

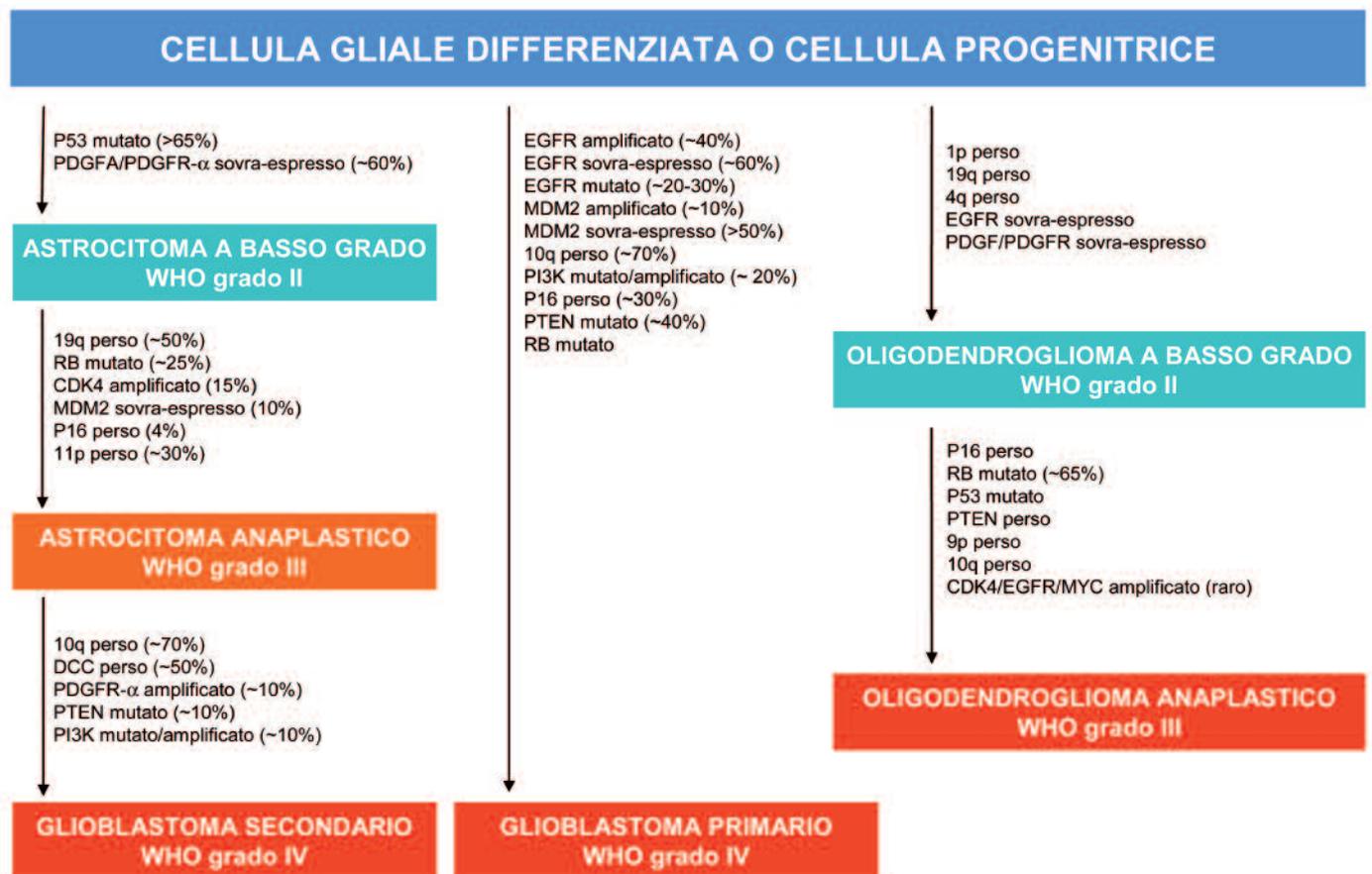
## MARCATORI MOLECOLARI NEI GLIOMI MALIGNI

V. Martin

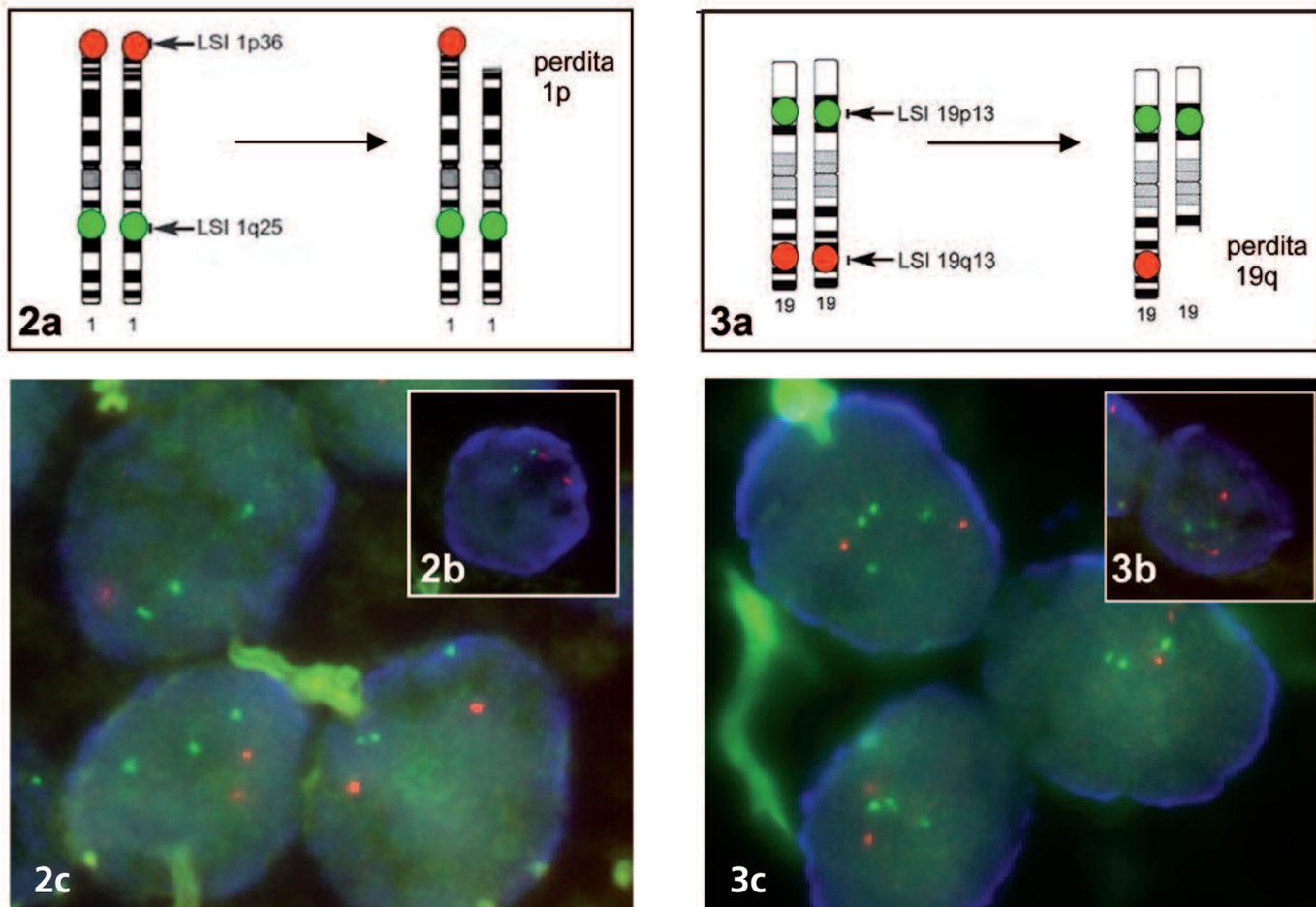
I gliomi maligni sono neoplasie caratterizzate da elevata variabilità genetica. Tale aspetto biologico si manifesta fenotipicamente nell'eterogeneità morfologica che contraddistingue le cellule coinvolte e che rende complessa la classificazione istologica di questi tumori<sup>1</sup>.

Nonostante molti studi abbiano fornito validi criteri istopatologici per la classificazione dei gliomi maligni, i processi genetici che stanno alla base della progressione tumorale non sono ancora completamente chiari<sup>2</sup>. In generale, i geni associati alla trasformazione neoplastica sono molti, e spesso la loro alterazione causa un accumulo di anomalie a carico dei sistemi di trasduzione del segnale a valle, ad opera di proteine con attività intrinseca tirosin-chinasica (come EGFR o VEGFR) o delle vie da essi attivate (quella che coinvolge RAS e le MAP chinasi), o nei meccanismi di arresto del ciclo cellulare, con interessamento di diverse proteine regolatrici (come p53, PTEN, p16)<sup>3</sup>. In particolare, numerosi autori indicano l'esistenza di vie patogenetiche differenti a seconda dell'istotipo e del grado dei gliomi<sup>4</sup> (**Figura 1**).

Alla ricerca di alterazioni biologiche e genetiche che possano aggiungere informazioni utili a migliorare l'approccio clinico verso il paziente, la comprensione delle vie molecolari implicate nella progressione neoplastica dei tumori gliali ha portato all'identificazione di diversi marcatori che svolgono un ruolo di rilievo in ambito diagnostico, prognostico e predittivo<sup>5</sup>. Ad oggi, tra i marcatori molecolari più promettenti vi sono: la perdita combinata (co-delezione) del braccio corto del cromosoma 1 (1p) e del braccio lungo del cromosoma 19 (19q) negli oligodendrogliomi, l'alterazione a carico del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) nei glioblastomi, e l'espressione e metilazione di O-6-metilguanina-DNA metil transferasi (MGMT) nei gliomi sia di basso che di alto grado.



**Fig. 1:** Anomalie genetiche e cromosomiche coinvolte nello sviluppo dei gliomi ad alto grado (glioblastoma primario, glioblastoma secondario, oligodendroglioma anaplastico).



**Fig. 2 e 3:** FISH per l'analisi della co-delezione 1p/19q. La strategia utilizzata prevede l'uso di due kit commerciali (Abbott Molecular) di sonde molecolari che riconoscono in modo specifico la regione 1p e la regione 19q. Ciascun kit è costituito da una miscela di sequenze direttamente marcate che ibridano rispettivamente la regione da indagare in rosso e il controllo interno in verde. In dettaglio, in Figura 2 il kit 1p36/1q25. Ideogramma dei cromosomi 1 e mappa delle sonde specifiche (LSI 1p36 in rosso e controllo interno LSI 1q25 in verde) in condizione di assetto normale e di perdita della regione 1p (2a); nucleo normale (due segnali rossi e due segnali verdi) (2b); nuclei di oligodendroglioma con perdita della regione 1p (numero di segnali rossi inferiore al numero di segnali verdi) (2c). In dettaglio, in Figura 3 il kit 19q13/19p13. Ideogramma dei cromosomi 19 e mappa delle sonde specifiche (LSI 19q13 in rosso e controllo interno 19p13 in verde) in condizione di assetto normale e di perdita della regione 19q (3a); nucleo normale (due segnali verdi e due segnali rossi) (3b); nuclei di oligodendroglioma con perdita della regione 19q13 (numero di segnali rossi inferiore al numero di segnali verdi) (3c).

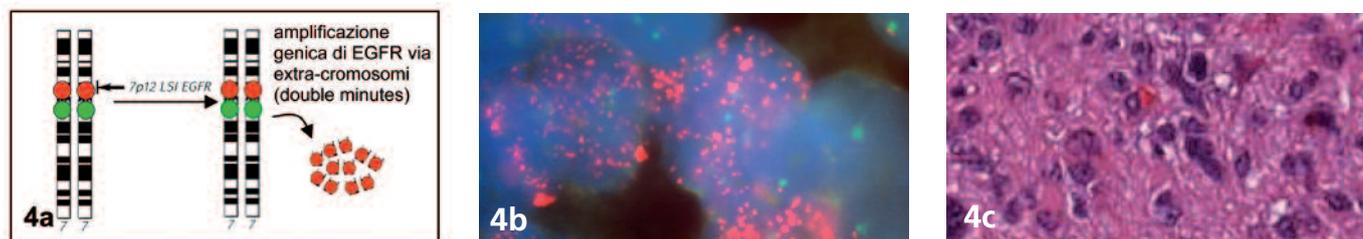
### Co-delezione 1p/19q

La perdita contemporanea delle regioni 1p e 19q è generalmente presente negli oligodendrogliomi, e si ritrova in una buona quota di pazienti (60-90%). Dalla vasta e consolidata esperienza bibliografica internazionale sono emerse considerazioni importanti circa il suo valore di marcatore molecolare. A livello diagnostico infatti, poiché la co-delezione 1p/19q risulta essere quasi esclusiva dei tumori con istotipo oligodendrogliale, è

utilizzata dai medici patologi come ausilio in diagnosi differenziale (vs neurocitoma e glioblastoma a piccole cellule). A livello clinico, inoltre, poiché la perdita combinata correla con un aumento della sopravvivenza (es. sopravvivenza mediana 10 anni vs 2 anni), è considerata un importante marcatore di prognosi favorevole<sup>6</sup>. Alcuni studi sembrano indicare che pazienti che presentano la co-delezione 1p/19q rispondano meglio a diversi protocolli chemio-terapici, ma ad

oggi il coinvolgimento di questo marcatore nella chemio-sensibilità rimane ancora controverso<sup>7</sup>.

Per tutte queste evidenze, nella pratica clinica dei pazienti affetti da neoplasia oligodendrogliale, è importante valutare la co-delezione 1p/19q, e, in questo contesto, le indagini di patologia molecolare svolgono un ruolo di rilievo. Fra le nuove, ma ormai consolidate, tecniche di diagnostica molecolare la FISH (Ibridazione In Situ Fluorescente - vedi box metodica) si è ri-



**Fig. 4:** FISH per l'analisi dell'amplificazione genica di EGFR. La strategia utilizzata prevede l'uso di un kit commerciale (Abbott Molecular) di sonde molecolari costituito da una miscela di sequenze direttamente marcate che ibridano rispettivamente il gene EGFR in 7p12 in rosso e il centromero del cromosoma 7 (controllo interno) in verde. Ideogramma dei cromosomi 7 e mappa delle specifiche sonde in condizione di assetto normale e di amplificazione del gene EGFR attraverso elementi extra-cromosomici detti double minutes (4a); nuclei di glioblastoma con amplificazione genica di EGFR (numero di segnali rossi in eccesso rispetto al numero di segnali verdi) (4b); sezione istologica dello stesso tumore colorata con ematossilina-eosina e utilizzata per l'analisi morfologica (4c).

velata capace di potenti sinergie con il campo della diagnostica istopatologica (Figure 2 e 3).

### EGFR

Il gene EGFR, che mappa sul braccio corto del cromosoma 7, codifica per un recettore trans-membrana di tipo tirosin-chinasico la cui attivazione innesca vie di trasduzione del segnale a valle implicate nella regolazione della mitosi, della differenziazione, della sopravvivenza cellulare e dell'apoptosi. Nei tumori solidi, alterazioni a carico di EGFR (causate da sovraespressione proteica, amplificazione genica o mutazione genica) determinano la perdita di controllo di queste vie, conferendo alla cellula le tipiche caratteristiche tumorigeniche, quali la capacità di crescita indefinita, l'inibizione dell'apoptosi e la capacità di migrare e creare vasi, che, nel complesso, favoriscono la progressione tumorale e la metastatizzazione<sup>8</sup>.

Il gene che codifica per EGFR è quello che più di frequente risulta alterato nei gliomi ad alto grado di origine astrocitaria: un terzo dei glioblastomi (GBM) e alcuni astrocitomi anaplastici ne mostrano l'amplificazione, mentre generalmente i gliomi a basso grado non presentano questa anomalia.

In particolare, l'amplificazione di EGFR caratterizza prevalentemente i GBM primari, che insorgono *de no-*

vo, rispetto ai GBM secondari, che si originano in seguito a progressione da un tumore di grado inferiore<sup>9</sup>. Questa distinzione, non possibile a livello istologico in quanto GBM primari e GBM secondari sono indistinguibili dal punto di vista morfologico, è molto importante dal punto di vista clinico e fa di questo marcatore non solo un valido aiuto diagnostico ma anche un potenziale indicatore predittivo per la selezione del trattamento. L'approccio terapeutico mirato alle specifiche alterazioni molecolari sta diventando ormai una realtà di fatto in ambito oncologico (ad es. in tumori del polmone e del colon), e diversi trial clinici con farmaci biologici anti-EGFR sono attualmente in corso su pazienti affetti da GBM<sup>10-13</sup>. Per indagare le alterazioni di EGFR esistono diversi approcci (immunohistochimica, sequenziamento diretto, ecc), ma oggi è la FISH la strategia più comunemente utilizzata in patologia clinica per valutarne l'amplificazione genica nei gliomi<sup>14</sup> (Figura 4).

### MGMT

Il gene MGMT codifica per l'enzima O-6-metilguanina-DNA metil transferasi che svolge una funzione protettiva nei confronti della cellula tumorale in quanto è deputato alla riparazione dei danni al DNA indotti da agenti citotossici.

Recenti studi indicano un ruolo chiave

di MGMT nei meccanismi di azione e resistenza agli alchilanti nei pazienti affetti da GBM, ed è stato dimostrato che quando MGMT è inattivo, attraverso il silenziamento epigenetico dovuto a ipermetilazione del promotore del gene, viene compromesso il meccanismo di riparo e la chemioterapia è efficace. L'ipermetilazione di MGMT è presente in circa la metà dei GBM, e poiché è stata dimostrata una sua correlazione con una miglior risposta alla chemioterapia e a un tempo maggiore di progressione, tale alterazione è oggi considerata un valido marcatore predittivo<sup>15-18</sup>. Dati preliminari indicano inoltre che MGMT è anche un efficace marcatore prognostico in quanto la sua metilazione è correlata a una sopravvivenza migliore in pazienti affetti da astrocitomi anaplastici o oligoastrocitomi<sup>19</sup>. Per tutti questi motivi, la maggior parte dei nuovi studi clinici prevede una stratificazione dei pazienti secondo lo stato di MGMT.

In generale, la metilazione di MGMT viene valutata con tecniche di biologia molecolare eseguendo sul DNA estratto dalle sezioni istologiche del tumore in esame una PCR specifica per l'individuazione di gruppi metilici.

### L'esperienza dell'Istituto Cantonale di Patologia-ICP

In campo neuro-oncologico la diagnosi istologica rappresenta tuttora il

**FISH: Ibridazione in Situ Fluorescente**

La FISH è una metodica basata sul principio generale dell'ibridazione tra acidi nucleici. Permette di indagare l'assetto genico di specifiche regioni (geni o interi cromosomi) visualizzando le sequenze di interesse direttamente sul campione analizzato, mediante l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza. In patologia clinica, la FISH viene eseguita sulla sezione istologica (fissata in formalina e inclusa in paraffina) della biopsia o della tumorectomia del paziente, rendendo quindi possibile l'immediata correlazione tra dato genetico e dato morfologico. L'analisi del campione viene effettuata con un attento approccio cellula-per-cellula e richiede personale esperto e opportunamente formato (genetisti o patologi molecolari).

Box metodica FISH

“gold standard”. Tuttavia l'approfondimento dei meccanismi molecolari che stanno alla base della patogenesi dei gliomi maligni permette oggi di aggiungere informazioni utili a livello diagnostico, prognostico e predittivo. Ecco perché le indagini molecolari sono sempre più utilizzate nel contesto istopatologico.

All'ICP di Locarno le analisi di marcatori molecolari nei tumori solidi sono ormai bene integrate con la routine diagnostica, e, dalla fine del 2006, la FISH viene effettuata su tutti i gliomi operati in Ticino che giungono all'Istituto.

Ad oggi, sono stati analizzati 53 pazienti affetti da glioma maligno. In linea con i dati della letteratura, la perdita combinata 1p/19q è stata rilevata in 5 dei 6 (83%) tumori oligodendrogliali analizzati, mentre l'amplificazione di EGFR è stata evidenziata in 12 dei 38 (31%) astrocitomi e in 1 dei 9 tumori gliali ad alto grado a istologia diversa e/o mista.

Alla luce della nostra esperienza, l'utilizzo di marcatori molecolari nella pratica clinica ha permesso di migliorare la valutazione diagnostica e di stratificare in modo efficiente i pazienti, anche alla luce dei nuovi approcci terapeutici.

V. Martin, Genetista,  
Istituto cantonale di patologia,  
Laboratorio di diagnostica molecolare

Corrispondenza:  
Dott. V. Martin,  
Istituto Cantonale di Patologia, Locarno  
e-mail: vittoria.martin@ti.ch

**Bibliografia**

- 1 Louis DN, Holland EC, Cairncross JG. Glioma classification: a molecular reappraisal. *Am J Pathol.* 2001 Sep;159(3):779-86.
- 2 Dai C, Holland EC. Glioma models. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Aug 31;1551(1):M19-27.
- 3 Holland EC. Progenitor cells and glioma formation. *Curr Opin Neurol.* 2001 Dec; 14(6): 683-8.
- 4 Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med.* 2008 Jul 31;359(5): 492-507.
- 5 Hegi ME, Murat A, Lambiv WL, Stupp R. Brain tumors: molecular biology and targeted therapies. *Ann Oncol.* 2006 Sep;17
- 6 Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Oct 7;90(19):1473-9.
- 7 Kouwenhoven MC, Kros JM, French PJ et al. 1p/19q loss within oligodendroglioma is predictive for response to first line temozolomide but not to salvage treatment. *Eur J Cancer.* 2006 Oct;42(15):2499-503.
- 8 Sibia M, Kroismayr R, Lichtenberger BM et al. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation.* 2007 Nov;75(9):770-87.
- 9 Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 2007 May;170(5):1445-53.
- 10 Salgaller ML, Liao LM. Current status of clinical trials for glioblastoma. *Rev Recent Clin Trials.* 2006 Sep;1(3):265-81.
- 11 Belda-Iniesta C, de Castro Carpeño J, Sereno M et al. Epidermal growth factor receptor and glioblastoma multiforme: molecular basis for a new approach. *Clin Transl Oncol.* 2008 Feb;10(2):73-7.
- 12 Voelzke WR, Petty WJ, Lesser GJ. Targeting the epidermal growth factor receptor in high-grade astrocytomas. *Curr Treat Options Oncol.* 2008 Feb;9(1):23-31.
- 13 Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, et al. Epidermal growth factor receptor inhibitors in neuro-oncology: hopes and disappointments. *Clin Cancer Res.* 2008 Feb 15;14(4): 957-60.
- 14 Martin V, Mazzucchelli L, Frattini M. An overview of the egfr fish challenge in tumor pathology. *J Clin Pathol.* 2008 Dec 3 [Epub].
- 15 Hegi ME, Dierens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):997-1003.
- 16 Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):987-96.
- 17 Stupp R, Hegi ME. Methylguanine methyltransferase testing in glioblastoma: when and how? *J Clin Oncol.* 2007 Apr 20;25(12): 1459-60.
- 18 Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, et al. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol.* 2008 Sep 1;26(25):4189-99.
- 19 Sadones J, Michotte A, Veld P, et al. MGMT promoter hypermethylation correlates with a survival benefit from temozolomide in patients with recurrent anaplastic astrocytoma but not glioblastoma. *Eur J Cancer.* 2009 Jan;45(1):146-53.