

Confronto dei valori plasmatici delle metalloproteasi della matrice 2, 3, 9 in pazienti con carcinomi e fibroadenomi mammari

F. SOLAI, T. NARDO², G. PATRIZI, M. ANNESSI, M. SANTULLI¹, M.I. AMABILE, F. VASATURO¹

RIASSUNTO: Confronto dei valori plasmatici delle metalloproteasi della matrice 2, 3, 9 in pazienti con carcinomi e fibroadenomi mammari.

F. SOLAI, T. NARDO, G. PATRIZI, M. ANNESSI, M. SANTULLI, M.I. AMABILE, F. VASATURO

Il processo di infiltrazione delle cellule tumorali nei tessuti limitrofi prevede il rimaneggiamento dello stroma peritumorale determinato da un'alta attività litica sulla matrice extracellulare da parte del fenotipo neoplastico invasivo. Tra i principali enzimi litici prodotti dalle cellule tumorali e principalmente coinvolti nel processo invasivo ci sono le metalloproteasi della matrice (MMPs). Lo scopo di questo lavoro è quello di confrontare i livelli plasmatici pre-operatori delle MMPs 2, 3, 9 in pazienti affette da carcinomi e fibroadenomi mammari per valutare un'eventuale differenza di espressione delle tre MMPs tra i due gruppi di pazienti. Sono stati quantizzati con ELISA test i valori delle MMPs 2, 3, 9 nel plasma prelevato 24 h prima dell'intervento chirurgico in 50 pazienti con carcinomi ed in 30 pazienti con fibroadenomi mammari. Il valore medio di MMP2 nelle pazienti con carcinoma è risultato essere significativamente superiore a quello nelle pazienti con fibroadenoma, mentre non è stata rivelata una differenza significativa per le altre due MMPs analizzate. Alla luce dei risultati ottenuti è possibile confermare il ruolo fondamentale svolto dalle MMPs nel fenomeno invasivo neoplastico. Inoltre, sulla base dei valori ottenuti per la MMP2, si potrebbe inserire la valutazione di questo enzima come marcatore a fianco ad altri parametri biologici e clinici nell'orientamento prognostico delle lesioni mammarie neoplastiche.

SUMMARY: Comparison of plasma matrix metalloproteases 2, 3, 9 in breast carcinomas and fibroadenomas.

F. SOLAI, T. NARDO, G. PATRIZI, M. ANNESSI, M. SANTULLI, M.I. AMABILE, F. VASATURO

Tumor cell infiltration causes the remodelling of peritumoral tissues, determined by an increased lytic activity of extracellular matrix exerted by the neoplastic invasive phenotype. Among the principal lytic enzymes produced by tumor cells and mainly involved in invasion process there are the matrix metalloproteases (MMPs). The Authors compared the plasmatic values of MMPs 2, 3, 9 from patients with breast carcinomas and fibroadenomas in order to evaluate whether there was a significant difference between the two groups of patients. MMPs 2, 3, 9 values were quantified by ELISA test from plasma collected 24 hours before surgery in 50 breast carcinomas and 30 fibroadenomas. MMP2 mean value from the patients with carcinomas resulted significantly higher as compared to that from the patients with fibroadenomas; while for MMP 3 and 9 mean values was not possible to find a significant difference between the two groups of malignant and benign breast tumors. These data confirm the main role played by MMPs during the tumor invasion process. Therefore, it is possible to propose the future inclusion of MMP2 test, together to other biological and clinical data, for prognostic evaluation of neoplastic breast lesions.

KEY WORDS: Carcinoma mammario - Metalloproteasi della matrice - MMP.
Breast carcinoma - Matrix metalloproteases - MMPs.

Introduzione

Le metalloproteasi della matrice (MMPs) sono una famiglia di endopeptidasi zinco- e calcio-dipendenti, prevalentemente prodotte da cellule del tessuto connettivo in grado di degradare i componenti della membrana extracellulare. L'attività di queste proteinasi è stata dimostrata nello sviluppo dei tessuti sia in condizioni fisiologiche che in molti processi patologici tra cui le neoplasie (1). La degradazione della matrice è infatti uno dei fe-

"Sapienza" Università di Roma
1 Facoltà di Medicina e Chirurgia, Policlinico Umberto I
Dipartimento Scienze Chirurgiche
1 Dipartimento Emergenza ed Accettazione
2 Dipartimento Medicina Sperimentale

© Copyright 2010, CIC Edizioni Internazionali, Roma

nomeni più importanti del processo metastatico, proprio perchè le MMPs degradando la membrana basale e lo stroma interstiziale, permettono l'invasione locale del tumore e la disseminazione metastatica. Le MMPs sono inoltre coinvolte nel processo di neoangiogenesi dei tumori.

L'espressione di alcune MMPs specifiche è stata descritta nei tessuti di tumori della mammella: la gelatinasi A o MMP2, la stromelisinina o MMP3 e la gelatinasi B o MMP9 (2). Studi recenti hanno dimostrato che l'incremento di espressione di MMP2 nei tumori mammari si associa con aggressività tumorale e con una prognosi sfavorevole (3, 4). L'aumento di MMP2 e MMP9 è stato evidenziato nel siero di pazienti con tumori mammari. È stato inoltre ipotizzato che bassi livelli di questi enzimi correlano con una prognosi migliore (5). Sia la MMP2 che la MMP9 sono state ritrovate anche nei versamenti pleurici di pazienti con neoplasie mammarie (6).

Nell'ambito degli studi sull'espressione tissutale e plasmatica delle MMPs 2, 3 e 9 nel carcinoma mammario, non sono state mai valutate le differenze di espressione di ciascun enzima rispettivamente nei carcinomi mammari e nelle patologie benigne della mammella.

L'obiettivo del nostro studio è stato quindi quello di misurare i livelli plasmatici pre-operatori di MMP2, MMP3 e MMP9 in pazienti affette da fibroadenomi e carcinomi mammari per valutare un'eventuale differenza quantitativa significativa tra i due gruppi di pazienti.

Pazienti e metodi

Sono stati analizzati i valori plasmatici delle MMP2, MMP3 e MMP9 in 50 pazienti affette da carcinomi mammari con età media di 55 anni ed in 30 pazienti affette da fibroadenomi mammari con età media di 35 anni, previo consenso informato, ricoverate presso il Dipartimento di Scienze Chirurgiche da settembre 2008 a dicembre 2009.

Il sangue venoso periferico è stato prelevato in tutti e due i gruppi di pazienti incluse nel nostro studio 24 ore prima dell'esecuzione dell'intervento chirurgico.

La presenza e la concentrazione di MMP2, MMP3 e MMP9 sono state analizzate nei campioni di plasma con ELISA test utilizzando i seguenti kit: MMP2 Quantikine ELISA kit (R e D System), MMP3 Human Biotrak Assay (Amersham), MMP9 Quantikine ELISA kit (R e D System).

I campioni di plasma delle pazienti, i controlli di siero normale ed i campioni per la curva standard sono stati preparati come specificato nel foglio illustrativo, pipettati nelle piastre pre-trattate con gli anticorpi e messi in agitazione per 2 ore a temperatura ambiente.

Sono stati fatti quattro lavaggi con soluzione tampone di lavaggio ed ai pozzetti veniva messo l'anticorpo policlonale secondario coniugato. Sono stati fatti quattro lavaggi e successivamente veniva aggiunta una soluzione substrato per mezz'ora. La reazione veniva bloccata con una *stop solution*; seguiva una misurazione allo spettrofotometro a 450 nm con una correzione a 540 nm.

L'esperimento è stato fatto in doppio e le medie calcolate. Le concentrazioni di ciascun campione sono state ottenute in base alla curva standard. Tutti i dati ottenuti venivano analizzati statisticamen-

te tramite test di Wilcoxon per determinarne la significatività.

La diagnosi di carcinoma o fibroadenoma mammario per le 80 pazienti incluse nel nostro studio veniva posta in fase intra-operatoria con esame istologico estemporaneo e successivamente confermata mediante esame istologico definitivo.

Risultati

Sono state analizzate le concentrazioni plasmatiche di ciascuna MMP in tutte le 80 pazienti incluse nel nostro studio ed è stato calcolato il valore medio di ogni MMP rispettivamente per i fibroadenomi e per i carcinomi mammari.

Il valore medio di MMP2 è risultato di 257 ng/ml per i carcinomi mammari e di 170 ng/ml per i fibroadenomi mammari. Il valore medio di MMP3 è risultato di 114 ng/ml per i carcinomi mammari e di 101 ng/ml per i fibroadenomi mammari. Il valore medio di MMP9 è risultato di 65 ng/ml per i carcinomi mammari e di 54 ng/ml per i fibroadenomi mammari.

I valori medi di tutte tre le MMPs riscontrati nei carcinomi mammari sono risultati sempre superiori ai valori medi riscontrati nei fibroadenomi mammari (Fig. 1).

Mediante la valutazione del test statistico di Wilcoxon è stata analizzata la significatività delle sopra citate differenze e solo per la MMP2 l'aumento di valore nei carcinomi mammari rispetto ai fibroadenomi mammari è risultato avere una significatività di $p < 0,01$.

Pertanto, riassumendo questi dati, si può affermare che i valori medi plasmatici di MMP2 sono significativamente più elevati nei carcinomi mammari rispetto ai fibroadenomi mammari.

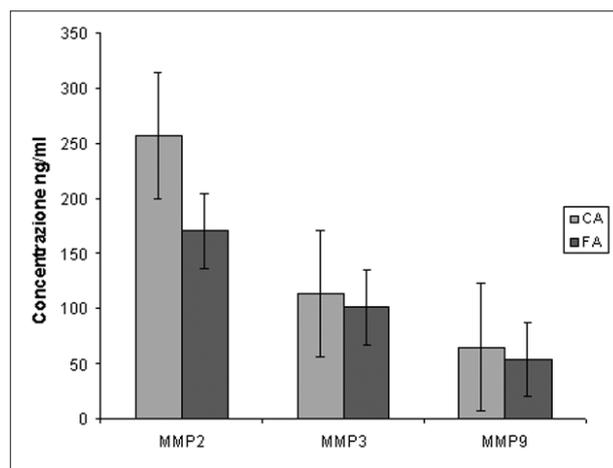


Fig. 1 - Concentrazioni plasmatiche medie di MMP2, MMP3 e MMP9 per i 50 carcinomi mammari (CA) e per i 30 fibroadenomi mammari (FA) espressi in ng/ml.

Discussione

Il processo invasivo e metastatico rappresenta il problema più complesso nella gestione del cancro della mammella. Considerando i valori ottenuti attraverso il nostro studio possiamo confermare l'ipotesi che la MMP2 sia funzionale ed indispensabile al fenomeno invasivo neoplastico come sostengono altri autori (7).

Inoltre, considerando la facilità della metodica per la misurazione della concentrazione delle MMPs plasmatiche mediante ELISA test e anche la non invasività

dell'acquisizione dei campioni di plasma mediante prelievo ematico periferico, si potrebbe inserire la valutazione della MMP2, plasmatica nel pannello dei marcatori prognostici di routine. Ciò sarebbe giustificato dal riconoscere alla MMP2, oltre che un valore biologico, anche un valore di bio-marcatore di prognosi (8).

Un'ulteriore riflessione possibile sui dati ottenuti dal nostro studio è quella di sostenere un'applicabilità futura di molecole "inibitrici" contro le MMPs da utilizzare in protocolli di terapie biologiche nel carcinoma mammario, come proposto da altri autori (9).

Bibliografia

1. Vinothini G, Murugan RS, Nagini S. Evaluation of molecular markers in a rat model of mammary carcinogenesis. *Oncol Res* 2009;17: 483-93.
2. Del Casar JM, González-Reyes S, González LO, González JM, Junquera S, Bongera M, García MF, Andicoechea A, Serra C, Vizoso FJ. Expression of metalloproteases and their inhibitors in different histological types of breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009 Nov 15.
3. Leppä S, Saarto T, Vehmanen L, Blomqvist C, Elomaa I. Clodronate treatment influences MMP-2 associated outcome in node positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 90: 117-25.
4. Talvensaari-Mattila A, Turpeenniemi-Hujanen T. Preoperative serum MMP-9 immunoreactive protein is a prognostic indicator for relapse-free survival in breast carcinoma. *Cancer Lett* 2005; 217: 237-4.
5. Somiari SB, Shriver CD, Heckman C, Olsen C, Hu H, Jordan R, Arciero C, Russell S, Garguilo G, Hooke J, Somiari RI. Plasma concentration and activity of matrix metalloproteinase 2 and 9 in patients with breast disease, breast cancer and at risk of developing breast cancer. *Cancer Lett* 2006; 233: 98-107.
6. Somiari SB, Shriver CD, Heckman C, Olsen C, Hu H, Jordan R, Arciero C, Russell S, Garguilo G, Hooke J, Somiari RI. Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 type IV collagenases in serum of patients with pleural effusions. *Int J Oncol* 2005; 26:1363-8.
7. Stankovic S, Konjevic G, Gopcevic K, Jovic V, Inic M, Jurisic V. Activity of MMP-2 and MMP-9 in sera of breast cancer patients. *Pathol Res Pract* 2010 Jan 19.
8. Shah FD, Shukla SN, Shah PM, Shukla HK, Patel PS. Clinical significance of matrix metalloproteinase 2 and 9 in breast cancer. *Indian J Cancer* 2009; 46: 194-202.
9. McGowan PM, Duffy MJ. Matrix metalloproteinase expression and outcome in patients with breast cancer: analysis of a published database. *Ann Oncol* 2008;19:1566-72.