

Overexpression della laminina-5 (LN-5) nel lavaggio peritoneale di pazienti con carcinomi del grosso intestino. Risultati preliminari

A. VOLPI, G. D'ELIA¹, O.C. PANNARALE, F. DI GENNARO, P. GUIDA², E. MARTINELLI, A. KAVVADIAS, G. BALDUCCI, P. IALONGO, A. PANEBIANCO, M. DE LUCA, G. FABIANO, N. PALASCIANO

RIASSUNTO: Overexpression della laminina-5 (LN-5) nel lavaggio peritoneale di pazienti con carcinomi del grosso intestino. Risultati preliminari.

A. VOLPI, G. D'ELIA, O.C. PANNARALE, F. DI GENNARO, P. GUIDA, E. MARTINELLI, A. KAVVADIAS, G. BALDUCCI, P. IALONGO, A. PANEBIANCO, M. DE LUCA, G. FABIANO, N. PALASCIANO

Studi recenti evidenziano che l'interazione fra LN-5 (proteina formata da 3 catene $\alpha3/\beta3/\gamma2$) e cellule neoplastiche è importante nella invasione tumorale, anche nel cancro colo-rettale. La disseminazione peritoneale, che sembra originare dalle FPTCs (Free Peritoneal Cancer Cells), peggiora la prognosi di questi pazienti, anche dopo chirurgia radicale. Pertanto, per rilevare FPTCs, sono state utilizzate varie tecniche (immunoistochimica, PCR). La RT-PCR ha permesso di valutare la presenza di marker tumore-associati nel lavaggio peritoneale (utilizzando primer specifici per CEA, cK-20). Attualmente la citologia del liquido peritoneale ha bassa sensibilità. L'obiettivo del nostro studio è di studiare l'espressione della LN-5 nel lavaggio peritoneale pre/post-operatorio di pazienti con carcinoma coloretale e di pazienti sani con RT-PCR semiquantitativa, valutandone l'intensità all'elettroforesi: alta intensità indica overexpression. I lavaggi pre/post-operatori di 30 pazienti con cancro coloretale (13M/17F) di età mediana 69 (58-84) e di 10 pazienti sani sono stati analizzati mediante citologia sec. Papanicolaou e RT-PCR. Nessun paziente sano ha mostrato citologia positiva od overexpression di LN-5. L'overexpression di LN-5 è stata riscontrata nel 56,6% nel pre e nel 76,6% nel post-operatorio, con maggior frequenza del gene LAMC2. Ciò evidenzia una relazione tra FPTCs e LN-5, e quest'ultima potrebbe essere usata come marker nella individuazione di pazienti a maggior rischio di recidiva. Unico dato statisticamente significativo è la correlazione tra LAMB3 nel lavaggio postoperatorio e mortalità ($p=0.026$). Tuttavia, l'accuratezza diagnostica dovrebbe essere ricercata associando RT-PCR quantitativa con Western-blot e dosaggio sierico di LN-5. Inoltre, per validare questi dati, è necessario analizzare un maggior numero di pazienti ed i loro follow-up.

SUMMARY: Overexpression of laminine-5 (LN-5) in peritoneal lavage of colorectal cancer patients preliminary results.

A. VOLPI, G. D'ELIA, O.C. PANNARALE, F. DI GENNARO, P. GUIDA, E. MARTINELLI, A. KAVVADIAS, G. BALDUCCI, P. IALONGO, A. PANEBIANCO, M. DE LUCA, G. FABIANO, N. PALASCIANO

Recent studies show that interaction between LN (heterotrimeric protein formed by $\alpha3/\beta3/\gamma2$ chains) and cancer cells plays an important role in tumor invasion, also in colorectal cancer. The overall survival was significantly worse in patients with free peritoneal cancer cells (FPTCs): detection of FPTCs after curative surgery is a challenge, because could improve staging and prognosis. Peritoneal cytology is the current standard procedure with very low sensitivity. We aimed to study the expression of LN5 in the peritoneal lavage of colorectal cancer pts and in controls with semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). LN-5 overexpression was evaluated observing PCR-products intensity at electrophoresis: high intensity is correlated to overexpression. Pre and post-operative peritoneal lavages of 30 pts with colorectal cancer (13M;17F), with median age of 69 (58-84), and of 10 controls, were analyzed by conventional cytology and a semiquantitative RT-PCR. No cancer pts showed pre/postoperative negative cytology and did not express LN-5. In cancer pts, cytology was positive in 2 pts in pre/postoperative lavage. LN-5 overexpression was observed in 56,6% preoperatively and in 76,6% postoperatively. LN-5 g 2 chain was most frequent chain.

Our study suggests a relationship between LN-5 and FPTCs, as shown by the low expression of laminine in controls. LN-5 could be a useful marker to identify a subgroup of early-stage patients at increased risk of recurrence; moreover, mortality seems to correlated to LAMB3 chain. The diagnostic accuracy could be improved by using a quantitative RT-PCR or western-blot and detecting serum laminine. Finally, to validate these findings a larger number of pts with follow-up study is required.

KEY WORDS: Laminina-5 - Lavaggio peritoneale - Cancro coloretale - FPTCs - RT-PCR. Laminin-5 - Peritoneal lavage - Colorectal cancer - FPTCs - RT-PCR.

Premessa

La prognosi dei pazienti con cancro coloretale, dipende dall'estensione della malattia neoplastica al momento della diagnosi. La possibilità di effettuare un intervento chirurgico radicale è ancora oggi il più importante elemen-

Università degli Studi di Bari
Dipartimento d'Emergenza e Trapianti d'Organo
Unità Operativa di Chirurgia Generale III Universitaria
(Direttore: Prof. N. Palasciano)

¹ Biologa
² Statistico

© Copyright 2011 CIC Edizioni Internazionali, Roma

to prognostico e l'unico trattamento efficace per queste neoplasie: purtroppo anche in questi casi possono comparire recidive locali o metastasi a distanza anche in breve tempo (1). La disseminazione peritoneale origina dalle FPTCs (*Free Peritoneal Tumor Cells*) e l'interessamento peritoneale massivo, definito carcinosi peritoneale, si associa ad una prognosi sfavorevole con exitus del paziente a breve distanza dalla diagnosi (2). Il sistema di stadiazione comunemente adottato (sec. TNM), può non essere accurato, soprattutto nei pazienti con stadio II e III. La valutazione della estensione di malattia è infatti estremamente difficile, in quanto tutte le tecniche moderne di diagnostica per immagini riescono difficilmente a dare la reale entità della diffusione e spesso non sono in grado di dimostrare la presenza della miliare neoplastica che potrebbe controindicare l'intervento chirurgico radicale (3). Numerosi sono gli studi atti ad evidenziare le FPTCs all'interno della cavità addominale e a questo riguardo sono state utilizzate varie tecniche che esaminavano i fluidi peritoneali usando la citologia convenzionale, l'immunostochimica e la RT-PCR (reazione polimerasica a catena con transcriptasi inversa) (4). Quest'ultima ha permesso di valutare la presenza di marker tumore – associati nel liquido di lavaggio peritoneale, utilizzando *primers* specifici per particolari geni come il CEA e cK-20, anche se a tutt'oggi non esiste, tra questi, una sensibilità che si avvicini al 100%. Negli ultimi anni sono emersi studi su integrine e laminine e loro ruolo nella diffusione delle cellule neoplastiche (5). Le prime sono molecole recettoriali capaci di mediare le risposte extracellulari con quelle intracellulari: possono infatti trasmettere segnali dalla matrice extracellulare all'interno della cellula, regolando il differenziamento e la proliferazione cellulare, per cui cambiamenti nell'espressione di queste molecole potrebbero contribuire alla formazione del fenotipo neoplastico.

Le laminine costituiscono un gruppo di glicoproteine eterotrimetriche (3 catene diverse α , β e γ) della matrice extracellulare, localizzate a livello della membrana basale. Queste catene sono diverse tra loro per ciò che concerne alcune sequenze aminoacidiche, per cui le varie isoforme vengono indicate con il numero accanto alla lettera greca (α_1 , β_1 , γ_1 , ecc.). Queste glicoproteine vengono sintetizzate da numerosi tipi di cellule e l'espressione delle isoforme è cellula-specifica/tessuto-specifica. L'overexpression della LN-5 è stata riscontrata in neoplasie maligne, tra cui il carcinoma coloretale, dove si è osservata una maggiore presenza nel citoplasma delle cellule cancerose, sul versante cosiddetto invasivo. Nel processo di disseminazione peritoneale, le FPTCs verrebbero inglobate dalla sostanza extracellulare per mezzo delle integrine (6) e dalla rete di fibrina che favorirebbe il processo stesso. Dai pochi studi effettuati sull'argomento, risulterebbe che l'integrina $\alpha_3\beta_1$ e $\alpha_6\beta_4$ giocano un ruolo essenziale nel mediare le fasi iniziali di ancoraggio delle cellule neoplastiche al peritoneo, portando alla formazione di me-

tastasi peritoneali. La LN-5 sembra essere il ligando ad alta affinità per l'integrina $\alpha_3\beta_1$, facilitando attacco ed adesione nel sito di metastasi (7). La maggior parte degli studi condotti si basa però su tecniche di immunostochimica, indagine complessa e difficile da standardizzare (8). In questo studio abbiamo utilizzato tecniche di biologia molecolare, come la RT-semiquantitativa: questa metodica precisa e sensibile, che permette di evidenziare una cellula tumorale su un milione di cellule normali, ha consentito l'analisi dei geni LAMA3-LAMB3-LAMC2 che codificano tutte e tre le catene della LN-5. In questo modo è possibile valutare se l'espressione genica della LN-5, nei casi di cancro coloretale, è alterata.

Pazienti e metodi

Dal giugno 2005 al novembre 2008, presso l'U.O. di Chirurgia Generale III dell'Università di Bari, sono stati arruolati per il nostro studio 30 pazienti (13 M; 17 F), di età mediana di 69 anni (58-84) affetti da neoplasie maligne del grosso intestino (21 colon, 8 retto ed 1 appendice); 10 pazienti, con patologie endoaddominali non neoplastiche sono stati arruolati come gruppo controllo. La stadiazione preoperatoria è stata eseguita mediante TC addominopelvica. Il consenso informato è stato ottenuto da tutti i partecipanti. Sono stati esclusi dallo studio pazienti con diagnosi preoperatoria di malattia neoplastica avanzata, cirrotici scompensati, portatori di ascite neoplastica o emoperitoneo, pazienti con infezioni sistemiche gravi e tutti i pazienti ricoverati in urgenza. Riguardo la stadiazione TNM, 3 pazienti appartengono al I stadio, 9 al II, 12 al III e 5 al IV stadio. Nell'ambito del grading, 9 pazienti presentavano tumori scarsamente differenziati, 12 pazienti moderatamente differenziati e 8 pazienti ben differenziati. L'unico carcinoide, a bassa malignità secondo Capella, presentava istotipo a *goblet cells*. Diciassette pazienti sono stati sottoposti ad interventi chirurgici a cielo aperto e 13 pazienti a interventi videolaparoscopici, in relazione alle preferenze del primo operatore. Per quel che concerne il lavaggio peritoneale, 200 ml di soluzione fisiologica sono stati introdotti nella cavità addominale; dopo opportuni movimenti atti a diffondere la soluzione, 50 ml vengono prelevati per la citologia standard (ThinPrep/Papanicolaou) e 50 ml per effettuare la RT-PCR per valutare l'espressione genica (LAMA3, LAMB3 e LAMC2) della LN-5 con *primers* specifici (Tab.1) corrispondenti alle tre catene $\alpha_3\beta_3$ - γ_2 . La stessa procedura viene ripetuta alla fine dell'intervento per analizzare il lavaggio post-operatorio. L'RNA viene estratto con TRIzol usando la tecnica di Chomczynski (9), sottoposto ad RT-PCR con High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Branchburg NJ, USA) e successiva amplificazione. I prodotti della reazione vengono separati su gel di agarosio, fotografati ed analizzati utilizzando un software (KODAK Molecular Imaging Software 4.0). Dopo normalizzazione con la β -actina e il confronto con i campioni controllo, è stata valutata l'overexpression della LN-5 osservando l'intensità della banda dopo elettroforesi: la maggiore intensità indica l'overexpression (analisi semiquantitativa) nei campioni dei lavaggi peritoneali.

Metodi statistici. Le variabili continue sono state confrontate mediante test non-parametrico U di Mann-Whitney. Le associazioni tra variabili categoriche sono state valutate con il test esatto di Fisher o il test di McNemar per campioni appaiati. Le curve di sopravvivenza sono state rappresentate graficamente mediante metodo di Kaplan-Meier e sono state confrontate con il Log-Rank test. I test sono stati considerati statisticamente significativi per $p < 0.05$.

TABELLA 1 - LISTA DEI PRIMERS USATI.

cDNA	Primer	5'-3' sequenza	Lunghezza (bp)
LN-5	LAM A 3 (for)	ACATCTCTGTCCTTGTCTTCT	531
	LAM A 3 (rev)	CAAGGCTCCACTTCAGTTGTG	
	LAM B 3 (for)	CGGGATCCTGCTTCTGTACGGCCAT	983
	LAM B 3 (rev)	GGAATTCTCACACGCACACCGGGTAGC	
	LAM C 2 (for)	AAAGCCACGTTGAGTCAGC	312
	LAM C 2 (rev)	TCTTCCACCTGAAAGGACTGAT	

Risultati

Le caratteristiche dei pazienti arruolati sono illustrate nella Tabella 2. Il gruppo controllo ha presentato citologia standard negativa sia nei campioni pre- che postoperatori e non ha presentato alcuna overexpression della LN-5. All'interno del gruppo dei pazienti neoplastici la situazione è risultata di gran lunga differente. La citologia è risultata positiva in 2 pazienti, sia nel lavaggio pre- che post-operatorio. L'overexpression della LN-5 (Fig. 1) è stata riscontrata in 17 pazienti (56,6%) nel pre- ed in 23 pazienti (76,6%) nel post (Tab. 3). Per ciò che concerne la laminina-5, dai risultati dell'analisi biologica molecolare è emersa una eterogenea espressione delle tre catene della LN-5: la catena $\gamma 2$ è risultata essere la più rappresentata, in quanto è overespressa in 12 pazienti nel preoperatorio ed in 20 pazienti nel postoperatorio; segue la catena $\beta 3$ con 5 pazienti nel preoperatorio e 13 pazienti nel postoperatorio; infine la catena $\alpha 3$ nel lavaggio peritoneale preoperatorio è overespressa in 4 pazienti e in 13 pazienti nel postoperatorio. L'unico paziente con carcinoma appendicolare ha manifestato overexpression del-

TABELLA 2 - CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI.

Pazienti	Neoplastici	Non neoplastici
Età media (range)	69/ (58-84)	56/(38-74)
M/F	13/17	5/5
Diagnosi	Colon 21 Retto 8 Carcinoide appendice 1	Litiasi Colecisti 7 Aderenze intestinali 2 Lipoma 1
Chirurgia open/ Videolaparoscopica	17/13	3/7

la catena $\gamma 2$, sia nel pre- che nel postoperatorio. Solo 5 pazienti del gruppo neoplastici non hanno presentato overexpression della LN-5. Abbiamo raggruppato i pazienti per omogeneità dei trattamenti - appartenenti agli stadi I e II in un gruppo e quelli appartenenti agli stadi II-IV - ma non abbiamo trovato correlazioni fra stadi azione ed overexpression della LN-5. Anche rispetto al grading non si osservano differenze statistiche fra i due gruppi.

Invece, per quanto concerne la sopravvivenza, i risultati hanno dimostrato una correlazione statisticamente si-

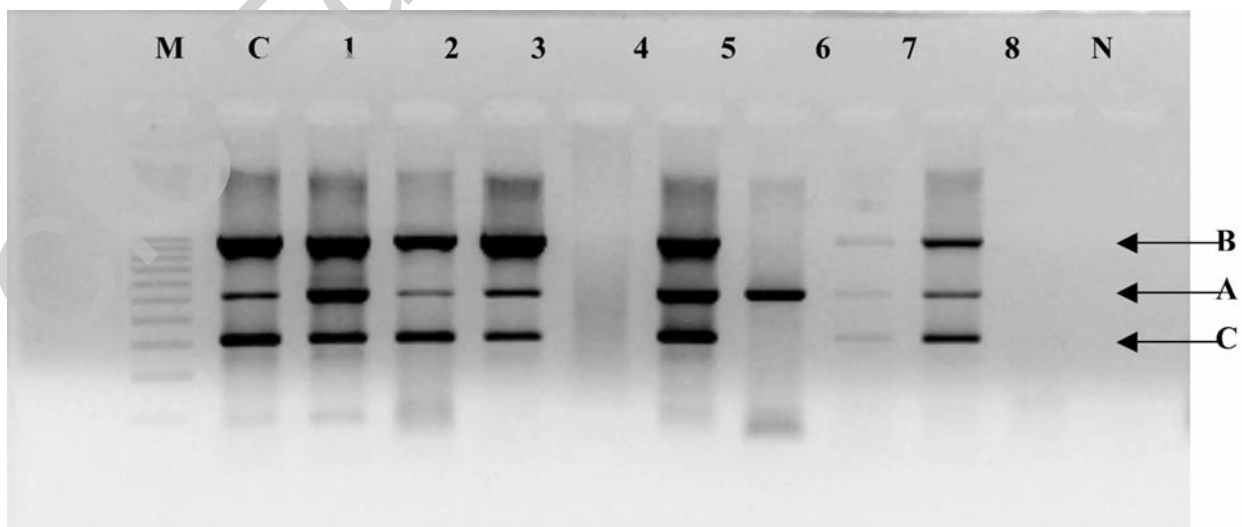


Fig. 1 - Multiplex-PCR Laminina in quattro campioni rappresentativi di lavaggio. M= Marker; C=Controllo positivo (HT29); 1,3,5,7=lavaggio pre-intervento; 2,4,6,8=lavaggio post-intervento; N=controllo negativo.

TABELLA 3 - OVEREXPRESSION DELLA LN-5 E POSITIVITÀ DELLA CITOLOGIA STANDARD NEI LAVAGGI PERITONEALI PRE- E POSTOPERATORI.

Washing	Citologia standard	Overexpression LN-5
PREOPERATORIO	2 (6.6%)	17 (56.6%)
POSTOPERATORIO	2 (6.6%)	23 (76.6%)

gnificativa fra exitus dei pazienti e positività alla LAMB3 nel washing postoperatorio ($p=0.026$) (Fig. 2).

Discussione

Dal nostro studio, anche se condotto su uno scarso numero di pazienti, risulta evidente che l'overexpression dell'LN-5, rilevata su liquido di lavaggio peritoneale, risulta legata alla presenza di FPTCs; questa affermazione è possibile anche per la grande sensibilità della RT-PCR semiquantitativa nella ricerca delle cellule neoplastiche libere. Al contrario i casi controllo non hanno mostrato alcuna overexpression della LN-5. Inoltre emerge anche la scarsa affidabilità dell'esame citologico standard, positivo in una bassissima percentuale di casi. Inoltre abbiamo riscontrato un'overexpression del gene LAMC2, risultato che trova conferma nella in recenti studi di immunohistochemica (10); nel post-operatorio l'overexpression aumenta ancora, sicuramente in relazione alle procedure chirurgiche. Tutto ciò suggerisce un possibile utilizzo della LN-5 come marker per evidenziare

FPTCs ed acquisterebbe una notevole importanza clinica riguardo le terapie post-operatorie. Infatti la stadiazione TNM, non considerando la diffusione transcelomatica in alcuni aspetti, rischia di escludere alcuni pazienti appartenenti al II stadio da eventuali terapie adiuvanti (10). Emergono però alcuni interrogativi:

1) che significato ha la low-expression nei pazienti neoplastici? Potrebbero essere falsi negativi?

2) possono esserci correlazioni tra LN-5 e staging e grading?

3) ci sono relazioni intercorrenti tra LN-5 ed altri possibili markers di rilevamento di FPTCs come, CEA, CK-20, ecc.?

4) quale potrebbe essere il significato della maggiore frequenza della catena γ 2?

Alcuni studi sono stati condotti a riguardo, ma al momento non ci sono ancora procedure standardizzate per uso clinico (11, 12).

Un altro elemento che non contribuisce a chiarire le problematiche è che pochi sono gli studi condotti sul lavaggio peritoneale; infatti la stragrande maggioranza dei lavori sulla LN-5 sono stati condotti sul siero e su tessuto (4, 10, 11). Pertanto risulta che la RT-PCR semiquantitativa, associata ad altre procedure come il dosaggio sierico o il Western-blot, potrebbe aumentare l'accuratezza diagnostica e chiarire l'assenza di overexpression in alcuni pazienti neoplastici.

Conclusioni

La LN-5 potrebbe essere di ausilio nella precoce identificazione di sottogruppi di pazienti che potrebbero pre-

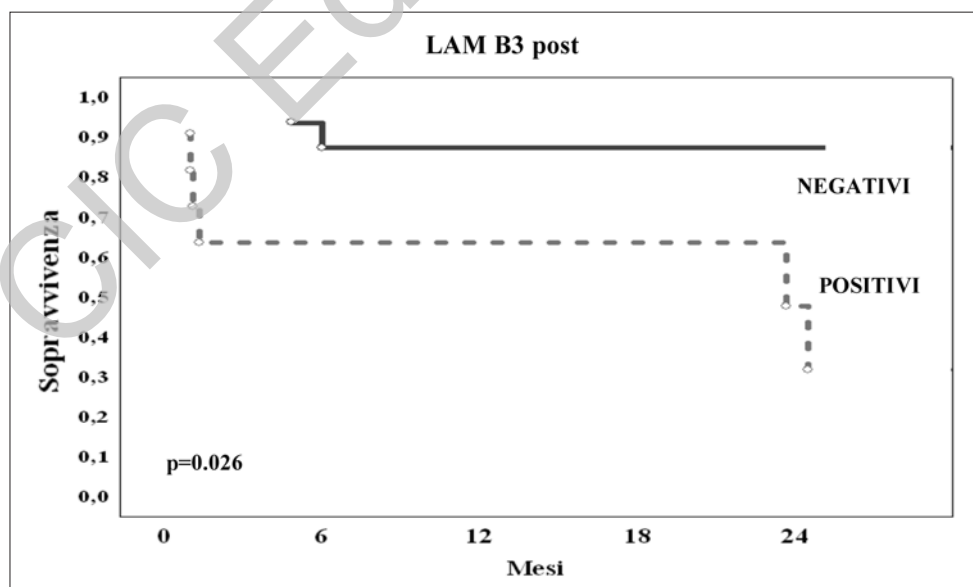


Figura 2 - Curva di sopravvivenza secondo Kaplan-Meier.

sentare un aumentato rischio di recidiva anche dopo chirurgia radicale e beneficiare di trattamenti adiuvanti nel trattamento post-operatorio. L'accuratezza diagnostica andrebbe ricercata associando alla RT-PCR semiquantitativa altre metodiche come la *real time* RT-PCR, il western-blot oltre al dosaggio sierico della LN-5. Pertanto l'overexpression della LN-5 nel lavaggio peritoneale

di pazienti neoplastici *potrebbe essere* considerata di valido ausilio nel miglioramento dello staging del carcinoma coloretale. Però, per trovare correlazioni statisticamente valide a fini diagnostici e prognostici, occorre arruolare un maggior numero di pazienti ed effettuare follow-up di lunga durata, valutando tra le varie metodiche quella con maggiore sensibilità.

Bibliografia

1. Rekhraj S, Aziz O, Prabhudesai S, Zacharakis E, Mohr F, Athanasou Tet Al. Can intra-operative intraperitoneal free cancer cell detection techniques identify patients at higher recurrence risk following curative colorectal cancer resection: a meta-analysis Ann Surg Oncol 2008;15(1):60-8. Epub 2007 Oct 2.
2. Carmignani P, Sugarbaker TA, Bromlei CM, Sugarbaker P. "Intraperitoneal cancer dissemination: Mechanism of the patterns of spread". Cancer and Metastasis Review 2003;22:465-472.
3. Dromain C, Leboulleux S, Auperin A, Goere D, Malka D, Lumbroso J, et Al. Staging of peritoneal carcinomatosis: enhanced CT vs. PET/CT. Abdom Imaging 2008;33(1):87-93.
4. Julia M. Lloyd, Cassandra M. McIve, Sally-Anne Stephenson, Peter J. Hewett, Nicholas Rieger and Jennifer E. Hardingham Identification of Early-Stage Colorectal Cancer Patients at Risk of Relapse Post-Resection by Immunobead Reverse Transcription-PCR Analysis of Peritoneal Lavage Fluid for Malignant Cells Clinical Cancer Research 2006;12:417-423.
5. Malinda KM et Al. The Laminins Int J Biochem Cell Biol 1996 ;28 :957-95.
6. Favoulet P, Benoit L, Favre SP. Interet des lavage abdominaux pour la prevention de l'ensemencement neoplasique peritoneal . Annales De Chirurgie 2003 ;128: 590-593.
7. Saito N, Kameoka S. Serum laminin is an independent prognostic factor in colorectal cancer. Int J Colorectal Dis 2005;20(3):238-44.
8. Patarroyo M, Tryggvason K, Virtanen I. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. Semin Cancer Biol 2002 Jun;12(3):197-207.
9. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162(1):156.
10. Aoki S, Nakanishi Y, Akimoto S, Moriya Y, Yoshimura K, Kitajima M, et Al. Prognostic significance of laminin-5 gamma2 chain expression in colorectal carcinoma: immunohistochemical analysis of 103 cases. Diseases of the Colon and Rectum 2002;45: 1520-1527.
11. Bosch B, Guller U, Sihndler A, Maurer R, Horder F. Perioperative detection of disseminated tumour cells is an independent prognostic factor in patients with colorectal cancer. British Journal of Surgery 2003; 90: 882-888.