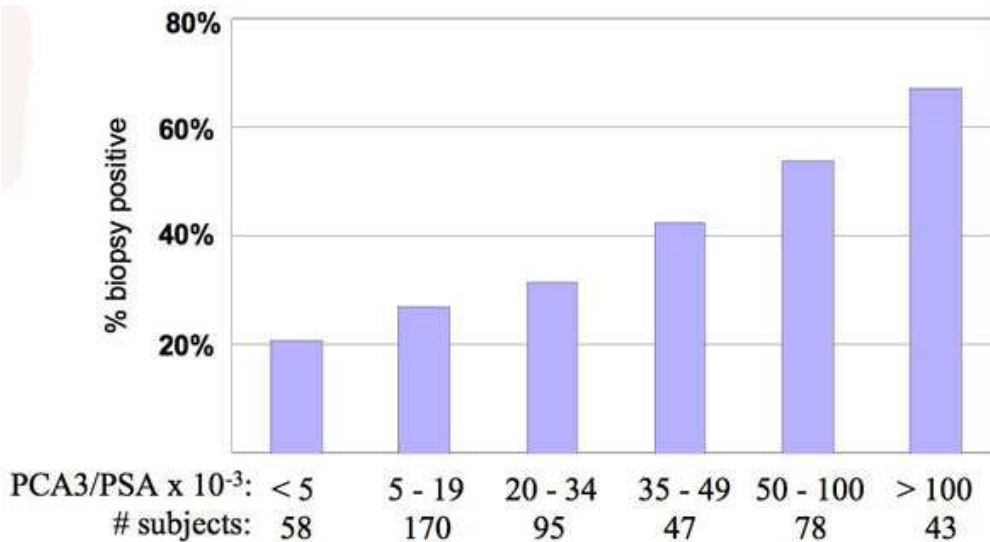
I campioni di urina possono essere trasportati ad una temperatura non superiore ai 30°C, in tal caso la stabilità si riduce e devono essere processati entro 5 gg. dalla raccolta.

Detection of Cancer Cells Directly



Risultati ed interpretazione:

Il PCA3 score viene calcolato come il rapporto tra il numero di copie mRNA di PCA3 ed il numero di copie di mRNA KLK3 (PSA) moltiplicato per 1000. Se il PCA3 Score riportato si trova al di sotto del valore soglia il risultato va interpretato come Negativo; se il PCA3 score è al di sopra del valore soglia o equivale ad esso, il risultato va interpretato come positivo. Se il PCA3 Score è basso, la biopsia può essere rinviata o addirittura evitata. In questo modo, il PCA3 Test aiuta ad evitare molte biopsie non necessarie e i conseguenti potenziali disagi e complicazioni (dolore, sanguinamento ed infezioni) per i soggetti interessati.



Il limite di sensibilità per la detezione del mRNA PCA3 è inferiore a 100 copie/mL ed una specificità diagnostica superiore al 94%.

In quali casi è consigliabile eseguire il test:

Il test di espressione del PCA3 è consigliabile nei casi in cui il paziente mostra un elevato livello di PSA totale ma che non ha una storia di cancro e non ha mai eseguito una biopsia. Nei pazienti in cui è stato diagnosticato un cancro prostatico pur riscontrando livelli normali di PSA. Nei pazienti con elevati livelli di PSA associato a vari gradi di prostatiti ed in quelli sottoposti ad un continuo monitoraggio per presunte patologie micro-focali.

Il PCA3 Test può essere utilizzato anche in soggetti con una o più precedenti biopsie negative per determinare la probabilità che un'ulteriore biopsia sia positiva, o in altri termini per valutare la necessità dell'esecuzione di un'ulteriore biopsia.

Se la biopsia viene eseguita e risulta positiva, il PCA3 Score può essere utilizzato come informazione complementare per determinare il rischio preoperatorio di progressione del PCa e la necessità di trattamento precoce.

Se siete preoccupati di avere un PCa a causa di un alto livello di PSA o vi sentite insicuri a causa di una biopsia precedentemente eseguita con risultato negativo, il PCA3 Test può fornire ulteriori informazioni che possono aiutare paziente e medico a valutare l'opportunità di procedere ad una (nuova) biopsia.

Referenze Bibliografiche:

1. Magklara A, Scorilas A, Stephan C, Kristiansen GO, Hauptmann S, Jung K and Diamandis EP: Decreased concentrations of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 in malignant versus nonmalignant prostatic tissue. *Urology*. 56: 527-32, 2000.
2. Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, Lucia MS, Goodman PJ, Crowley JJ, Parnes HL and Coltman CA, Jr.: Operating characteristics of prostate-specific antigen in men with an initial PSA level of 3.0 ng/ml or lower. *Jama*. 294: 66-70, 2005.
3. Stamey TA, Caldwell M, McNeal JE, Nolley R, Hemenez M and Downs J: The prostate specific antigen era in the United States is over for prostate cancer: what happened in the last 20 years? *J Urol*. 172: 1297-301, 2004.
4. Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, Debruyne FM, Ru N and Isaacs WB: DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 59: 5975-9, 1999.
5. de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW, Hessels D, Kiemeny LA, Aalders TW, Swinkels DW and Schalken JA: DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res*. 62: 2695-8, 2002.
6. Schalken JA, Hessels D and Verhaegh G: New targets for therapy in prostate cancer: differential display code 3 (DD3(PCA3)), a highly prostate cancer-specific gene. *Urology*. 62: 34-43, 2003.
7. Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B, Kiemeny LA, Witjes JA and Schalken JA: DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol*. 44: 8-15; discussion 15-6, 2003.
8. Fradet Y, Saad F, Aprikian A, Dessureault J, Elhilali M, Trudel C, Masse B, Piche L and Chypre C: uPM3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer. *Urology*. 64: 311-5; discussion 315-6, 2004.
9. Tinzl M, Marberger M, Horvath S and Chypre C: DD3PCA3 RNA analysis in urine--a new perspective for detecting prostate cancer. *Eur Urol*. 46: 182-6; discussion 187, 2004.
10. Groskopf J, Aubin SM, Deras IL, Blase A, Bodrug S, Clark C, Brentano S, Mathis J, Pham J, Meyer T et al.: APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem*. 52: 1089-95, 2006.
11. Marks LS, Fradet Y, Deras IL, Blase A, Mathis J, Aubin SMJ, Cancio AT, Desaulniers M, Ellis WJ, Rittenhouse HG, Groskopf J: Prostate cancer specificity of PCA3 Urinary Gene Test. In Press, *Urology*, 2006

Scheda anamnestica per PCA3 Test

Cognome:

Nome :

Età:.....Data di nascita:.....

Patologie pregresse correlabili alla prostata:.....

Data prelievo campione:.....

Dati relativi alla richiesta di Test PCA3

- Motivo per cui si richiede il test:
 1. Screening per età:
 2. Programma di vigilanza e prevenzione (follow-up):
 3. Monitoraggio a seguito di:.....
- Conclusioni a seguito di visita DRE (Digito rettale):
- Status dell'organo (ipertrofico, normale, ipotrofico).....
- Valori di PSA totale e PSA Free recenti:
- Risultati di precedenti Biopsie prostatiche:
- Altri risultati correlabili (eco-transrettale, rettoscopia, colonscopia):
.....
- Precedenti risultati di PCA3 se già effettuati:
- Interventi chirurgici correlati:
- Note di rilievo:

Il Medico Specialista Compilatore:

Limiti del test:

Il test PCA3 score non va eseguito su pazienti in trattamento con farmaci che possono influenzare significativamente i livelli di PSA sierico, come il **Finasteride (Proscar, Propecia, Prostate, Finastid, Genaprost)**, il **Dutasteride (Avodart)** e la terapia antiandrogena con Leuprolina (**Enantone**) e Bicalutamida (**Casodex**).

L'affidabilità del test è strettamente correlata **alla correttezza della raccolta del campione di urina**, nonché al rispetto delle procedure di manipolazione del campione post-minzione, soprattutto quando l'esame viene effettuato su campioni provenienti da strutture decentrate.

I risultati **falsamente negativi** possono dipendere anche da una scarsa quantità di cellule presenti nel campione di urina raccolto dopo esplorazione igito-rettale.

Significati diagnostici del test

