

La laminina-5 (LN-5) nei carcinomi del colon-retto: espressione genica nel lavaggio peritoneale

A. VOLPI, G. D'ELIA¹, O.C. PANNARALE, G. FABIANO, A. KAVVADIAS, A. PANEBIANCO, F. DI GENNARO, G. BALDUCCI, P. IALONGO, C. PUNZO, A. PEZZOLLA, F. FERRARESE, G. DE PASQUALE, M. LOSPALLUTI, N. PALASCIANO

Dipartimento Emergenza e Trapianti d'Organo, Università di Bari
U.O. Chirurgia Generale III

¹ Laboratorio DETO

SUMMARY: Laminin-5 (LN-5) in colorectal cancer: genic expression in peritoneal lavage.

A. VOLPI, G. D'ELIA, O.C. PANNARALE, G. FABIANO, A. KAVVADIAS, A. PANEBIANCO, F. DI GENNARO, G. BALDUCCI, P. IALONGO, C. PUNZO, A. PEZZOLLA, F. FERRARESE, G. DE PASQUALE, M. LOSPALLUTI, N. PALASCIANO

***Aim:** Recent studies show that interaction between LN (heterotrimeric protein formed by $\alpha 3/\beta 3/\alpha 2$ chains) and cancer cells plays an important role in tumor invasion, also in colorectal cancer. The overall survival was significantly worse in pts 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 over-expression was evaluated observing PCR-products intensity at electrophoresis: high intensity is correlated to overexpression.*

***Methods:** 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.*

***Results:** Controls showed prepost operative negative cytology and did not express LN-5. In cancer pts. cytology was positive in 2 pts in prepostoperative lavage. LN-5 overexpression was observed in 56,6% preoperatively and in 76,6% postoperatively. LN-5 $\gamma 2$ chain was most frequent chain.*

***Conclusion:** 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. 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: laminin-5, peritoneal lavage, colorectal cancer, FPTCs.

Scopo

La prognosi dei pazienti con cancro coloretale dipende dall'estensione della malattia neoplastica al momento della diagnosi. L'intervento chirurgico radicale è ancora oggi il più importante elemento 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). Il sistema di stadiazione comunemente adottato (sec. TNM), può non essere accurato, soprattutto nei pz. con stadio II e III (2). La disseminazione peritoneale origina dalle FPTCs (Free Peritoneal Tumor Cells) e l'interessamento peritoneale massivo, definito carcinoma peritoneale, si associa ad una prognosi sfavorevole con exitus del paziente a breve distanza dalla diagnosi (3). La valutazione della estensione di malattia è infatti estremamente difficile, in quanto tutte le tecniche di moderna diagnostica per immagini riescono difficilmente a dare la reale entità della diffusione e spesso non sono in grado di dimostrare la presenza della malattia neoplastica che potrebbe controindicare l'intervento chirurgico radicale (3). Numerosi sono gli studi atti ad evidenziare le FPTCs all'interno della cavità addominale ed a questo riguardo, sono state utilizzate varie tecniche che esaminavano i fluidi peritoneali usando la citologia convenzionale, immunocitochimica, RT-PCR (reazione polimerasica a catena con transcriptasi inversa). Quest'ultima ha permesso di valutare la presenza di

Corrispondenza Autore:
Dott. A. Volpi
U.O. Chirurgia Generale III Universitaria
Dipartimento d'Emergenza e Trapianti d'Organo-Policlinico
Piazza G. Cesare, 11 - 70124 Bari
E-mail: annalisavolpi@hotmail.it

© Copyright 2009, CIC Edizioni Internazionali, Roma

marker tumore-associati nel liquido di lavaggio peritoneale, utilizzando primers specifici per particolari geni come il CEAE 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 (4). 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 perciò 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'over espressione della LN-5 è stata riscontrata in neoplasie maligne, tra cui il carcinoma coloretale, dove si osserva 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 (5) 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 metastasi 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 (6). La maggior parte degli studi condotti si basa però su tecniche di immunocitochimica, indagine complessa e difficile da standardizzare (7). In questo studio abbiamo utilizzato tecniche di biologia molecolare, come la RT-PCR 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 colo rettale, è alterata.

Metodi

Dal Giugno 2005 al Novembre 2008, c/o L'U.O. di Chirurgia Generale III dell'Università sono stati arruolati per il nostro studio 30 pz. (13 M; 17 F), di età mediana di 69 (58-84) affetti da neoplasie maligne del

grosso intestino (21 colon, 8 retto ed 1 appendice); 10 pz. con patologie endoaddominali non neoplastiche sono stati arruolati come gruppo controllo. La stadiazione preoperatoria è stata eseguita mediante TAC addominopelvica. Il consenso informato è stato ottenuto da tutti i partecipanti. Sono stati esclusi dallo studio pz. con diagnosi preoperatoria di malattia neoplastica avanzata, cirrotici scompensati, portatori di ascite neoplastica o emoperitoneo, pz. con infezioni sistemiche gravi e tutti i pz. ricoverati urgenza. Riguardo la stadiazione TNM, 3 pz appartengono al I stadio, 9 al II, 12 al III e 5 al IV stadio. Nell'ambito del grading, 9 pz. presentavano tumori scarsamente differenziati, 12 pz. moderatamente differenziati e 8 pz. ben differenziati. L'unico carcinoide a bassa malignità sec. Capella, presentava istotipo a goblet cells. 17 pz. sono stati sottoposti ad interventi chirurgici a cielo aperto e 13 pz. 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, LAMB3e LAMC2) della LN-5 con primers specifici corrispondenti alle tre catene α_3 - β_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 (8), 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 la l'intensità della banda dopo elettroforesi: la maggiore intensità indica l'overexpression (analisi semiquantitativa) nei campioni dei lavaggi peritoneali.

Risultati

Le caratteristiche dei pz. arruolati sono illustrate nella Tabella 1. Il gruppo controllo ha presentato citologia standard negativa sia nei campioni pre- che post-operatori e non ha presentato alcuna overexpression della LN-5. All'interno del gruppo dei pz. neoplastici la situazione è risultata di gran lunga differente. La citologia è risultata positiva in 2 pz, sia nel lavaggio pre che postoperatorio. L'overexpression della LN-5 è stata riscontrata in 17 pz (56,6%) nel pre ed in 23 pz. (76,6%) nel post (Tab. 2); la catena γ_2 è risultata esse-

TABELLA 1 - CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI (NEOPLASTICI E CONTROLLI).

Pazienti	Neoplastici	Controlli
Età media, anni (range)	69 (59-84)	56 (38-74)
M/F	13/17	5/5
Diagnosi	Colon 21 Retto 8 Carcinoide appendice 1	Calcolosi colecistici 7 Aderenze tenue 2 Lipoma 1
Chirurgia open/videolaparoscopia	17/13	3/7

TABELLA 2 - LN-5 ESPRESSIONE E CITOLOGIA STANDARD SU LAVAGGIO PERITONEALE PRE- E POSTOPERATORIO.

Lavaggio peritoneale	Preoperatorio	Postoperatorio
Espressione LN-5	17 pz (56,6%)	23 pz (76,6%)
Citologia standard	2 pz (6,6%)	2 pz (6,6%)

re la più rappresentata, in quanto è overespressa in 12 pz. nel preoperatorio ed in 20 pz. nel postoperatorio; segue la catena $\beta 3$ con 5 pz nel preoperatorio e 13 pz. nel postoperatorio, infine la catena $\alpha 3$ nel lavaggio peritoneale preoperatorio è overespressa in 4 pz. e in 13 pz. nel postoperatorio. 1 pz. con un'overexpression della LN-5 appartenevano nel 10% al I stadio (3 pz), nel 30% al II stadio (9 pz), nel 40% al III stadio (12 pz) e nel 16,67% al IV stadio (5 pz). L'unico paziente con carcinoma appendicolare ha manifestato overexpression della LAMC2, sia nel pre che nel postoperatorio. Solo 5 pz. del gruppo neoplastici (I stadio: 1 pz, II stadio: 1 pz, III stadio: 2 pz. e IV stadio: 1 pz) non hanno presentato overexpression della LN-5.

Discussione

Dal nostro studio, anche se condotto su uno scarso numero di pz., 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 immunoistochimica; 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 pz. appartenenti al II stadio, da eventuali terapie adiuvanti (9, 10). Emergono però alcuni interrogativi:

1) che significato ha la low-expression nei pz. 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 $\gamma 2$?

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 (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 la low-expression di alcuni pz. neoplastici.

Conclusioni

La LN-5 potrebbe essere di ausilio nella precoce identificazione di sottogruppi (soprattutto nei pz. appartenenti al II stadio) che potrebbero presentare 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 LN5. Pertanto l'overexpression della LN-5 nel lavaggio peritoneale di pz. 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 pz. 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, Athanasiou T et al. Can intra-operative intraperitoneal free cancer cell detection techniques identify patients at higher recur-

- rence risk following curative colorectal cancer resection: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol* 2008 Jan;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 Jan-Feb;33 (1):87-93.
 4. Malinda KM et al. The Laminins. *Int J Biochem Cell Biol* 1996;28:957-95.
 5. 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.
 6. Saito N, Kameoka S. Serum laminin is an independent prognostic factor in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2005 May;20(3):238-44.
 7. Patarroyo M, Tryggvason K, Virtanen I. Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Semin Cancer Biol* 2002 Jun;12(3):197-207.
 8. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987 Apr;162(1):156.
 9. 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.
 10. Lloyd JM, Cassandra M, McIve S, Stephenson HP, Rieger N, Hardingham J. 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 Jan;12: 417-423.