

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

“AMEDEO AVOGADRO”

Dipartimento di Scienze della Salute



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare

XXV Ciclo (2009 – 2012)

**I MARCATORI MOLECOLARI
NELL'OLIGODENDROGLIOMA: SIGNIFICATO
DIAGNOSTICO, PROGNOSTICO E PREDITTIVO.**

Tesi di Dottorato di Angela Piazzi

Relatori: Chiar.mo Prof. Davide Schiffer

Chiar.ma Prof.ssa Mara Giordano

INDICE

INDICE	3
RIASSUNTO	5
1 Introduzione	6
I GLIOMI	7
DIAGNOSI E CLASSIFICAZIONE	8
ASTROCITOMI	10
Astrocitoma Pilocitico.....	11
Astrocitoma Diffuso.....	12
Astrocitoma Anaplastico.....	13
Glioblastoma Multiforme	14
OLIGODENDROGLIOMI	15
OLIGOASTROCITOMI.....	17
TERAPIA	18
GENETICA DEI GLIOMI	21
Co-delezione dei cromosomi 1p/19q	22
Mutazioni dei geni <i>IDH1</i> e <i>IDH2</i>	24
Metilazione del promotore del gene <i>MGMT</i>	28
Amplificazione del gene <i>EGFR</i>	30
Mutazioni del gene <i>TP53</i>	33
Delezione e metilazione dei <i>loci CDKN2A</i> e <i>CDKN2B</i>	34
Metilazione del promotore del gene <i>EMP3</i>	35
2 Materiali e Metodi	37
CASISTICA.....	38
STRATIFICAZIONE DEGLI OLIGODENDROGLIOMI (II E III GRADO)	38
INDAGINI IMMUNOISTOCHEMICHE	39
GENETICA MOLECOLARE	39
MLPA [®] E METHYLATION SPECIFIC-MLPA [®]	40
Principi	40
Protocollo di MLPA [®]	41
Variazione del protocollo per l'MS-MLPA [®]	43
Analisi e normalizzazione dei dati mediante Coffalyser [®]	45
MODIFICAZIONE DEL DNA CON BISOLFITO DI SODIO	46
PCR METILAZIONE-SPECIFICA (MSP)	47
Analisi dei prodotti di MSP mediante elettroforesi capillare	50
ANALISI DELLO STATO DI AMPLIFICAZIONE DEL GENE <i>EGFR</i>	50
ANALISI DI SEQUENZA DEI GENI <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i> E <i>TP53</i>	51
ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI.....	54

3 Risultati	55
RISPOSTA AI TRATTAMENTI TERAPEUTICI.....	56
CO-DELEZIONE DEI CROMOSOMI 1p E 19q.....	57
METILAZIONE DEL PROMOTORE DEL GENE <i>MGMT</i>	65
MUTAZIONI DEI GENI <i>IDH1</i> E <i>IDH2</i>	68
METILAZIONE DEL PROMOTORE DEL GENE <i>EMP3</i>	73
AMPLIFICAZIONE DEL GENE <i>EGFR</i>	76
MUTAZIONI DEL GENE <i>TP53</i>	79
DELEZIONE DEI <i>LOCI CDKN2A</i> E <i>CDKN2B</i>	81
METILAZIONE DEI <i>LOCI CDKN2A</i> E <i>CDKN2B</i>	85
ANALISI MULTIVARIATA.....	90
TABELLA RIASSUNTIVA	91
4 Discussione	92
DISCUSSIONE	93
5 Bibliografia	101
BIBLIOGRAFIA	102
6 Pubblicazioni Scientifiche	109
PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE	110

RIASSUNTO

I gliomi rappresentano la metà dei tumori del Sistema Nervoso Centrale. A causa del loro ampio spettro morfologico, la loro classificazione dipende in gran parte dalle caratteristiche istologiche del tumore.

Essi sono caratterizzati da una crescita di tipo infiltrante e da resistenza ai trattamenti di radio- e chemioterapia. Tuttavia, negli ultimi anni il trattamento dei gliomi ha subito grossi cambiamenti. Oltre allo sviluppo di nuovi approcci chirurgici, di radioterapia e di chemioterapia, lo sviluppo della diagnostica molecolare rappresenta uno dei principali fattori di questi progressi.

I differenti tipi di tumori possiedono fenotipi diversi con valore diagnostico differente, ma anche prognostico e predittivo di risposta ai trattamenti di radio- e chemioterapia. La diagnosi istologica, corroborata dall'analisi molecolare ha quindi un'importanza fondamentale.

Tra i gliomi, gli oligodendrogliomi possiedono una prognosi più favorevole rispetto agli astrocitomi di pari grado. Tuttavia, la diagnosi di oligodendroglioma sulla base dei soli criteri istologici è complessa, soggetta a variabilità individuale e oggi non è più accettata. Si rendono quindi sempre più necessari dei criteri oggettivi, derivanti dallo studio di specifici marcatori genetici importanti per la diagnosi, la formulazione della prognosi e la predizione delle risposte alle terapie nonché per il riconoscimento del grado istologico di malignità.

In questo studio è stato valutato il significato diagnostico, prognostico e predittivo di risposta alle terapie farmacologiche e radioterapiche di una serie di marcatori molecolari in una casistica di 93 oligodendrogliomi (II e III grado). I marcatori molecolari presi in esame sono stati i seguenti: co-delezione dei cromosomi 1p/19q, metilazione del promotore dei geni *MGMT* ed *EMP3*, mutazioni a carico dei geni *IDH1/2* e *TP53*, amplificazione del gene *EGFR*, delezione dei loci *CDKN2A* e *CDKN2B* e stato di metilazione dei rispettivi promotori. Le frequenze di tali alterazioni negli oligodendrogliomi sono state confrontate con quelle osservate in due serie parallele, composte ciascuna da 26 astrocitomi e 20 oligoastrocitomi di pari grado.

Questo studio ha permesso d'identificare tra i marcatori presi in esame quali hanno significato diagnostico, ovvero associati all'istologia oligodendrogliale ed eventualmente associati alla progressione anaplastica, prognostico o predittivo. Esso ha inoltre dimostrato come l'analisi genetica e molecolare dei gliomi sia ormai un supporto insostituibile alla diagnosi istopatologica tradizionale.

1 Introduzione

I GLIOMI

I tumori primari del Sistema Nervoso Centrale (SNC) rappresentano il 2-3% di tutte le neoplasie. Nei paesi occidentali, l'incidenza annua è approssimativamente di 15 nuovi pazienti ogni 100000 individui e, nei bambini, i tumori del SNC sono la seconda forma di cancro più diffusa dopo le leucemie [1].

I tumori primari del SNC comprendono un gruppo eterogeneo di neoplasie benigne e maligne, le più comuni delle quali sono i gliomi per la loro origine da elementi della citogenesi a differenziazione gliale. Essi sono caratterizzati da un *pattern* di crescita infiltrante (gliomi diffusi), che porta nella maggior parte dei casi al mancato controllo locale attraverso l'asportazione chirurgica, e da resistenza a radio- e chemioterapia [2].

La prima classificazione dei gliomi, redatta da *Bailey e Cushing* nel 1926, era basata sul parallelismo tra l'aspetto morfologico delle cellule tumorali e delle cellule durante la normale citogenesi [3]. Essa aprì la strada ad una serie di classificazioni dette appunto istogenetiche. L'eziologia dei gliomi è ancora materia di discussione (resti embrionali, conversione neoplastica, mutazioni); negli ultimi anni l'ipotesi delle cellule staminali tumorali (CSCs) ha guadagnato un'attenzione speciale soprattutto per le possibili implicazioni terapeutiche. Come in altre neoplasie, le CSCs rappresentano una minoranza di cellule tumorali capaci di auto-rinnovamento, tumorigenicità, differenziamento e mantenimento del tumore [4]. Le CSCs possono rappresentare uno stato funzionale, derivando dalle cellule staminali neurali (NSCs) o da progenitori *committed*, o possono rappresentare cellule che attraverso un processo di "de-differenziamento" hanno acquisito nuovamente le proprietà tipiche della condizione di staminalità (Fig. 1) [5-6]. L'esistenza delle NSCs è stata dimostrata nell'uomo nel giro dentato dell'ippocampo, nella zona subcorticale e subventricolare, la regione più ampia. Fisiologicamente, tali cellule migrano e si differenziano secondo diversi *lineages* sotto stimolazioni intrinseche ed estrinseche. Con il passare del tempo la zona subventricolare diminuisce persistendo nell'adulto come strato subependimale.

Si pensa che i gliomi nascano monoclonali e diventino successivamente policlonali andando incontro ad un'eterogeneità genotipica seguita poi da una fenotipica. L'aumento del grado di mutazionalità e della capacità proliferativa porta alla nascita di nuovi cloni, caratterizzati da una miglior capacità di adattamento all'ambiente circostante e un maggior potenziale proliferativo, che competono con i predecessori in una sorta di selezione [7].

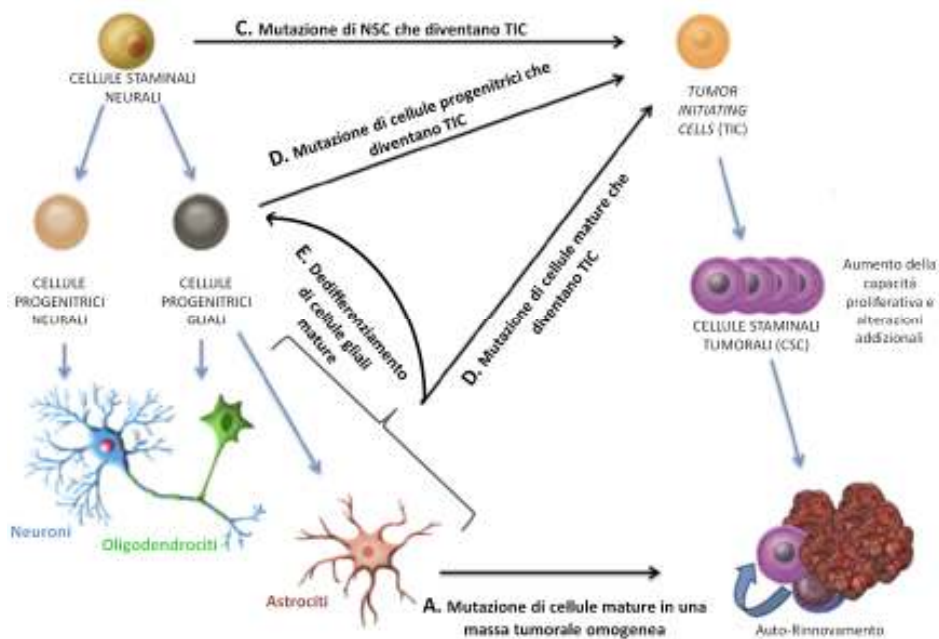


Figura 1 Differenti teorie sulla genesi dei gliomi. Inizialmente si pensava che cellule gliali mature andassero incontro a mutazione generando la loro controparte tumorale (A) che a sua volta era in grado di rigenerarsi costituendo la massa. Le teorie più recenti comprendono la mutazione di cellule mature in *Tumor Initiating Cells* (TIC) (B), la mutazione di cellule staminali neurali in TIC multipotenti (C) che si trasformano quindi in staminali tumorali, la mutazione di diversi progenitori gliali (D) ed infine il de-differenziamento di cellule gliali mature in uno stadio differenziativo più immaturo (cellule progenitrici) (E) [8].

DIAGNOSI E CLASSIFICAZIONE

Attualmente, i gliomi sono istologicamente classificati secondo la classificazione dei tumori del SNC stabilita dalla *World Health Organization* (WHO) e basata principalmente sulla somiglianza morfologica delle cellule tumorali con la loro controparte non neoplastica: astrociti, oligodendrociti e cellule ependimali [2]. Tale classificazione riconosce quattro gradi istologici di malignità che vanno dai tumori benigni di I grado ai più maligni di IV grado. L'astrocitoma pilocitico, il più comune glioma dell'infanzia, è il prototipo dei tumori di I grado, mentre il glioblastoma multiforme (GBM) costituisce il più comune e il più maligno dei gliomi dell'adulto (IV grado) (Tab. 1).

Mentre gli ependimomi sono spesso relativamente circoscritti, la maggior parte dei tumori oligodendrogliali, astrocitari e oligoastrocitari nell'adulto sono caratterizzati da un'infiltrazione diffusa del tessuto cerebrale circostante. I gliomi di basso grado (II grado) possiedono inoltre una forte tendenza alla progressione maligna verso neoplasie anaplastiche (III grado) ed eventualmente verso i GBM secondari (IV grado). A causa di tale comportamento aggressivo, i gliomi rappresentano una delle tipologie tumorali più devastanti e non possono essere curati con gli attuali mezzi terapeutici [2].

TIPO DI TUMORE	GRADO WHO
<i>Gliomi Astrocitari Diffusi Infiltranti</i>	
Astrocitoma Diffuso	II
Astrocitoma Anaplastico	III
Glioblastoma	IV
Glioblastoma a cellule giganti	IV
Gliosarcoma	IV
<i>Gliomi Astrocitari a Crescita Circoscritta</i>	
Astrocitoma Pilocitico	I
Astrocitoma Pilomixoide	II
Xantoastrocitoma Pleomorfo	II
Astrocitoma Subependimale a cellule giganti	I
<i>Oligodendrogliomi e Gliomi Misti</i>	
Oligodendroglioma	II
Oligodendroglioma Anaplastico	III
Oligoastrocitoma	II
Oligoastrocitoma Anaplastico	III
<i>Gliomi con Differenziazione Ependimale</i>	
Subependimoma	I
Ependimoma Mixopapillare	I
Ependimoma	II
Ependimoma Anaplastico	III

Tabella 1 Classificazione e *grading* dei gliomi secondo il sistema WHO di classificazione dei tumori del Sistema Nervoso Centrale [9].

La classificazione istologica e il *grading* rappresentano l'indicatore più affidabile e significativo per conoscere il comportamento clinico di questi tumori così come per l'*outcome* dei pazienti. Neoplasie di I grado possono solitamente essere curate attraverso la resezione chirurgica mentre i tumori di II grado, che mostrano una crescita ancora abbastanza lenta, spesso recidivano dopo l'asportazione e possiedono un'inevitabile tendenza a progredire verso l'anaplasia. La sopravvivenza media dei pazienti con glioma di II grado è di circa 5-8 anni dopo la diagnosi.

Gli astrocitomi anaplastici (III grado) sono invece tumori maligni che, crescendo molto rapidamente, richiedono un trattamento di radio- e chemioterapia aggiuntivo alla chirurgia. La sopravvivenza media dei gliomi anaplastici si riduce a 2-3 anni dopo la diagnosi, ad esclusione degli oligodendrogliomi di III grado, che spesso possiedono una prognosi più favorevole.

I pazienti affetti da GBM vanno invece incontro ad una rapida progressione della malattia indipendentemente dai trattamenti aggressivi attuabili e la loro sopravvivenza, con pochissime eccezioni, si riduce a circa un anno dalla diagnosi iniziale dopo la radioterapia e, prolungabile di poco, dopo la chemioterapia.

Un'accurata distinzione tra le differenti tipologie di glioma assume quindi una rilevante importanza a causa delle sue implicazioni prognostiche e terapeutiche. Al momento, gli *screening* per i gliomi non possiedono alcuna rilevanza clinica. Questo a causa della loro bassa incidenza, della mancanza di marcatori plasmatici sensibili e a causa dell'osservazione che i gliomi possono insorgere apparentemente *de novo* nell'arco di poche settimane o mesi. Tutte le lesioni sospettate di essere gliomi dovrebbero essere accertate mediante esame istologico prima di affrontare una qualsiasi scelta terapeutica, anche per pazienti anziani con grosse masse per cui non esiste ancora una ragionevole strategia d'intervento.

L'istopatologia rimane tutt'oggi il *gold standard* per l'identificazione e il *grading* dei gliomi [10]. Tuttavia, la classificazione istologica è spesso soggetta ad una significativa variabilità intra-osservatoriale. *Markers* molecolari aggiuntivi sono quindi richiesti per una classificazione rifinita e più oggettiva, una miglior predizione prognostica e un approccio terapeutico su misura [11-12].

ASTROCITOMI

Gli astrocitomi sono neoplasie composte principalmente da astrociti neoplastici. Questi tumori sono suddivisi secondo la classificazione WHO dei tumori del SNC in quattro differenti gradi istologici di malignità (I-IV grado) (Fig. 2).

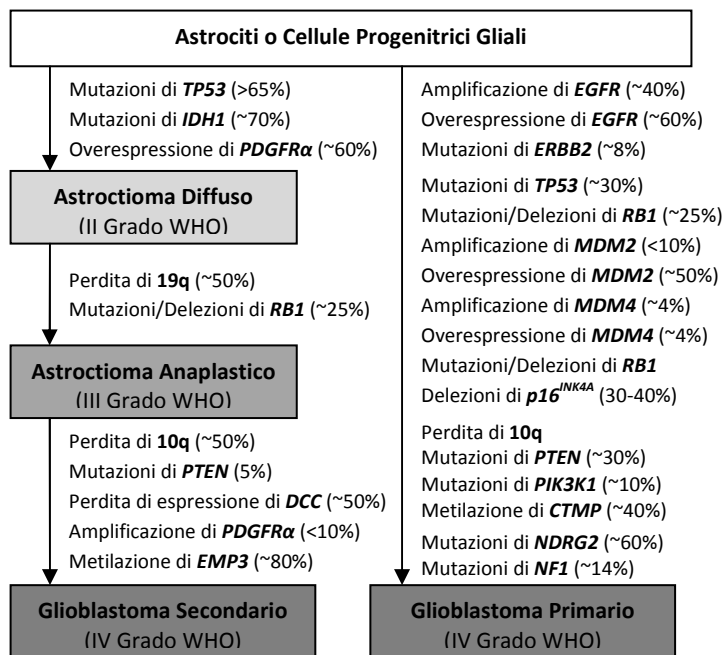


Figura 2 Frequenza delle alterazioni genetiche più comuni nell'evoluzione dei tumori astrocitari. La perdita di eterozigotità del cromosoma 10q è un evento frequente sia nei GBM primari che secondari [9].

Astrocitoma Pilocitico

L'astrocitoma pilocitico (I grado WHO) rappresenta il 5-6% di tutti i gliomi e possiede un tasso d'incidenza di 0,37 casi per 100000 individui/anno. Il tumore sorge più frequentemente nella regione infratentoriale e la sede più colpita è il cervelletto (67%).

L'astrocitoma pilocitico è un tumore circoscritto a bassa crescita che occorre principalmente nei bambini e nei giovani adulti con prognosi favorevole. Esso è caratterizzato da un *pattern* bifasico che varia da frazioni di cellule bipolari compatte, associate alle fibre di *Rosenthal*, a cellule multipolari, associate a microcisti e corpi granulari eosinofili (Fig. 3). I bambini affetti da Neurofibromatosi di tipo I (NF1) o Fibromatosi di *von Ricklinghausen*, una sindrome predisponente allo sviluppo di tumori, sono più soggetti allo sviluppo di questa neoplasia (15-20% dei casi) [2].

Recentemente è stata identificata nel 50-60% di questi tumori un'alterazione genetica che coinvolge il gene codificante per la serina-treonina chinasi BRAF (7q34). Tale gene presenta una duplicazione *in tandem* che porta alla fusione del gene *KIAA1549*, la cui funzione è ancora poco nota, con il dominio C-terminale di *BRAF*. Le analisi di sequenza hanno rivelato diversi punti di rottura da cui originano diverse varianti della proteina chimerica: *KIAA1549* esone 16–*BRAF* esone 9, *KIAA1549* esone 15–*BRAF* esone 9, *KIAA1549* esone 19–*BRAF* esone 9, *KIAA1549* esone 18–*BRAF* esone 10 and *KIAA1549* esone 16–*BRAF* esone 11. Tutte le varianti conservano il dominio chinasi di BRAF mentre perdono il dominio auto-inibitorio, risultando costituzionalmente attive [13-15]. Questa alterazione si è però dimostrata assai dubbia in successive indagini.

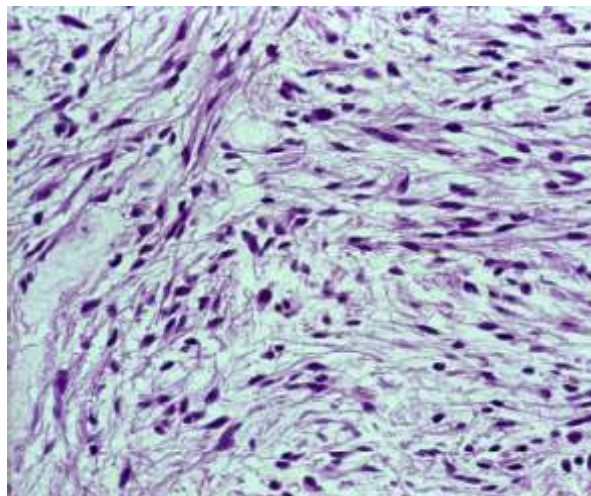


Figura 3 Astrocitoma pilocitico. Ematossilina - eosina.

Astrocitoma Diffuso

L'astrocitoma diffuso rappresenta il 10-15% di tutti i tumori astrocitari con un'incidenza annua di circa 1,4 nuovi casi/100000 individui. Il picco d'insorgenza si osserva nei giovani adulti con un'età compresa tra i 30 e i 40 anni. Nonostante possa essere localizzato in qualsiasi regione del SNC, la sede preferenziale è quella sopratentoriale dei lobi frontali e temporali.

La popolazione tumorale è composta da astrociti neoplastici, fibrillari o gemistocitici, ben differenziati, spesso esprimenti le proteine GFAP e S-100. La cellularità, rispetto al normale tessuto cerebrale, è moderatamente incrementata e occasionalmente si possono osservare atipie nucleari. L'attività mitotica è genericamente assente, l'indice proliferativo Ki-67 non supera infatti il 4% (Fig. 4).

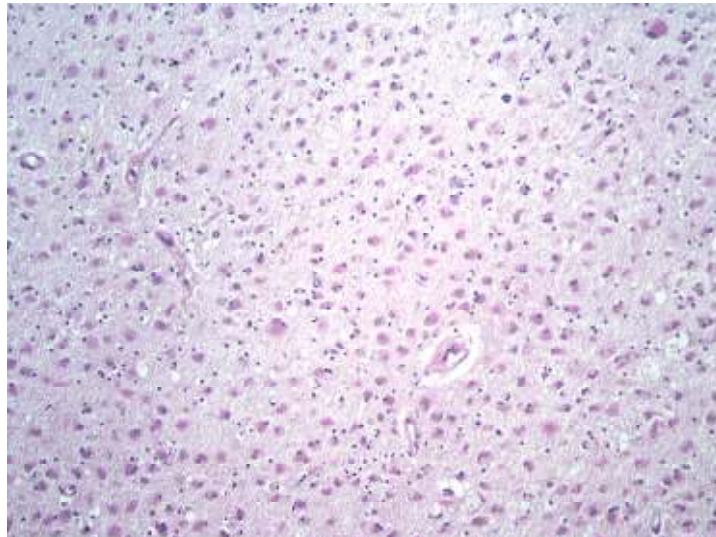


Figura 4 Astrocitoma gemistocitico (II grado). Ematossilina – Eosina.

Le caratteristiche infiltranti della neoplasia rendono la resezione chirurgica, nella maggior parte dei casi, difficile ed incompleta. Il decorso della malattia è quindi caratterizzato da una marcata variabilità inter-individuale ed è fortemente influenzato dalla possibile progressione maligna verso forme tumorali anaplastiche (III e IV grado). La sopravvivenza media in seguito ad intervento chirurgico è di circa 6-8 anni.

Le alterazioni genetiche più comuni negli astrocitomi diffusi sono le mutazioni del gene *TP53* (> 60% dei casi) e la perdita di eterozigotà a carico del cromosoma 17p (circa 50% dei casi). La frequenza di tale evento non subisce un incremento durante la progressione maligna indicando che questo evento genetico avviene negli stadi precoci della tumorigenesi.

Approssimativamente un terzo degli astrocitomi di II grado mostra inoltre metilazione dei promotori dei geni *CDKN2A* e *MGMT* [2].

Astrocitoma Anaplastico

L'astrocitoma anaplastico è una neoplasia maligna altamente infiltrante che colpisce gli adulti preferenzialmente nella sostanza bianca degli emisferi cerebrali. Dal punto di vista istologico, il tumore è caratterizzato da un incremento dell'attività mitotica (indice Ki-67 compreso tra il 5-10%) e anaplasia. Gli astrocitomi anaplastici sono composti da cellule con nuclei allungati, irregolari e ipercromatici, e con citoplasmi eosinofili positivi per la proteina gliofibrillare acida (GFAP) (Fig. 5). Come tutti i gliomi anaplastici, queste neoplasie possiedono una significativa eterogeneità regionale e il grado istologico viene quindi definito secondo le aree con apparenza più neoplastica.

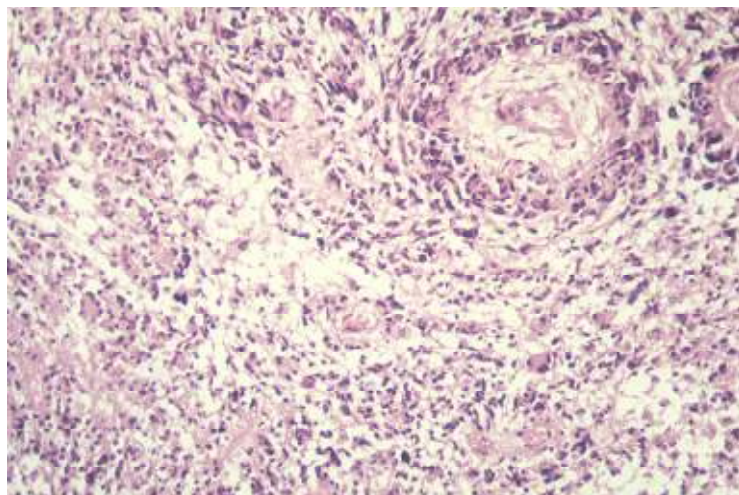


Figura 5 Astrocitoma anaplastico (III grado). Ematossilina – eosina.

L'età media d'incidenza si aggira intorno ai 45 anni e il tumore può svilupparsi per progressione maligna da un astrocitoma di grado inferiore o come lesione *de novo* (senza evidenza di lesioni precedenti).

Alle alterazioni genetiche riscontrate nella neoplasia di II grado, si aggiunge la perdita di eterozigosi a carico del cromosoma 10q (35-60% casi) [2].

Glioblastoma Multiforme

Il glioblastoma (IV grado) rappresenta il più frequente tumore cerebrale e costituisce il 50% di tutte le neoplasie gliali. L'incidenza annua si aggira intorno ai 3-5 nuovi casi per 100000 individui. La sopravvivenza media dei pazienti affetti da GBM non supera i 15 mesi nonostante l'intervento chirurgico in combinazione con radio- e chemioterapia.

Questi tumori si localizzano preferenzialmente nella sostanza bianca degli emisferi cerebrali e, nonostante la loro caratteristica invasività, tendono a non invadere lo spazio subaracnoideo e, conseguentemente, a non metastatizzare attraverso il liquido cerebrospinale [2].

Dal punto di vista istologico, i GBM sono caratterizzati da atipia nucleare, pleomorfismo cellulare, elevata attività mitotica, trombosi vascolare, proliferazione microvascolare e presenza di necrosi circoscritte (Fig. 6).

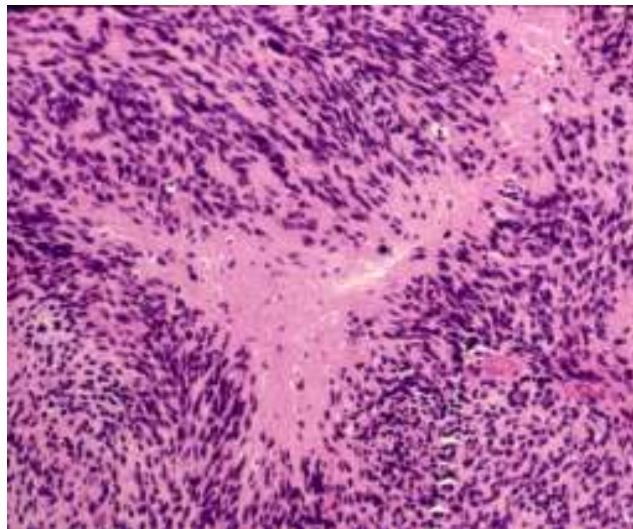


Figura 6 Glioblastoma multiforme. Ematossilina - eosina.

La maggior parte dei glioblastomi si sviluppa rapidamente senza un'evidenza clinica, radiologica o morfologia di una precedente lesione maligna (GBM primario o *de novo*, 90% dei casi). I pazienti affetti da GBM primario possiedono una storia clinica molto breve (< 3 mesi nella maggior parte dei casi) e tipicamente presentano grosse masse alla risonanza magnetica con necrosi centrale, presa di contrasto ad anello ed edema perifocale.

La restante parte dei glioblastomi (GBM secondari, 10% dei casi) si sviluppa più lentamente dalla progressione di un astrocitoma di basso grado (II o III grado WHO). GBM

primari e secondari costituiscono due distinte entità patologiche che colpiscono pazienti di differente età e si sviluppano secondo differenti *pathways* genetici [16].

I GBM primari mostrano frequente amplificazione del gene *EGFR*, delezione in omozigosi del locus *CDKN2A* ($p14^{ARF}$), monosomia del cromosoma 10, mutazione del gene *PTEN* e delezione/mutazione del gene *RB*. In contrasto, i glioblastomi secondari sono caratterizzati da mutazioni a carico dei geni *TP53* ed *IDH1* in circa i 2/3 dei casi. Altre alterazioni tipiche di questo sottotipo sono la perdita di eterozigosi a carico del cromosoma 17p e la metilazione del promotore del gene *MGMT* (40-45% dei casi) [17].

OLIGODENDROGLIOMI

Gli oligodendrogliomi costituiscono il 5-20% dei tumori gliali con un'incidenza annua di circa 0,2 casi/100000 individui. Essi sono principalmente neoplasie dell'adulto, con un picco d'incidenza tra la quarta e la sesta decade di vita. La sede preferenziale è la sostanza bianca degli emisferi cerebrali, principalmente nei lobi frontali (50-60%) ma gli oligodendrogliomi possono insorgere in tutto il SNC comprese le regioni infratentoriali e il midollo spinale.

Gli oligodendrogliomi di II grado WHO sono caratterizzati da cellule con nuclei uniformi e rotondi, moderata cromatina e presenza di calcificazioni. La densità cellulare è generalmente bassa o moderata e la tipica morfologia delle cellule tumorali, frutto di una regressione, viene comunemente chiamata "a uovo fritto" a causa della presenza di aloni perinucleari (*halo*). È inoltre presente una delicata rete di vasi sanguigni che dona al tumore una tipica conformazione ad "ala di pollo" (Fig. 7).

Gli oligodendrogliomi di II grado possono evolvere verso un grado più elevato (III grado) acquisendo caratteristiche tipiche dell'anaplasia: alta cellularità, presenza di mitosi, atipia nucleare, proliferazione microvascolare e necrosi, con o senza pseudopalisate. Molto frequenti in questi tumori sono inoltre le calcificazioni.

I pazienti affetti da oligodendroglioma di II grado possiedono una sopravvivenza media compresa tra i 10 e i 17 anni. La prognosi invece è più sfavorevole per gli oligodendrogliomi anaplastici che infatti possiedono una sopravvivenza media di circa 4-5 anni. La prognosi degli oligodendrogliomi rimane generalmente più favorevole rispetto agli astrocitomi di pari grado (13 anni verso 7,5 anni, $p = 0,003$) e la presenza di una frazione oligodendrogliale in un glioma infiltrante è indice predittivo di una maggior sopravvivenza [2].

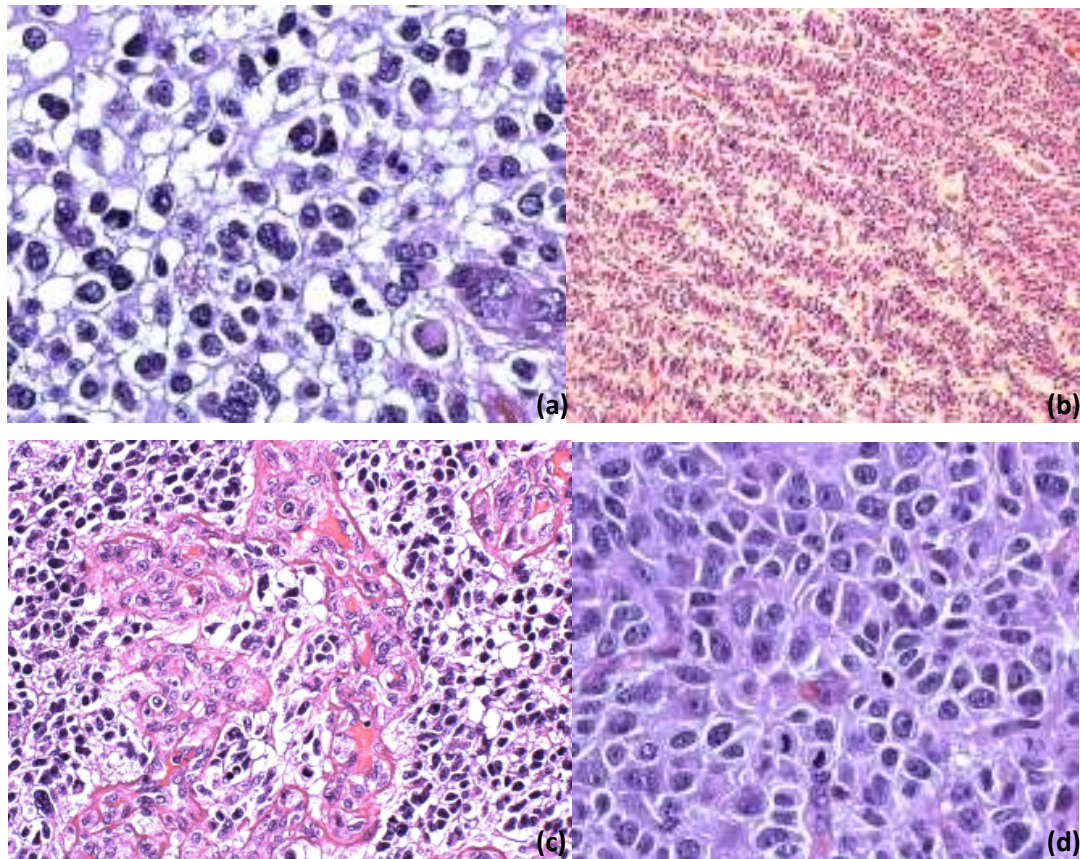


Figura 6 Oligodendroglioma di II grado, ematossilina-eosina: (a) *Allure* con *halo* perinucleare; (b) Ritmi a pettine. Oligodendroglioma anaplastico, ematossilina eosina: (c) Proliferazioni microvascolari. (d) Polimorfismo nucleare.

L'alterazione genetica più frequente in questo tipo di tumori è la perdita allelica combinata dei *loci* 1p e 19q (60-70%). Questa mutazione è rilevabile sia nelle lesioni di II che di III grado, suggerendone un possibile ruolo nella tumorigenesi oligodendrogliale. I tumori con co-delezione di entrambi i *loci* risultano, inoltre, essere più sensibili alla radioterapia e alla chemioterapia, probabilmente a causa della perdita di geni che mediano la resistenza ai trattamenti o all'associazione di questa perdita con altri eventi genetici.

Le forme tumorali anaplastiche possono inoltre presentare, con maggior frequenza rispetto ai II gradi, l'ipermetilazione del promotore del gene *MGMT* e addizionali delezioni cromosomiche, come quella che interessa la regione 9p ed in particolar modo il *locus CDKN2A* (33-42%). In alcuni casi sono inoltre riscontrabili, in modo esclusivo alla co-delezione di 1p/19q, anche le mutazioni a carico di *TP53*, l'amplificazione del gene *EGFR*, la delezione del cromosoma 10q e le mutazioni del gene *PTEN* (Fig. 8) [18-20].

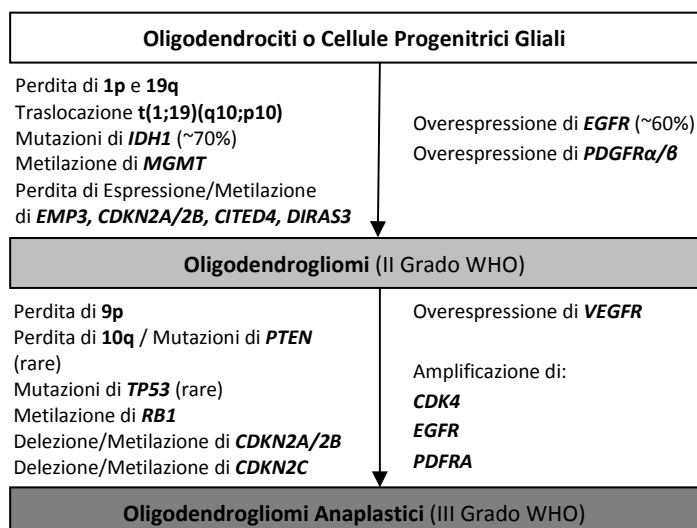


Figura 7 Evoluzione degli oligodendrogliomi e lesioni genetiche caratteristiche [9].

OLIGOASTROCITOMI

Gli oligoastrocitomi sono neoplasie miste con caratteristiche morfologiche proprie sia degli astrocitomi sia degli oligodendrogliomi che rappresentano circa il 10-15% dei gliomi infiltranti. L'incidenza annua è di circa 0,1 casi per 100000 individui; l'età media dei pazienti è compresa tra i 35-45 anni. Gli oligoastrocitomi sono localizzati in modo preferenziale negli emisferi cerebrali principalmente nella regione frontale e temporale.

Dal punto di vista istopatologico, queste neoplasie possiedono una cellularità moderata con un indice mitotico basso o assente; possono inoltre essere presenti microcalcificazioni e degenerazione microcistica. Necrosi e proliferazioni microvascolari sono invece assenti negli oligoastrocitomi. Le due componenti, astrocitaria ed oligodendrogliale, possono essere presenti sia come aree tumorali diffusamente miste sia come aree distinte e separate (Fig. 9). A livello clinico questi tumori si comportano come astrocitomi diffusi, con un più elevato rischio di trasformazione maligna rispetto agli oligodendrogliomi.

La diagnosi di questi tumori è basata su criteri istopatologici, poiché essi non sono radiologicamente distinguibili dagli altri gliomi di basso grado. Gli oligoastrocitomi di II grado possono, occasionalmente, presentare figure mitotiche, bassa o moderata cellularità e atipia cellulare media o moderata. Pleomorfismo cellulare, atipia nucleare, alta cellularità e anaplasia della componente astrocitaria, oligodendrogliale o di entrambe, sono invece indice di un oligoastrocitoma anaplastico (III grado) (Fig. 10) [2; 21].

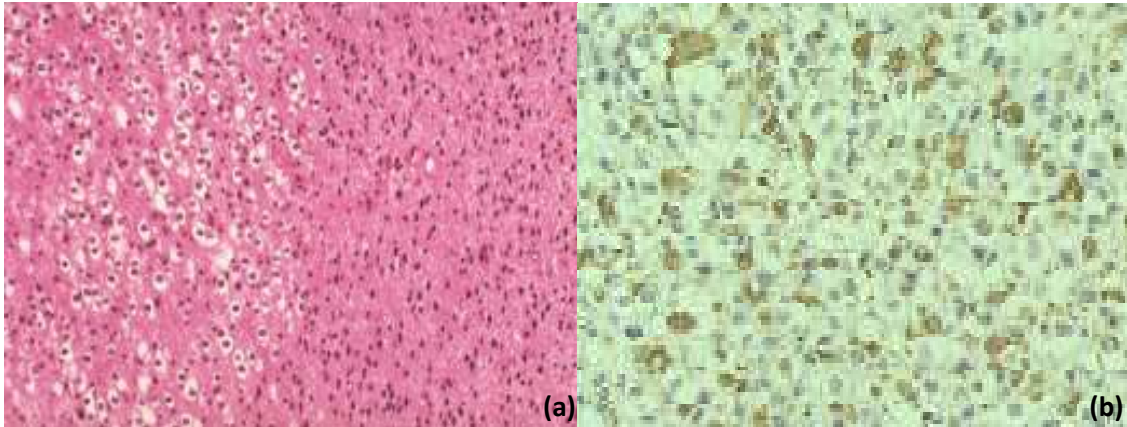


Figura 8 Oligoastrocitoma: (a) *pattern* bifasico, ematossilina-eosina [2]; (b) Immunoistochima con anticorpo anti-GFAP.

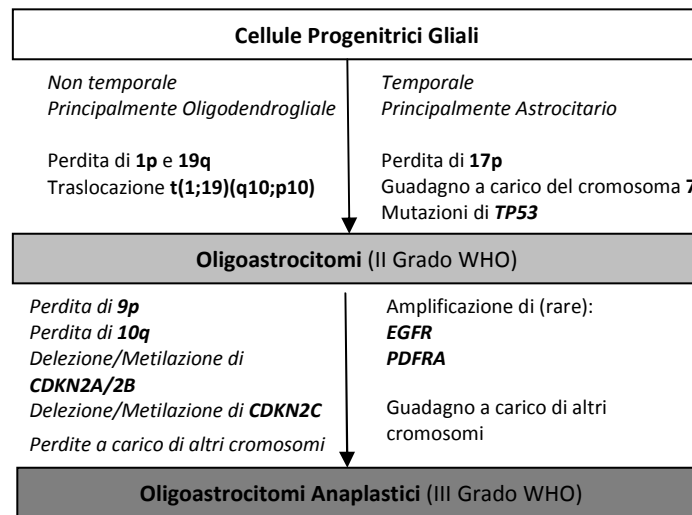


Figura 10 Evoluzione degli oligoastrocitomi e lesioni genetiche caratteristiche [9].

TERAPIA

Il trattamento classico per i gliomi di nuova diagnosi comprende in primo luogo la resezione chirurgica. Tale intervento ha tre funzioni principali:

- Verifica della natura del tumore;
- Alleviamento dei segni e sintomi causati dall'effetto "massa";
- Miglioramento della prognosi.

Tumori superficiali e di piccole dimensioni vanno più frequentemente incontro ad un'estesa resezione, mentre lesioni profonde, di grosse dimensioni e che crescono in strutture mediane possiedono una prognosi poco favorevole riguardo all'ampiezza della resezione, che

nella maggior parte dei casi non risulta mai completa. La biopsia rimane a volte l'unica opzione per le neoplasie multifocali o coinvolgenti il corpo calloso. L'obiettivo fondamentale della chirurgia per i gliomi rimane comunque la rimozione della maggior parte del tumore senza causare nuovi *deficit* neurologici nel paziente [22].

In seguito all'intervento, i gliomi anaplastici vengono trattati con la radioterapia. I dosaggi sono variabili da 45-60 Gy in frazioni da 1,8-2 Gy mirati verso la regione tumorale con un margine di sicurezza di 2-3 cm, a seconda della localizzazione. L'effetto negativo principale di questo tipo di terapia è la radionecrosi del tessuto cerebrale sano. Nonostante ciò, l'impiego della radioterapia ha permesso l'aumento della sopravvivenza dei pazienti affetti da GBM da 6 a 12 mesi [23].

Il ruolo della chemioterapia per il trattamento dei gliomi è stato investigato in diversi studi ma rimane ancora controverso. In generale il farmaco può venire somministrato in tre differenti momenti della malattia:

- Alla diagnosi, contemporaneamente o immediatamente dopo alla radioterapia (chemioterapia adiuvante);
- Prima del trattamento radioterapico (chemioterapia neoadiuvante);
- Al momento della progressione neoplastica (chemioterapia di salvataggio).

In passato, i pazienti affetti da astrocitoma anaplastico erano stati inclusi nei medesimi *trials* clinici dei pazienti con GBM. Tali studi non avevano confermato nessun vantaggio terapeutico del trattamento combinato verso la sola radioterapia. Per esempio, un grosso studio inglese aveva esaminato l'impiego combinato di procarbazine, lomustina (CCNU) e vincristina (PVC) e aveva evidenziato una sopravvivenza media di 15 mesi per il trattamento associato a radioterapia contro i 13 mesi del solo impiego radioterapico. Questo studio, così come altri simili, aveva dimostrato che l'associazione tra PCV e radioterapia, in pazienti con gliomi di basso grado di nuova diagnosi, prolungava la sopravvivenza libera (PFS) da malattia ma non la sopravvivenza totale (OS) [24].

Uno studio alternativo sul trattamento intensivo dei gliomi di nuova diagnosi, condotto dal gruppo tedesco di neuro-oncologia (NOA), aveva esplorato se la sola chemioterapia, impiegando PCV o temozolomide, potesse sostituire la radioterapia. Il *trial* NOA04 aveva così dimostrato che non vi era differenza nella sopravvivenza totale e libera da malattia. Tuttavia, aveva evidenziato che il temozolomide (TMZ) era efficace quanto il trattamento PCV ma meglio tollerato [25].

Il TMZ (Temodal®, Schering-Plough, Kenilworth, NJ, USA) è una *prodrug* imidazotetrazinonica di seconda generazione in grado di superare la barriera emato-encefalica e di convertirsi spontaneamente nel metabolita attivo senza necessità di demetilazione enzimatica epatica (Fig. 11). Il TMZ appartiene alla famiglia degli agenti alchilanti la cui lesione prodotta, a livello del DNA, prevede l'alchilazione nelle seguenti posizioni: O₆ e N₇ dei residui di guanina e O₃ dei residui di adenina. Il successivo accumulo di addotti nel DNA inibisce l'inizio della replicazione nelle cellule bloccando il ciclo in fase G2-M [26;27].

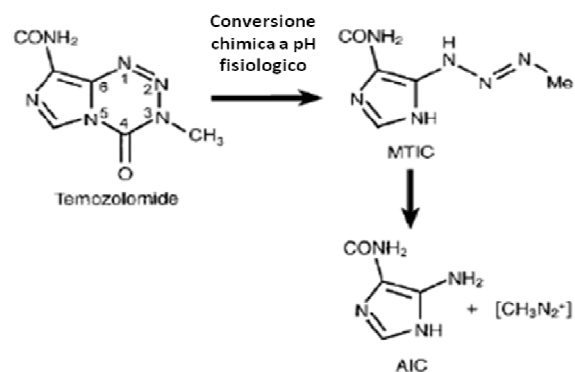


Figura 11 La conversione spontanea del farmaco nell'agente attivo metilante, MTIC, è condotta dall'effetto dell'ambiente acquoso e del pH sul C₄ altamente elettropositivo. Quest'attività permette l'apertura dell'anello della molecola rilasciando CO₂ e generando il MTIC che, degradato a catione metildiazonio, trasferisce gruppi metilici al DNA. Infine, una volta degradato ad AIC, viene escreto per via renale [26].

Lo studio NOA-04 ha dimostrato inoltre, per la prima volta in maniera prospettica, che gli oligodendrogliomi anaplastici possiedono una prognosi migliore rispetto agli astrocitomi anaplastici. Gli oligodendrogliomi e gli oligoastrocitomi condividono il medesimo decorso favorevole. Le attuali raccomandazioni per il trattamento dei pazienti affetti da gliomi anaplastici prevedono l'impiego della sola radioterapia o chemioterapia ma non in modalità di trattamento combinata.

Per i gliomi di basso grado ricorrenti la scelta terapeutica è invece principalmente determinata dal tipo di trattamento primario, per esempio pazienti che non erano stati irradiati per la prima lesione, se ricorrenti, riceveranno la radioterapia.

Successivi *trials* clinici hanno stabilito il ruolo prognostico sempre più prominente dei marcatori molecolari ricorrenti nei gliomi, anche se attualmente nessuno di questi *markers* è utilizzato nella scelta del trattamento (radioterapia vs chemioterapia vs trattamento combinato):

- Codelezione di 1p/19q;
- Mutazioni a carico dei geni *IDH1/2*;
- Metilazione del promotore del gene *MGMT*.

Per quanto riguarda invece i GBM, i pazienti sotto i 70 anni con un buon indice KPS (*Karnofsky performance status*) vengono trattati con radioterapia e con temozolomide concomitante e adiuvante. Il beneficio della chemioterapia è più evidente nei pazienti più giovani ed in particolare, in quelli che presentano metilazione del promotore del gene *MGMT*. Tale regime terapeutico ha evidenziato un incremento della sopravvivenza media da 12,1 a 14,6 mesi, e di due anni dall'11% al 27% dei casi per i pazienti trattati con TMZ. Il tasso di sopravvivenza di circa 2 anni sale al 49% se si considera il solo sottogruppo di pazienti con ipermetilazione di *MGMT* [28; 29].

Il trattamento *standard* per la maggioranza dei pazienti anziani (>70 anni), che costituiscono oltre il 50% dei pazienti affetti da GBM, è invece meno definito. Questi pazienti vengono spesso esclusi dai *trials* clinici e quindi il ruolo della chemioterapia, per il loro trattamento, rimane ancora poco chiaro. I pazienti anziani vengono quindi spesso sottoposti alla sola radioterapia in fasci accelerati (40 Gy in 15 frazioni) o ad approcci palliativi in seguito all'intervento [30]. Esistono però recenti evidenze che pazienti anziani, ma sani, possono trarre beneficio dalla terapia in modalità combinata. Lo stato di metilazione del gene *MGMT* sembra essere un marcatore predittivo per il beneficio del trattamento con TMZ e potrebbe in futuro essere impiegato per guidare le decisioni terapeutiche di questo particolare gruppo di pazienti [31; 32].

Le opzioni di trattamento per i glioblastomi ricorrenti sono in continuo incremento ma non è ancora stato definito uno *standard*. Una minoranza di tali pazienti (20-25%) può beneficiare di un secondo intervento chirurgico e, in alcuni casi, sono anche candidati ad un secondo ciclo di radioterapia. L'attuabilità di tali opzioni è strettamente dipendente dal sito d'insorgenza e del tipo di ricorrenza, nonché dall'intervallo di tempo trascorso dal precedente intervento [10].

GENETICA DEI GLIOMI

La comprensione della biologia e della genetica dei gliomi ha conosciuto nelle ultime due decadi un significativo incremento ma sfortunatamente tutto ciò non ha corrisposto ad un effettivo vantaggio terapeutico. Studi di citogenetica e di genetica molecolare hanno portato

all'identificazione di diverse alterazioni cromosomiche e genetiche ricorrenti. I recenti sviluppi delle tecnologie in ambito molecolare, specialmente per quanto riguarda i *microarrays* ad alta densità ed il sequenziamento del genoma, hanno reso possibile la valutazione dei cambiamenti genetici ed epigenetici nei gliomi su larga scala.

Alcune di queste alterazioni ricorrenti hanno acquisito nel tempo un significato diagnostico, prognostico e predittivo di risposta ai trattamenti terapeutici.

Co-delezione dei cromosomi 1p/19q

L'alterazione genetica che caratterizza gli oligodendrogliomi è la perdita combinata del braccio corto del cromosoma 1 e del braccio lungo del cromosoma 19. Tale alterazione è riscontrata nel 70-80% dei casi con diagnosi di oligodendroglioma, mentre negli oligoastrocitomi la sua frequenza è decisamente inferiore (20-30%). La co-delezione di 1p/19q è raramente presente nei tumori astrocitari dove invece si possono riscontrare delezioni parziali, non associate tra loro, a carico dei medesimi cromosomi [33; 34].

Dal punto di vista biologico, la perdita combinata di 1p e 19q è mediata da una traslocazione sbilanciata tra i due cromosomi. Si ritiene che una copia di entrambi i cromosomi vada incontro ad un reciproco scambio, a livello della regione pericentromerica, delle intere braccia formando due cromosomi derivati: $der(1;19)(p10;q10)$ e $der(1;19)(q10;p10)$. Il cromosoma derivato, contenente il braccio corto del cromosoma 1 e il braccio lungo del cromosoma 19, viene successivamente perso (Fig. 12) [35].

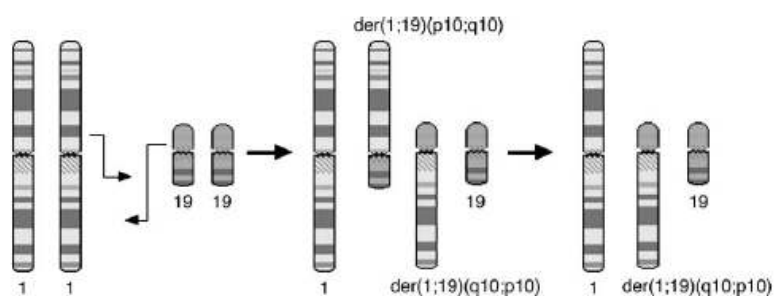


Figura 12 Ipotetico meccanismo di formazione della codelezione dei cromosomi 1p/19q [35].

A causa dell'elevata frequenza di questo evento genetico, si ritiene che la co-delezione di 1p/19q possa rappresentare un marcatore abbastanza specifico dei tumori oligodendrogliali. A questo riguardo, essa viene impiegata come marcatore diagnostico in aggiunta alla diagnosi istologica.

I primi studi per l'identificazione del trattamento terapeutico più opportuno per gli oligodendrogliomi, hanno evidenziato che lo stato dei cromosomi 1p/19q possedeva un significato predittivo di risposta alla chemioterapia con PCV. Esperienze successive hanno poi indicato che il beneficio terapeutico delle neoplasie con la co-delezione non era ristretta al solo regime PCV ma anche ad agenti chemioterapici meno tossici, quali il TMZ, e alla radioterapia [36].

In aggiunta al significato diagnostico e predittivo, la perdita combinata di 1p/19q viene considerata un fattore prognostico positivo. I pazienti portatori di questa alterazione possiedono un'aumentata PFS e il loro tumore sembra possedere un comportamento più indolente anche prima di un eventuale terapia. Sembra infatti che i pazienti con co-delezione di 1p/19q possiedano una forma "geneticamente favorevole" di oligodendroglioma correlata ad una maggior sopravvivenza, indipendentemente dal tipo di trattamento a cui andranno incontro [37].

Lo stato dei cromosomi 1p e 19q può essere analizzato con differenti tecniche molecolari, quali ad esempio la perdita di eterozigotà (LOH) con microsatelliti, l'ibridazione fluorescente *in situ* (FISH), la *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA[®]) e il *CGH array* (*Comparative Genome Hybridization*). L'analisi di LOH richiede il confronto tra il dosaggio allelico del DNA tumorale e del DNA costitutivo del paziente. Tale confronto, nel caso della presenza della delezione, evidenzierà uno sbilanciamento allelico ovvero una variazione, nel tumore, del rapporto allelico del marcatore in esame rispetto al DNA costitutivo (Fig. 13).

Il *CGH array* è una metodica ad alta risoluzione basata sul confronto tra il DNA tumorale di una paziente e un DNA normale di riferimento mediante la loro marcatura con due differenti fluorocromi e la loro successiva ibridazione su un *array* contenente migliaia di sonde specifiche per le regioni d'interesse.

La FISH è una tecnica citogenetica che permette d'individuare specifiche sequenze di DNA nei cromosomi mediante sonde fluorescenti rilevate poi al microscopio. Per la valutazione dello stato dei cromosomi 1p e 19q vengono impiegate generalmente sonde localizzate nelle regioni più comunemente delete (1p36 e 19q13) e sonde centromeriche di controllo (1q25 e 19p13) [38]. La FISH non permette però l'identificazione di delezioni che cadono al di là delle regioni mappate dalle sonde impiegate. E' stato infatti dimostrato che, all'interno del cromosoma 1, l'estensione della delezione può essere variabile. Tale estensione sembra essere correlata positivamente al grado di risposta alla chemioterapia mentre delezioni interstiziali

e/o parziali possiedono un significato prognostico negativo e non si associano alla delezione di 19q [33; 34].

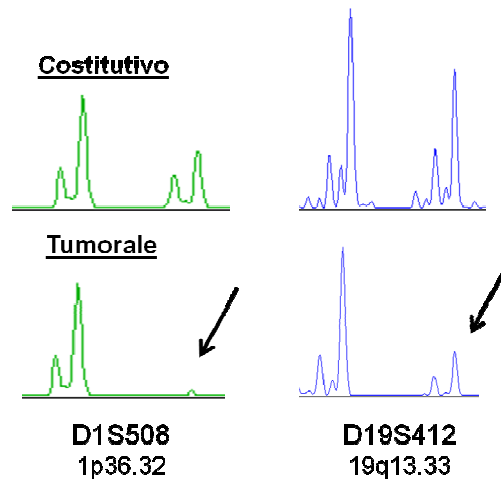


Figura 13 Elettroferogrammi di due marcatori microsatellitari per i cromosomi 1p e 19q nel DNA tumorale e costitutivo di un paziente con oligodendroglioma. Nel tumore è evidente la perdita di uno dei due alleli.

L'MLPA[®] è una metodica di PCR *multiplex* in cui possono essere amplificate simultaneamente fino a 45 differenti sequenze in modo quantitativo ed in un'unica reazione.

Tale reazione è possibile mediante l'impiego di sonde fluorescenti specifiche per le regioni d'interesse che a loro volta vengono amplificate, grazie ad un'unica coppia di *primers*, e separate per elettroforesi capillare [39].

Queste tecniche di diagnostica molecolare sono state inoltre impiegate nel corso degli anni anche con lo scopo d'identificare, al momento con scarsi risultati, eventuali geni oncosoppressori localizzati nelle regioni 1p e 19q.

Mutazioni dei geni IDH1 e IDH2

Recentemente è stato scoperto che i geni codificanti le isoforme citoplasmatica e mitocondriale dell'enzima isocitrato deidrogenasi, *IDH1* (2q33) e *IDH2* (15q26), sono frequentemente mutati nei tumori [40]. Nel 2009 Yan *et al.* hanno riportato che le mutazioni a carico di questi geni erano un evento raro in una minoranza di GBM primari (5%) ma ricorrente nella maggioranza di quelli secondari (60-90%) [41].

Gli enzimi IDH sono membri della famiglia delle deidrogenasi β -decarbossilanti e catalizzano la decarbossilazione ossidativa dell'isocitrato in α -chetoglutarato (α -KG) e CO_2 nel

ciclo degli acidi tricarbossilici (ciclo di *Krebs*). Esistono tre isoforme di isocitrato deidrogenasi: IDH1 e IDH2 sono omodimeri, ognuno dei quali con due identici siti attivi, mentre IDH3 è un enzima eterotetramerico composto da due subunità α , una subunità β e una γ . IDH3 catalizza la conversione dell'isocitrato ad α -KG nei mitocondri producendo, in una reazione NAD^+ -dipendente, un equivalente di NADH. IDH1 e IDH2 invece sono enzimi NADP^+ -dipendenti e rappresentano una delle tre famiglie enzimatiche in grado di produrre NADPH, un importante cofattore necessario per la biosintesi dei nucleotidi e degli acidi grassi, essenziale per l'attività cellulare anti-ossidante. IDH1 è espresso nel citoplasma e nei perossisomi, mentre IDH2 è localizzato esclusivamente a livello mitocondriale. Gli enzimi IDH sono positivamente e negativamente regolati rispettivamente attraverso il legame di ADP e ATP ad un sito allosterico e, come la maggior parte degli enzimi metabolici, dalla disponibilità del substrato e di cofattori. Gli enzimi IDH sono composti da due domini: uno minore, comune a molte deidrogenasi, e uno maggiore, associato ad una serie di β -foglietti antiparalleli che costituiscono un motivo a cerniera [42].

La reazione di conversione dell'isocitrato a α -KG è condotta spontaneamente dalla riduzione del NAD(P)^+ a NAD(P)H . Durante le due catalisi che permettono la decarbossilazione ossidativa, IDH assume una conformazione "chiusa" attraverso cui il complesso isocitrato- Mg^{2+} si lega tra i due domini dell'enzima [43]. I due residui chiave del sito attivo di IDH1, essenziali per la prima catalisi, sono la tirosina (Y) 140 e la lisina (K) 212. Tali residui sono altamente conservati nella famiglia degli enzimi ossidoreduttasi [44]. La seconda catalisi invece richiede una triade di residui di arginina (R100, R109 e R132 per *IDH1* e R140, R149 e R172 per *IDH2*), nel sito di riconoscimento del complesso Mg^{2+} -isocitrato, necessaria per la formazione del ponte salino con il substrato. Tra tutti i residui amminoacidici coinvolti in questo legame, il residuo R132 è l'unico a formare tre legami idrogeno con i gruppi α - e β -carbossilici dell'isocitrato mentre gli altri ne formano al massimo due. Durante la reazione, il residuo R132 interagisce con il residuo di acido aspartico (D) 297 nella conformazione transitoria semi-aperta e potrebbe quindi essere importante per il passaggio dell'enzima dallo stato chiuso a quello aperto [45].

Nei gliomi oltre il 90% delle mutazioni a carico del gene *IDH1* sono rappresentate dalla sostituzione amminoacidica p.R132H, seguita dalla p.R132C (3.2%), p.R132G (2.1%), p.R132S (1.6%) e p.R132L (<1%) [41; 45-48]. Le mutazioni a carico del gene *IDH2* sono meno comuni e quelle, per il momento, identificate sono la p.R172K (60%), p.R172M (26.8%), p.R172W (9%) e p.R172S (<1%) [45; 46]. Tutte le mutazioni di *IDH1* e *IDH2* sono di origine somatica,

riscontrabili in uno stato di eterozigosi e, nei gliomi, mutualmente esclusive tra di loro. La loro distribuzione ha evidenziato come sia la posizione del residuo e non il cambiamento amminoacidico ad influenzare l'attività enzimatica. Il meccanismo attraverso cui le mutazioni dei geni *IDH1* e *IDH2* mediano il processo di oncogenesi nei gliomi rimane ancora da chiarire. A riguardo sono state avanzate due ipotesi: la perdita e il guadagno di funzione.

A favore della prima ipotesi, entrambe le isoforme mutate sono caratterizzate dalla riduzione della reazione spontanea di conversione dell'isocitrato ad α -KG attraverso la conversione di NADP^+ a NADPH. D'accordo con la seconda ipotesi, *IDH1* e *IDH2* mutati acquisiscono la capacità di condurre la reazione inversa di conversione dell' α -KG, a discapito del NADPH, con la produzione neomorfica del metabolita 2-idrossiglutarato (2-HG) [49].

Il 2-HG è strutturalmente simile all' α -KG e quindi agisce come inibitore competitivo di molte vie enzimatiche α -KG-dipendenti:

- Inibizione della degradazione del fattore indotto dall'ipossia (HIF-1 α) mediante la prolina idrossilasi. L'incremento dei livelli di HIF-1 α induce l'espressione di VEGF promuovendo di conseguenza l'angiogenesi e la progressione tumorale [50];
- Deregolazione epigenetica del genoma attraverso l'inibizione della de-metilazione degli istoni e delle 5-metilcitosine (5-mC) [51];
- Inibizione della de-metilazione promossa da TET2, un'idrossilasi che converte le 5-mC nelle 5-idrossimetilcitosine (5-hmC), considerate un prodotto intermedio della de-metilazione del DNA. Tale inibizione causa un globale stato d'ipermetilazione [52].

È stato quindi riconosciuto anche nei gliomi uno specifico profilo di metilazione del DNA denominato G-CIMP (*CpG-island methylator phenotype*), analogo a quello identificato nei carcinomi del colon, e caratterizzato da uno stato d'ipermetilazione di differenti *loci* cromosomici [53]. Il G-CIMP è fortemente associato alle mutazioni dei geni *IDH* [54; 55].

Oltre all'azione del 2-HG, la riduzione dei livelli di NADPH, causata dalle isoforme mutate di *IDH1* e *IDH2*, agisce a diversi livelli [56]. Il NADPH è infatti richiesto per la riduzione del glutatione disolfuro (GSSG) a glutatione (GSH) ad opera della glutatione reduttasi. Il GSH è il principale agente anti-ossidante contro lo stress ossidativo causato dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS). L'enzima *IDH1* contribuisce a rifornire il *pool* di NADPH anche attraverso la glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) e la malato deidrogenasi. Le cellule con una ridotta attività enzimatica, NADP^+ -dipendente, degli enzimi *IDH* sono sottoposte ad un incremento dei danni ossidativi al DNA, un aumentato rapporto GSSG verso il GSH totale e ad una ridotta

sopravvivenza all'esposizione ai danni ossidativi. La riduzione dei livelli di NADPH causata dalle mutazioni di *IDH1* e *IDH2* può essere mal interpretata dalla cellula come un segnale di bassa concentrazione di nutrienti. Questo stato viene compensato aumentando il consumo cellulare di nutrienti o bloccando il processo di differenziamento (Fig. 14) [57].

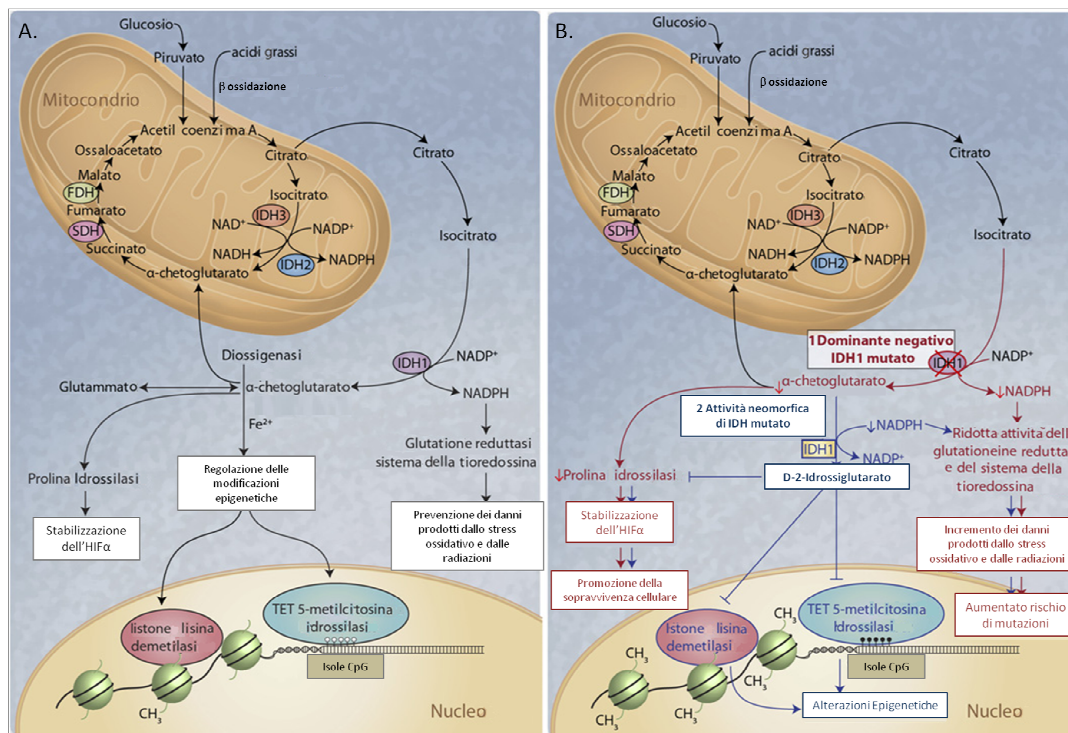


Figura 14 Meccanismo d'azione degli enzimi isocitrato deidrogenasi *wild-type* (A) e mutati (B). (A) IDH1 catalizza la decarbossilazione ossidativa dell'α-KG con la produzione dell'equivalente riducente NADPH. L'α-KG regola la degradazione, mediata dalla prolina idrossilasi, del fattore HIFα. L'α-KG, insieme al ferro, è cofattore di diversi enzimi diossigenasi che regolano le modificazioni epigenetiche, come le istone lisina demetilasi e gli enzimi della famiglia TET. Il NADPH invece possiede un ruolo importante nella protezione cellulare dallo stress ossidativo e indotto dalle radiazioni contribuendo al sistema della tioredossina e della glutazione riducenti. (B) I due meccanismi d'azione dell'enzima IDH1 mutato. (1) L'enzima mutato possiede un'attività dominante negativa inibendo la normale attività di IDH1 *wild-type*. Questa attività risulta in una riduzione della produzione di α-KG e NADPH che ostacola la degradazione di HIFα promuovendo la sopravvivenza cellulare. La riduzione dei livelli di NADPH incrementa il rischio di stress ossidativo e di mutagenesi. (2) L'attività neomorfica di IDH1 mutato conduce alla produzione del 2-HG che inibisce competitivamente le istone lisina demetilasi e gli enzimi TET. Il 2-HG può inoltre inibire la produzione di HIFα mediante l'endostatina [53].

Le mutazioni di *IDH1* e *IDH2* sono frequenti nei gliomi di basso grado (II e III) astrocitari, oligodendrogliali e misti (> 80%) e nei GBM secondari (60-90%) [41; 48]. In contrasto, questi eventi sembrano essere rari o assenti negli astrocitomi pilocitici e nei GBM primari (< 5%). Sono assenti negli ependimomi e in altre neoplasie del SNC con l'eccezione dei tumori neuroectodermici primitivi (PNET9 [47]. La maggioranza degli astrocitomi di basso grado (>60%) sono caratterizzati dalla presenza delle mutazioni di *IDH1/2* in associazione alle

mutazioni del gene *TP53*, mentre nella controparte oligodendrogliale si osserva la medesima frequenza per l'associazione con la co-delezione dei cromosomi 1p/19q [48].

Nei gliomi le mutazioni dei geni *IDH1* e *IDH2* sono state trovate essere correlate ad una maggior sopravvivenza totale e libera da malattia [58; 59]. La più significativa associazione risulta però essere quella con l'età dei pazienti al momento della diagnosi; generalmente l'età media dei pazienti con le mutazioni dei geni *IDH1* e *IDH2* è significativamente più bassa rispetto a quelli con l'isoforma *wild-type* [40; 60; 61]. Riguardo alla risposta ai trattamenti terapeutici, alcuni studi hanno suggerito una possibile correlazione tra le mutazioni dei geni *IDH1/2* e la risposta alla chemioterapia ma l'argomento è ancora oggetto di discussione [42; 62; 63].

Metilazione del promotore del gene *MGMT*

Il gene *MGMT*, localizzato sul cromosoma 10q26, codifica per l'enzima di riparo del DNA O₆-metilguanina DNA metiltransferasi. *MGMT* è responsabile del trasferimento, e quindi della rimozione, di gruppi alchilici in posizione O₆ del DNA causati da agenti chemioterapici come il TMZ. L'O₆-metilguanina (O₆MeG) è una potente lesione mutagenica e citotossica prodotta da reazioni di alchilazione di tipo S_N1, dove la formazione di un addotto di DNA è preceduta dalla rottura di un composto mutagenico in una specie reattiva metilante. Tale alterazione porta ad una mutazione di tipo transazionale della guanina ad adenina a causa del suo preferenziale appaiamento alterato con la timina durante la replicazione. Questo errore viene riconosciuto dalla macchina di riparazione del *mismatch*: la timina viene tagliata e successivamente viene inserita un'altra timina in posizione opposta al O₆MeG non riparato facendo ricominciare il ciclo. Questo tentativo inutile di riparazione può portare all'arresto del ciclo cellulare, allo scambio tra cromatidi fratelli, ad aberrazioni cromosomiche ed infine ad apoptosi (Fig. 15) [64].

La lesione O₆MeG viene efficientemente e stechiometricamente riparata da *MGMT* attraverso il trasferimento di addotti metilici allo zolfo della cisteina del sito attivo dell'enzima (Cys145). La capacità di riparazione di questa proteina è in rapporto 1 : 1, una molecola di *MGMT* è in grado di rimuovere una molecola alchilica. *MGMT* possiede la sua massima attività nei confronti di questo substrato ma può in realtà riparare una grande varietà di lesioni O₆-alchilanti compresi gli addotti etilici, cloretilici, piridilossobutilici, butilici e benzilici. In seguito al riparo del DNA e alla modificazione della Cys145, l'enzima subisce un cambiamento conformazionale che lo indirizza alla degradazione ubiquitina-dipendente. Un altro substrato di

MGMT con potere mutagenico è l' O_6 -metiltimina, anch'essa prodotta, in modo relativamente minore, dalle reazioni S_N1 [65].

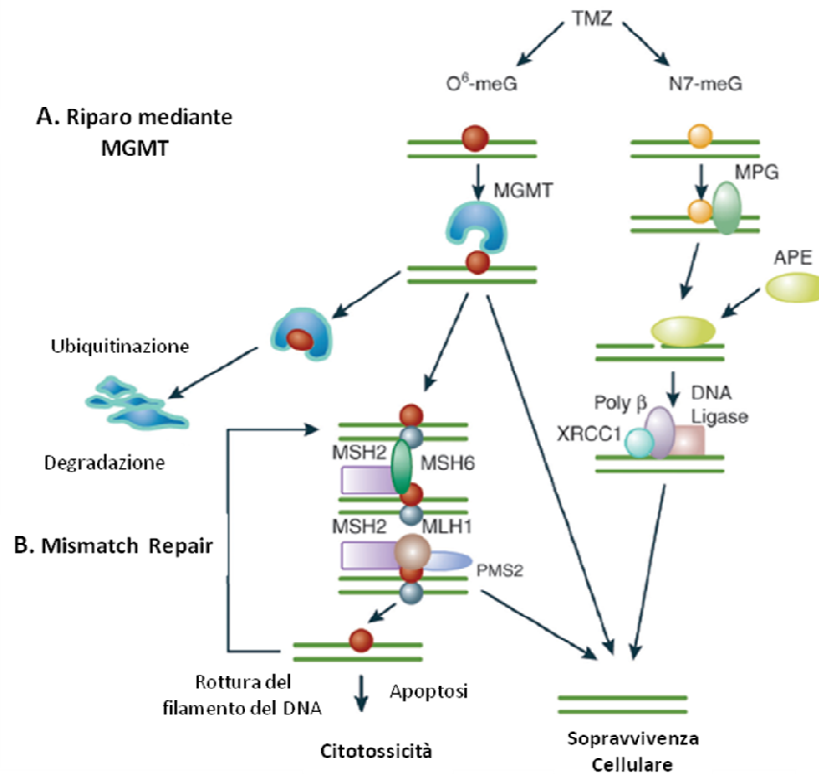


Figura 15 MGMT e riparo del DNA in seguito al danno causato dalla chemioterapia con agenti alchilanti. Il TMZ causa lesioni potenzialmente citotossiche sul DNA come l' O_6 -metilguanina e l' N_7 -metilguanina. MGMT rimuove gli addotti di O_6 -MeG attraverso il trasferimento covalente del gruppo alchilico al residuo altamente conservato di cisteina del sito attivo ristabilendo la normale guanina. In seguito a tale trasferimento, MGMT è inattivata e soggetta alla degradazione ubiquitina-dipendente. Gli addotti di O_6 -MeG sfuggiti alla riparazione, si appaiano alla timina durante la replicazione del DNA. Questo appaiamento errato viene riconosciuto dal sistema di riparazione del *mismatch* causando inutili cicli di riparo che portano alla morte cellulare. Gli addotti in posizione N_7 (>70% degli addotti del DNA formati dal TMZ) sono efficacemente riparati dal sistema BER (*base excision repair*) e normalmente contribuiscono in minor parte alla citotossicità del TMZ [66].

MGMT è ubiquitariamente espressa nei tessuti normali ma over-espressa in molte varietà di tumori. Le cellule tumorali infatti possiedono differenti meccanismi di resistenza agli agenti alchilanti, l'espressione di MGMT nei tumori conferisce un effetto protettivo contro la morte cellulare indotta dalla chemioterapia alchilante. Esiste quindi una forte correlazione tra l'espressione della proteina e la resistenza della terapia; le cellule tumorali esprimenti MGMT risultano 4-10 volte più resistenti al BCNU, al TMZ e ad altri composti [66].

Diversi studi hanno dimostrato che il silenziamento epigenetico di *MGMT*, mediante metilazione delle isole CpG del suo promotore, è un importante fattore prognostico nei pazienti con GBM, gliomi anaplastici o di basso grado (Fig. 16) [28; 67]. Pazienti affetti da GBM

che presentano ipermetilazione di *MGMT* possiedono un chiaro vantaggio dal trattamento con TMZ in aggiunta alla radioterapia *standard*, con una sopravvivenza media di 23,4 mesi in confronto ai 12,6 mesi dei pazienti senza tale alterazione epigenetica [68].

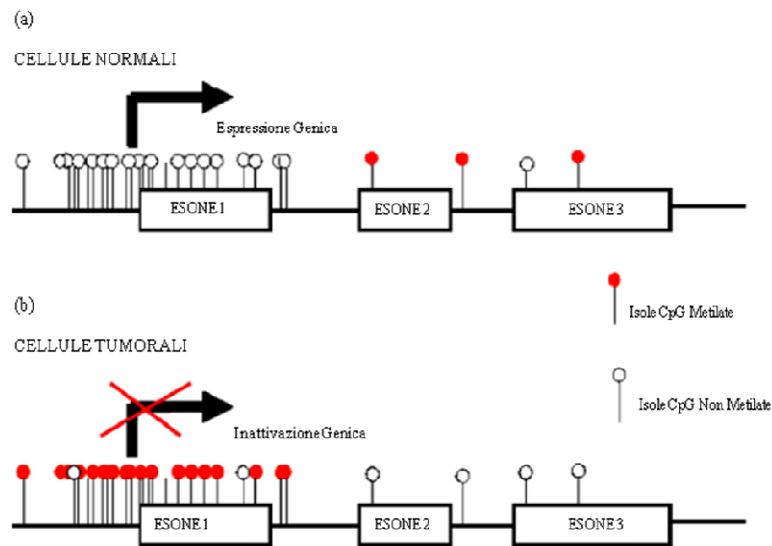


Figura 16 Rappresentazione tipica di un gene con le isole CpG. (a) Nelle cellule normali, la mancanza di metilazione delle isole CpG porta alla normale espressione del gene. (b) Nelle cellule tumorali, l'ipermetilazione delle isole CpG porta alla mancata espressione genica [69].

Amplificazione del gene EGFR

Il recettore per il fattore di crescita dell'epidermide (EGFR) è un recettore tirosina-chinasi che regola fondamentali processi cellulari di crescita e differenziamento. Il recettore è una glicoproteina transmembrana di 170 kDa sintetizzata come precursore di 160 kDa e successivamente N-glicosilata in 12 potenziali siti. Essa è costituita da un'unica catena polipeptidica di 1186 amminoacidi suddivisa in tre domini (Fig. 17):

- Dominio extracellulare (Esone 1-14);
- Dominio transmembrana lipofilico (Esone 15);
- Dominio intracellulare (Esone 16-26).

EGFR è in grado di legare sei differenti fattori: EGF (*epidermal growth factor*), TGF- α (*transforming growth factor α*), anfiregulina, betacellulina, epiregulina ed il fattore di legame dell'eparina EGF-like. Il legame con il ligando, al dominio extracellulare del recettore, causa un'alterazione tridimensionale della sua struttura con successiva dimerizzazione. Questo evento non è importante solo ai fini dell'attivazione dell'intrinseca attività tirosin-chinasica ma

anche per l'autofosforilazione di diversi residui di tirosina nel dominio C-terminale. Le tirosine autofosforilate rappresentano siti specifici di legame per differenti *target* citoplasmatici coinvolti nella via di segnalazione. Uno di questi bersagli è la fosfatidil-inositolo 3-chinasi (PI3K) che viene reclutata, in seguito ad attivazione di EGFR, in membrana. PI3K fosforila il fosfatidil-inositolo 4,5-bifosfato (PIP₂) al rispettivo 3-fosfato (PIP₃) che a sua volta attiva differenti proteine effettrici come AKT (proteina chinasi B) e mTOR (*target* mammifero della rapamicina). Il risultato di questa segnalazione è la proliferazione cellulare e l'aumento della sopravvivenza attraverso il blocco dell'apoptosi [70].

La delezione di *EGFR* negli embrioni di topo risulta letale e l'incremento della sua via di segnalazione è correlato a differenti tipologie tumorali. Le alterazioni oncogenetiche di EGFR nei tumori comprendono l'amplificazione del gene, i riarrangiamenti strutturali, l'over-espressione dei suoi ligandi da parte delle cellule tumorali o dello stroma circostante, e le mutazioni attivanti soprattutto a carico del dominio tirosin-chinasico [71].

L'amplificazione genica è un'alterazione presente in circa il 40% dei GBM primari mentre risulta essere rara in quelli secondari [16]. L'amplificazione di *EGFR* è spesso associata anche alla presenza di sue varianti di delezione. *EGFRvIII*, in particolare, è la variante più frequente di *EGFR*. Essa è il prodotto della delezione degli esoni 2-7 con fusione dell'esone 1 con l'esone 8 e la creazione, a livello delle giunzioni di *splicing* di un nuovo codone GGT (Gly). La proteina, di 145 kDa, manca quindi degli amminoacidi 6-273 e, nonostante la delezione, il recettore mutato viene correttamente indirizzato alla membrana cellulare. EGFRvIII non è in grado di legare EGF e gli altri ligandi ma è costituzionalmente fosforilata e quindi in grado di attivare la cascata di segnalazione (Fig.18) [72].

Negli oligodendrogliomi anaplastici l'amplificazione di *EGFR* così come altre alterazioni, tra cui la perdita del cromosoma 10q, è stata trovata essere inversamente correlata alla codelezione di 1p/19q ed associata ad una bassa sopravvivenza e scarsa sensibilità del tumore alla chemioterapia [22].

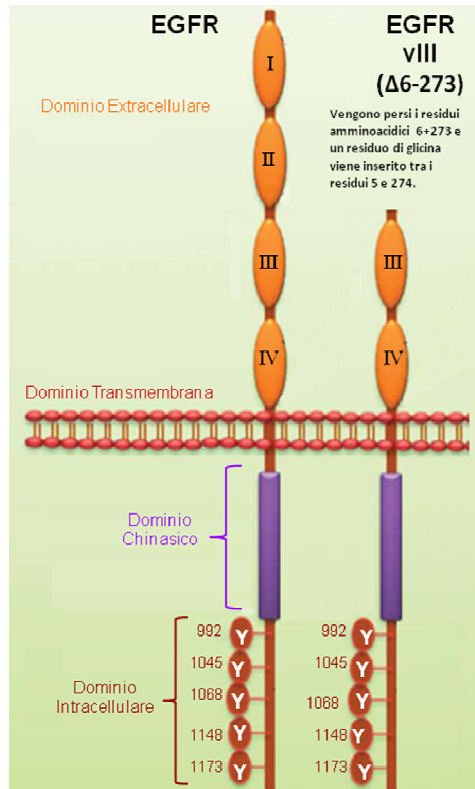


Figura 17 Rappresentazione grafica di EGFR e di EGFRvIII con i rispettivi domini strutturali. Il dominio III (aa 313-446) rappresenta il dominio di legame con il ligando [73].

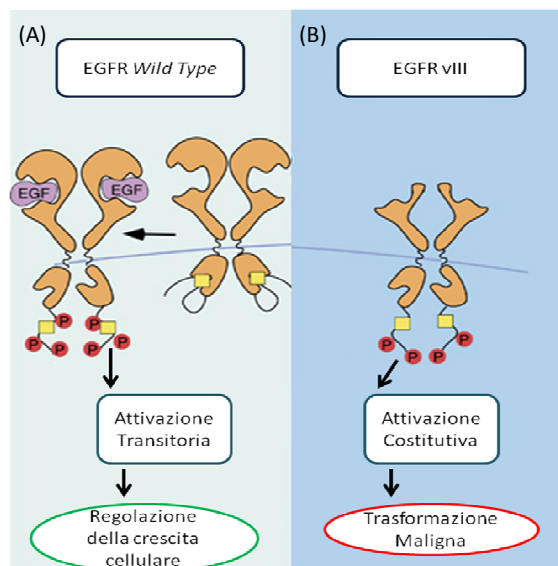


Figura 18 Comparazione della via di segnalazione del recettore EGFR *wild-type* (A) e di EGFRvIII (B). L'amplificazione genica porta ad un incremento del *pathway* fisiologico di EGFR [74].

Mutazioni del gene TP53

Il gene *TP53* (17p13.1) codifica per una proteina di 393 amminoacidi (circa 53 kDa), nota anche come “il guardiano del genoma”, con funzione di fattore di trascrizione e costituita da tre domini principali:

- Dominio di transattivazione N-terminale;
- Dominio centrale di legame con il DNA;
- Dominio di oligodimerizzazione C-terminale.

In condizioni normali la proteina p53 possiede un'emivita molto breve; la presenza di stimoli stressogeni, come ad esempio agenti dannosi per il DNA, modula l'attività di p53 e del suo principale regolatore, MDM2, attraverso l'induzione di diverse chinasi. MDM2 legando il dominio di transattivazione di p53, indirizza la proteina all'ubiquitinizzazione, attraverso l'inibizione della sua acetilazione, e favorendo la sua traslocazione citoplasmatica. Il gene *MDM2* è a sua volta un *target* trascrizionale di p53 andando ad indicare la presenza di un circuito regolatorio a *feedback*. La fosforilazione di specifici siti a livello del dominio di transattivazione di p53, causa una diminuita affinità della proteina per MDM2 e quindi la sua stabilizzazione con la formazione di un omotetramero.

La funzione oncosoppressiva di p53 dipende principalmente della sua abilità di bloccare la proliferazione cellulare in risposta agli stimoli di stress causati dalla progressione tumorale. L'attivazione di p53 promuove l'arresto del ciclo cellulare e l'induzione del processo apoptotico ma essa risulta anche coinvolta nei processi di differenziamento e senescenza.

Fisiologicamente p53 possiede inoltre un'attività inibitoria sull'angiogenesi tumorale e agisce direttamente sul riparo dei danni del DNA attraverso i meccanismi di riparo per escissione di nucleotidi e basi (Fig. 19) [75].

Allo stadio di astrocitoma di II grado, l'alterazione più frequentemente riscontrabile (60% dei casi), è la perdita di un allele a livello del *locus* contenente il gene *TP53* sul cromosoma 17p (17p13.1) e la mutazione, nella maggior parte dei casi, dell'allele rimanente [77]. Le mutazioni a carico del gene *TP53* sono significativamente più frequenti nei glioblastomi secondari (65%) rispetto a quelli primari (28%) mentre si riscontrano sporadicamente negli oligodendrogliomi [16].

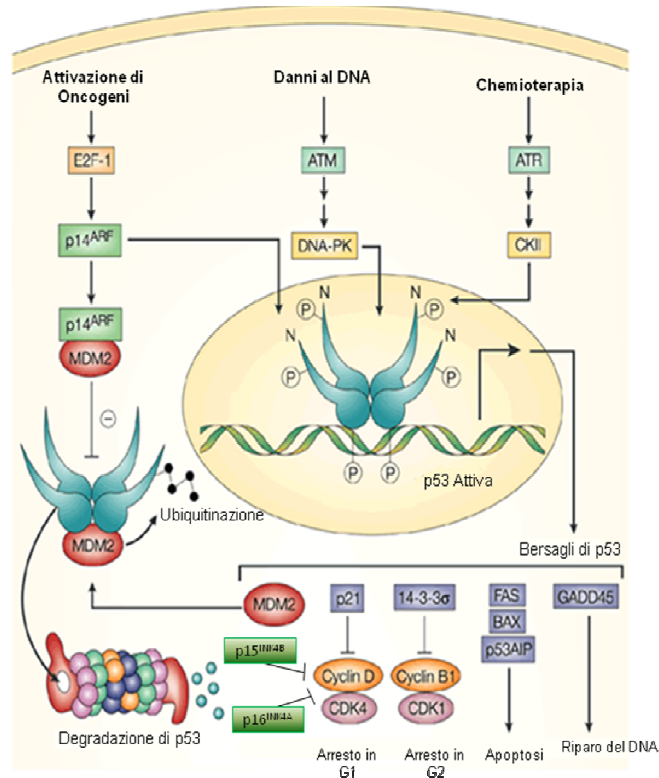


Figura 19 Meccanismi di attivazione di p53. Nelle cellule normali, la trascrizione p53-dipendente di *MDM2* promuove la degradazione di p53. Lo stress cellulare, come l'attivazione di oncogeni, stimola p14^{ARF} che sequestra MDM2. In aggiunta, i danni al DNA, compresi quelli causati dalla chemioterapia, attivano specifiche proteine chinasi, come ATM e ATR. Queste chinasi attivano a loro volta altre proteine chinasi, DNA-PK e CKII, che fosforilano rispettivamente le porzioni N- e C-terminali di p53 al fine d'inibire il suo legame con MDM2 ed incrementare la sua affinità per il DNA. Questi eventi provocano un incremento dei livelli di p53 e attivano la trascrizione dei suoi bersagli genici. Le proteine p21 e 14-3-3 σ promuovono l'arresto della crescita in fase G1 e G2. L'inibizione delle CDK4 e CDK6 avviene anche grazie all'opera delle proteine p16^{INK4A} e p15^{INK4B}. Le proteine FAS, BAX, p53AIP promuovono il processo apoptotico nel caso non fosse possibile la riparazione del DNA [76].

Delezione e metilazione dei loci *CDKN2A* e *CDKN2B*

Come il cromosoma 17p, anche il cromosoma 9p è frequentemente deletato nei gliomi di alto grado. All'interno della regione del braccio corto del cromosoma 9 sono localizzati i loci critici *CDKN2A* e *CDKN2B* (9p21). Il locus *CDKN2A* codifica per le proteine p14^{ARF} e p16^{INK4A} grazie ad una cornice di lettura alternativa. Il locus *CDKN2B* codifica invece per la sola proteina p15^{INK4B} (Fig. 20). La proteina p14^{ARF} antagonizza l'attività E3 ligasica di MDM2 favorendo la stabilizzazione di p53 e l'attivazione del suo programma trascrizionale [78]. La sua espressione viene regolata in modo indipendente dalla restante parte del locus *CDKN2A* attraverso uno specifico promotore. Le proteine p16^{INK4A} e p15^{INK4B} invece agiscono entrambe inibendo le chinasi ciclina D-dipendenti CDK4 e CDK6 attraverso l'inattivazione delle proteine della famiglia

RB (p130 e p107) con conseguente arresto del ciclo cellulare in fase G1. A differenza però di $p16^{INK4A}$, l'espressione di $p15^{INK4B}$ è regolata dal TGF β [79].

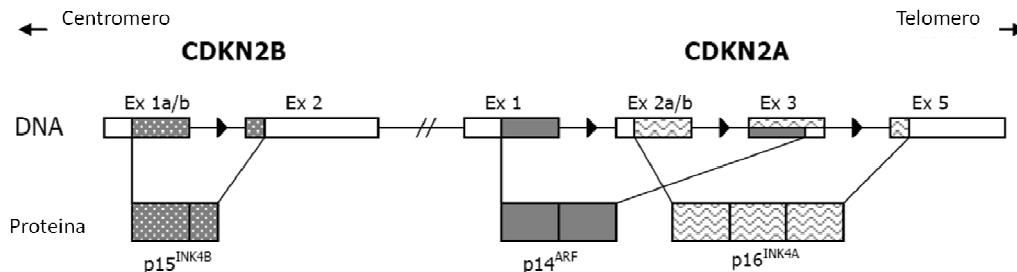


Figura 20 I loci CDKN2A e CDKN2B sul cromosoma 9p. Gli esoni (Ex) sono indicati da rettangoli colorati. I geni *INK4A* e *INK4B* codificano per gli inibitori, p16 e p15, delle chinasi ciclina D-dipendenti, CDK4 e CDK6. Il locus CDKN2A codifica per *splicing* alternativo per p14 (ARF) e p16 (INK4).

La perdita di espressione di $p14^{ARF}$ causata da delezioni o da metilazione del suo promotore è frequente nei GBM primari (50%) ed è presente in un terzo degli astrocitomi di basso grado [80]. Alterazioni della via di segnalazione di TP53/MDM2/ $p14^{ARF}$ sono presenti in circa il 50% dei GBM primari e nel 70% di quelli secondari [81]. Negli oligodendrogliomi invece alterazioni di questo *pathway*, e analogamente di $p15^{INK4B}$, sono presenti nel 21% degli oligodendrogliomi di II grado e nel 50% degli oligodendrogliomi anaplastici, indicando quindi un'associazione con la progressione tumorale [82]. Le delezioni del gene $p16^{INK4A}$ sono presenti nel 50% dei GBM primari e nel 40% di quelli secondari mentre, negli oligodendrogliomi risulta essere frequente nei III gradi (65%) e rara nei II gradi [83; 84]. L'ipermetilazione dei promotori di $p16^{INK4A}$ e $p14^{ARF}$ risultano essere più frequenti rispetto alle loro delezioni (rispettivamente 69% e 38% dei casi) mentre il silenziamento epigenetico di $p15^{INK4B}$ è meno frequente e spesso associato alla progressione anaplastica [84].

Metilazione del promotore del gene EMP3

La presenza della co-delezione di 1p/19q come alterazione ricorrente negli oligodendrogliomi ha portato ad ipotizzare l'esistenza di geni oncosoppressori, localizzati in queste regioni cromosomiche, con un ruolo importante nel processo di gliomagenesi. Uno di questi geni, candidati per il cromosoma 19, è *EMP3* (19q13.32).

La famiglia genica *TMP*, codificante per un gruppo di proteine di membrana, comprende quattro elementi principali, *PMP22*, *EMP1* (*TMP*), *EMP2* (*XMP*), *EMP3* (*YMP*), e un elemento

più distante, *MP20*. La sequenza amminoacidica delle proteine codificate da questa famiglia presenta un'omologia variabile dal 33-43% [85].

L'elemento meglio caratterizzato di questa famiglia è la proteina PMP22. Essa rappresenta il maggior componente della mielina ed è principalmente prodotta dalle cellule di *Schwann*. PMP22 è espressa ad elevati livelli nei nervi periferici, dove gioca un ruolo cruciale in molti processi fisiologici e patologici del sistema nervoso periferico. Alterazioni del gene *PMP22*, comprese duplicazioni, delezioni, mutazioni puntiformi, sono responsabili di diverse neuropatie ereditarie come la sindrome di *Charcot-Marie-Tooth* di tipo 1A, la sindrome di *Déjèrine-Sottas* e la neuropatia tomaculare (HNPP).

La funzione del prodotto del gene *EMP3* rimane ancora poco conosciuta. Il gene codifica per una proteina di 163 amminoacidi (18 kDa) costituita da quattro domini transmembrana e due siti di N-glicosilazione nel dominio extra-cellulare. Data l'alta omologia di sequenza con *PMP22*, si ritiene che *EMP3* sia coinvolto nella proliferazione cellulare e nelle interazioni cellula-cellula.

Il silenziamento di *EMP3* mediante ipermetilazione delle isole CpG del suo promotore è stato osservato con una frequenza del 24% inizialmente nei neuroblastomi e successivamente nei gliomi (39%) [86]. Tuttavia la frequenza di tale alterazione e il suo significato in ambito prognostico, diagnostico o predittivo rimane controverso. Kunitz *et al.* hanno riscontrato l'ipermetilazione di *EMP3* con alta frequenza nei tumori oligodendrogliali con un'associazione statisticamente significativa con la perdita allelica del cromosoma 19q e una ridotta espressione a livello del mRNA per cui ne hanno ipotizzato un possibile ruolo prognostico positivo [87]. Li *et al.* invece non hanno riscontrato nessuna correlazione tra l'ipermetilazione del gene, l'espressione della proteina e la delezione del *locus* 19q13 [88]. Per quanto riguarda il ruolo prognostico, Alaminos *et al.* hanno descritto l'ipermetilazione del promotore di *EMP3* come marcatore negativo nei pazienti affetti da neuroblastoma [86].

2 Materiali e Metodi

CASISTICA

In questo studio è stata analizzata una casistica di 139 gliomi (Tab. 2). La diagnosi di glioma è stata effettuata su sezioni di tessuto cerebrale fissato in formalina tamponata (4%) ed incluso in paraffina (*Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE*), previa colorazione con ematossilina ed eosina (H&E), in accordo con le linee guida WHO [2].

ISTOTIPO	GRADO WHO	PAZIENTI (n°)	GENERE (M - F)	ETA' MEDIA DI INSORGENZA E RANGE
Oligodendroglioma	II	57	30 M - 27 F	48 (27 - 79)
Oligodendroglioma Anaplastico	III	36	21 M - 15 F	55 (31 - 80)
Oligoastrocitoma	II	12	9 M - 3 F	42 (31 - 63)
Oligoastrocitoma Anaplastico	III	8	4 M - 4 F	51 (37 - 71)
Astrocitoma Diffuso e Gemistocitico	II	16	7 M - 9 F	41 (13 - 60)
Astrocitoma anaplastico	III	10	6 M - 4 F	58 (38 - 84)

Tabella 2 Tabella demografica dei 139 gliomi inclusi in questo studio.

I pazienti, operati presso la Divisione di Neurochirurgia dell'Ospedale "Molinette" di Torino, dell'Ospedale "Santa Croce e Carle" di Cuneo, della Clinica Eporediese di Ivrea (Policlinico di Monza) o provenienti dalla Divisione di Anatomia Patologica dell'Ospedale "Maggiore della Carità" di Novara e dal Servizio di Radioterapia del Policlinico di Monza, hanno firmato un consenso informato.

Il DNA costitutivo dei pazienti, dove possibile, è stato ottenuto da prelievi ematici in EDTA o da saliva prelevata a digiuno.

STRATIFICAZIONE DEGLI OLIGODENDROGLIOMI (II E III GRADO)

I 97 pazienti affetti da oligodendroglioma sono stati stratificati secondo l'eventuale avvenuta somministrazione dei trattamenti di radio- e chemioterapia.

Dei 57 pazienti con oligodendroglioma di II grado, 12 sono stati sottoposti sia a radio- che a chemioterapia con TMZ (9/12), TMZ + PCV (1/12), PCV (1/12) e fotemustina (1/12), mentre 4 pazienti hanno beneficiato della sola radioterapia. La sola chemioterapia con TMZ è stata somministrata a 9 pazienti; 1 solo paziente ha invece assunto il trattamento combinato TMZ + PCV mentre 6 pazienti non hanno ricevuto terapie.

Dei 36 pazienti con oligodendroglioma di III grado, 15 sono stati sottoposti sia a radio- che a chemioterapia con TMZ (12/15) e TMZ + PCV (3/15), 1 paziente ha beneficiato della sola radioterapia mentre 3 pazienti non hanno ricevuto alcun tipo di trattamento.

Per 42 casi (25 di II grado e 17 di III grado) non sono state reperite informazioni cliniche oppure i pazienti sono stati persi al *follow-up*.

INDAGINI IMMUNOISTOCHIMICHE

La valutazione dell'indice proliferativo Ki-67 (clone MIB.1) e dell'espressione della proteina acida gliofibrillare (GFAP) è stata effettuata con metodiche di immunistochemica su sezioni di tessuto FFPE dello spessore di 4 µm. L'indagine è stata effettuata mediante lo strumento BenchMarck® (Ventana Medical System Inc., Tucson, AZ, USA) con il sistema di rilevazione *UltraView Universal DAB Detection Kit*. Gli anticorpi impiegati sono riportati in tabella 3. Per la valutazione del Ki-67, lo smascheramento è stato eseguito con Tris/EDTA pH 8.0.

ANTICORPO	SPECIE	DILUIZIONE	CODICE	DITTA
Ki-67 (MIB.1)	Mouse	1:100	M7240	DakoCytomation
GFAP	Mouse	1:200	M0761	DakoCytomation

Tabella 3 Anticorpi impiegati per le indagini di immunistochemica (DakoCytomation S/A, Glostrup, Danimarca).

GENETICA MOLECOLARE

Sono state selezionate, mediante micro-carotaggio dei blocchetti FFPE, le aree tumorali, precedentemente identificate come proliferanti dalla colorazione H&E e dalle indagini microscopiche. Il DNA genomico tumorale è stato ottenuto da tali prelievi attraverso un protocollo di estrazione *standard* con fenolo-cloroformio.

Il DNA costitutivo dei pazienti, dove disponibile, è stato estratto da prelievo ematico in EDTA, mediante il *QIAamp DNA Blood Midi Kit* (Qiagen GmbH, Hamburg, Germany) o la metodica del *salting-out*, o da saliva mediante l'*Oragene DNA OG-500 Kit* (DNA Genotek Inc., Kanata, ON, Canada).

MLPA® E METHYLATION SPECIFIC-MLPA®

Principi

L'MLPA® è una tecnica di PCR *multiplex* che permette l'analisi quantitativa fino ad un massimo di 50 differenti *loci* le cui sequenze vengono simultaneamente amplificate in un'unica reazione [39]. In questa reazione, non sono le sequenze *target* del DNA genomico in esame ad essere amplificate, bensì le sonde ibrydate complementari a tali sequenze (Fig. 21).

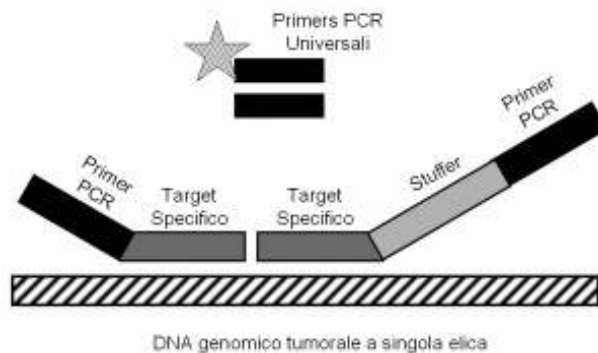


Figura 21 Complesso sonda-DNA. Ciascuna sonda è composta da due oligonucleotidi. Le sonde si ibridano al DNA genomico denaturato e solo quelle correttamente appaiate verranno legate, a formare un unico frammento, mediante una reazione ligasica. Le sequenze esterne della sonda sono complementari alla coppia di *primers* universali marcati (*forward*) con un fluorocromo. La sequenza *stuffer* permette la discriminazione dei *loci* analizzati per peso molecolare [89].

La reazione di MLPA® può essere suddivisa in quattro fasi:

1. Denaturazione del DNA e ibridazione delle sonde;
2. Reazione ligasica;
3. Reazione di PCR;
4. Elettroforesi capillare.

La *Methylation Specific-MLPA* (MS-MLPA®) è un variante della metodica MLPA® in cui l'analisi del numero di copie è combinata a quella del profilo di metilazione mediante l'impiego di un enzima di restrizione metilazione-specifica (Fig. 22). Il protocollo di MS-MLPA® differisce da una canonica reazione di MLPA® per la generazione di due campioni distinti per ogni caso analizzato: un campione è destinato all'analisi di *copy number* mentre l'altro viene sottoposto a digestione, mediante l'enzima di restrizione, per la valutazione dello stato di metilazione. Alcune delle sonde impiegate in questa reazione contengono infatti un sito di restrizione per l'endonucleasi metilazione-specifica HhaI. Gli ibridi formati dalle sonde e dal DNA *target* non

metilato vengono digerite da tale enzima. Le sonde digerite non possono essere amplificate nella reazione di PCR e non produrranno segnale durante l'elettroforesi capillare. In contrasto, se il campione di DNA è metilato, l'ibrido sonda-DNA è protetto dalla digestione enzimatica e genererà un picco [90].

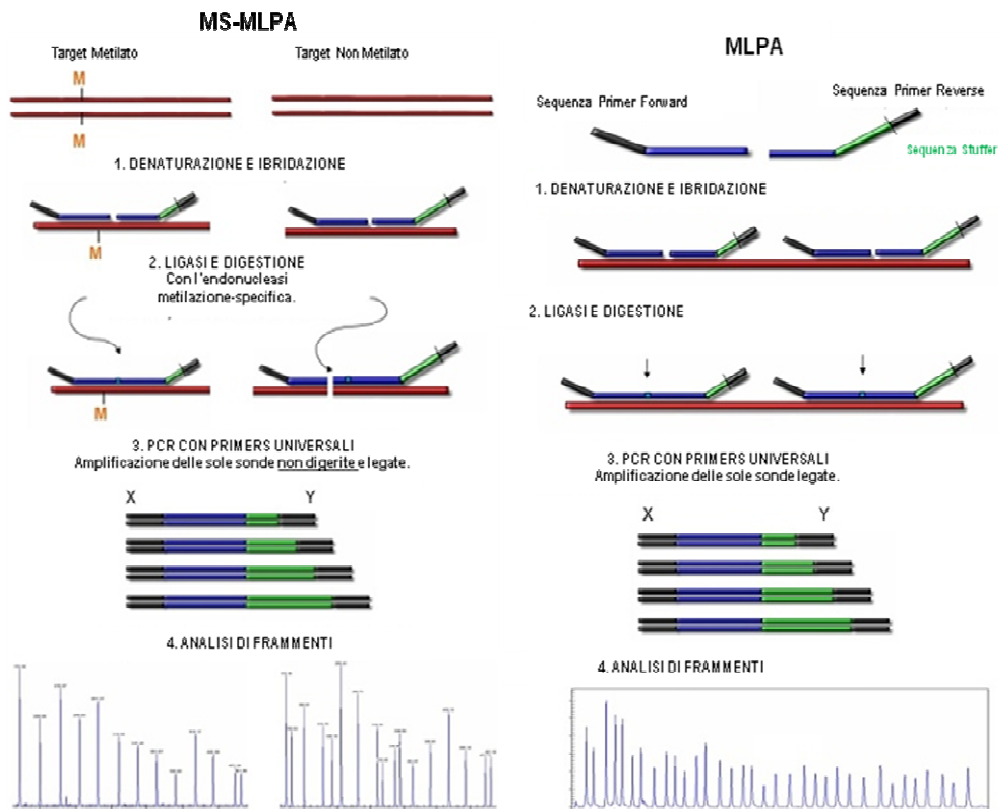


Figura 22 Confronto tra le metodiche MS-MLPA[®] e MLPA[®]. Successivamente alla fase d'ibridazione, il campione sottoposto a MS-MLPA[®] viene diviso: metà viene destinato alla reazione ligasica e all'analisi di *copy number*, l'altra metà viene sottoposta all'azione combinata della ligasi e dell'enzima di restrizione per la valutazione dello stato di metilazione.

Protocollo di MLPA[®]

La valutazione dello stato dei cromosomi 1p e 19q è stata effettuata mediante il kit SALSA P088-B1 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). Ogni kit di MLPA[®] contiene 9 sonde per il controllo di qualità della reazione (concentrazione di DNA, denaturazione, reazione ligasica) tra cui due sonde specifiche per la discriminazione del sesso del campione in esame. La reazione ha permesso di valutare 18 differenti *loci* sul cromosoma 1 e 10 *loci* sul cromosoma 19 (Tab. 4). Nel kit impiegato, sono inoltre presenti 14 sonde di riferimento localizzate su cromosomi diversi dall'1 e dal 19.

a) GENE	POSIZIONE SUL CROMOSOMA	PM (nt)	b) GENE	POSIZIONE SUL CROMOSOMA	PM (nt)
TNFRSF4	1p36	391	SMARCA4	19p13.2	142
GNB1	1p36.33	178	LDLR	19p13.3	211
TNFRSF14	1p36.32	346	CENTROMERO		
TP73	1p36.3	328	CCNE1	19q12	166
PARK7	1p36.23	454	PDCD5	19q12-q13.1	184
MFN2	1p36.22	400	UPK1A	19q13.13	238
PTAFR	1p35.3	320	TGFB1	19q13.1	364
FAF1	1p33	283	ZNF342	19q13.32	409
PPAP2B	1p32.2	160	PPP1R15A	19q13.2	220
CYP2J2	1p32.1	337	BAX	19q13.3-q13.4	301
LPHN2	1p31.1	274	CHMP2A	19q13.13.43	266
GTF2B	1p22.2	256			
DPYD	1p22	373			
NRAS	1p13.2	472			
NOTCH2	1p12	130			
CENTROMERO					
LMNA	1q22	310			
CRB	1q31.3	427			
TNNT2	1q32.1	190			

Tabelle 4 Sonde specifiche per il cromosoma 1 (a) e 19 (b) per l'analisi dello stato di delezione. PM (peso molecolare).

Per la reazione di MLPA[®] sono state utilizzate concentrazioni di DNA variabili (100-500 ng) a seconda della qualità del campione preso in esame.

I campioni sono stati denaturati per 10 minuti a 98°C e quindi raffreddati a 25°C per l'aggiunta delle sonde (Tab. 5).

PROBE MIX	QUANTITA'
SALSA Probe Mix	1,5 µL
MLPA[®] Buffer	1,5 µL
Vol. Finale	3 µL

Tabella 5 Reagenti e volumi necessari per la fase d'ibridazione delle sonde al DNA genomico.

Le sonde e il DNA genomico sono stati denaturati a 95°C per 1 minuto; l'ibridazione è stata successivamente condotta a 60°C *overnight* (almeno 16 ore).

Il giorno seguente si è proceduto alla reazione di ligasi che è stata condotta a 54°C per 15 minuti seguiti da 5 minuti a 98°C per la disattivazione dell'enzima (Tab. 6).

La reazione di PCR *multiplex* è stata effettuata mediante le condizioni ed il protocollo termico illustrati nelle tabelle 7.

LIGASE MIX	QUANTITA'
Ligase Buffer A	3 µL
Ligase Buffer B	3 µL
Ligase-65	1 µL
H₂O	25 µL
Vol. Finale	32 µL

Tabella 6 Reagenti richiesti per la reazione ligasica

A) POLYMERASE MIX	QUANTITA'
SALSA Primers	2 µL
SALSA Polymerase	0,5 µL
H₂O	7,5 µL
Vol. Finale	10 µL

B) FASE	TEMPO	TEMPERATURA	
Denaturazione	30 Secondi	95°C	
<i>Annealing</i>	30 Secondi	60°C	35 CICLI
Estensione	60 Secondi	72°C	
Estensione Finale	20 Minuti	72°C	

Tabella 7 Reagenti per la reazione di PCR *multiplex* (A) e profilo termico per l'amplificazione dei frammenti generati dalle sonde ibridate e legate (B).

I prodotti ottenuti dalla reazione di MLPA[®] sono stati separati per elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ABI[®] 3130 *Genetic Analyzer* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). Gli elettroferogrammi risultanti sono stati analizzati in primo luogo mediante il programma *Gene Mapper ID*[®] versione 4.0 (Life Technologies).

Variazione del protocollo per l'MS-MLPA[®]

La valutazione dello stato del cromosoma 9p è stata effettuata mediante il *kit* SALSA ME-024-B1 (MRC-Holland). Il *kit* ha permesso l'analisi, oltre che dei *loci* *CDKN2A* e *CDKN2B*, anche della regioni a monte e a valle al fine di stabilire in modo più accurato possibile l'estensione della delezione (Tab. 8).

GENE	POSIZIONE	POSIZIONE SUL CROMOSOMA	PM (nt)		
DOCK8	Esone 24	9p24.3	319		
GLDC	Esone 20	9p24.1	337		
MLLT3	Esone 7	9p21.3	166		
KLHL9	Esone 1	9p21.3	363		
MIR31	Esone 1 (44nt a valle)	9p21.3	465		
	Esone 1 (58-57)	9p21.3	382		
MTAP	Esone 6	9p21.3	310		
	Esone 7	9p21.3	290		
CDKN2A	p16^{INK4A}	Esone 5 (182nt a valle)	9p21.3	262	
		Esone 5 (33nt a monte)	9p21.3	274	
		Esone 3 (45nt a monte)	9p21.3	256	
	Promotore di p16^{INK4A}	Esone 2a (128nt a valle di ATG) +	9p21.3	237	
		Esone 2a (205-206)	9p21.3	391	
		Esone 2a (138-139)	9p21.3	243	
		Esone 2a (102nt a monte) +	9p21.3	171	
	p14^{ARF}	Esone 2a (6329nt a monte)	9p21.3	148	
		Introne 1 (6388nt a monte dell'esone 1)	9p21.3	355	
		Introne 1 (4609nt a valle dell'esone 1)	9p21.3	472	
	Promotore di p14^{ARF}	Esone 1 (85nt a monte di ATG) +	9p21.3	427	
		Esone 1 (762nt a monte) +	9p21.3	136	
		Esone 1 (829nt a monte) +	9p21.3	157	
		Esone 1 (1022nt a monte)	9p21.3	268	
	CDKN2B	CDKN2B-AS1	Esone 1 (32-33) +	9p21.3	182
			Esone 1 (210-211)	9p21.3	178
p15^{INK4B}		Esone 2 (2341nt a valle)	9p21.3	454	
		Esone 2 (1030-1031)	9p21.3	229	
Promotore di p15^{INK4B}		Esone 1b (99nt a valle di ATG) +	9p21.3	210	
		Esone 1b (34nt a valle di ATG) +	9p21.3	130	
		Esone 1b (10nt a valle di ATG) +	9p21.3	220	
		Esone 1b (83nt a monte dell'esone 1)	9p21.3	199	
		Esone 1b (155nt a monte dell'esone 1) +	9p21.3	417	
PAX5		Esone 5	9p13.2	281	
	Esone 5	9p13.2	400		

Tabella 8 Sonde specifiche per il cromosoma 9p. Oltre ai *loci CDKN2A/2B* sono stati analizzati anche alcuni geni a monte e a valle dei *loci* d'interesse. (+) Sonde contenenti il sito di restrizione per l'enzima metilazione-sensibile HhaI. PM (peso molecolare).

Il protocollo di MS-MLPA[®] è identico a quello di una normale reazione di MLPA[®] ad esclusione della fase comprendente la reazione ligasica. Terminata la fase d'ibridazione delle sonde, è stato aggiunto ad ogni campione il primo tampone di ligasi (Tab. 9). A questo punto il campione è stato diviso a metà rispettivamente per la reazione ligasica e di digestione con l'enzima HhaI (Promega Corporation, Madison, WI, USA) (Tab. 10 e 11). Entrambe le reazioni sono state condotte a 48°C per 30 minuti seguiti da 5 minuti a 95°C per la disattivazione dell'enzima.

TAMPONE A	QUANTITA'
<i>Ligase Buffer A</i>	3 µL
H ₂ O	10 µL
Vol. Finale	13 µL

Tabella 9 Reagenti richiesti prima della divisione del campione in esame.

LIGASE MIX	QUANTITA'
<i>Ligase Buffer B</i>	1,5 µL
<i>Ligase-65</i>	0,25 µL
H ₂ O	8,25 µL
Vol. Finale	10 µL

Tabella 10 Reagenti per la reazione ligasica.

LIGASE DIGESTION MIX	QUANTITA'
<i>Ligase Buffer B</i>	1,5 µL
HhaI	0,5 µL
<i>Ligase-65</i>	0,25 µL
H ₂ O	7,75 µL
Vol. Finale	10 µL

Tabella 11 Reagenti per la reazione accoppiata di digestione con l'endonucleasi HhaI (10 U/µL) e di ligasi.

Analisi e normalizzazione dei dati mediante Coffalyser®

La normalizzazione dei dati ottenuti dalle reazioni di MLPA® è essenziale al fine di minimizzare le variazioni procedurali che possono causare differenze quantitative nel risultato. Per l'attuazione di questa fase, sono stati inclusi in ogni esperimento tre campioni di tessuto sano di riferimento.

La normalizzazione dei dati ottenuti mediante l'analisi al sequenziatore è stata effettuata mediante l'ausilio del programma MRC-Coffalyser® versione 9.4 (MRC-Holland) scaricabile gratuitamente da *internet* (<http://old.mlpa.com/coffalyser>). Tale programma, basato su fogli di lavoro di *Microsoft Excel®* (Microsoft Corporation), è in grado di normalizzare i dati ottenuti dalle reazioni di MLPA® e di analizzarli statisticamente e graficamente. Per quanto riguarda l'analisi di *copy number*, il programma inizialmente effettua una normalizzazione intra-campione in cui i picchi generati dalle singole sonde vengono rapportati ai picchi generati dalle singole sonde di riferimento all'interno dello stesso campione, generando una costante di normalizzazione data dalla media dei rapporti ottenuti per ogni sonda. Successivamente è stata effettuata una normalizzazione inter-campione in cui la costante di normalizzazione per ogni sonda del campione in esame è stata rapportata alla costante di normalizzazione media ottenuta dai campioni di riferimento. I valori di predizione per l'interpretazione del risultato sono illustrati in tabella 12.

VALORE	PREDIZIONE
$X < 0,2$	Delezione in Omozigosi
$0,2 < X < 0,75$	Delezione in Eterozigosi
$0,75 < X < 1,4$	Normalità
$1,4 < X < 2,3$	Guadagno
$X > 2,3$	Amplificazione

Tabella 12 Predizione per i valori generati dai dati di MLPA® normalizzati per l'analisi di *copy number*. X è il valore del dato normalizzato (media di due replicati).

Lo stato di metilazione di ogni sonda di MS-MLPA® è stato calcolato rapportando la costante di normalizzazione di ogni sonda del campione, digerito dall'endonucleasi, alla costante di normalizzazione della medesima sonda del campione non-digerito. Il valore di tale rapporto moltiplicato per 100 ha espresso una stima della percentuale di metilazione. È stato considerato come stato di metilazione aberrante la presenza di sonde con una metilazione >10%, confrontando i campioni in esame con i campioni di tessuto sano di riferimento [90].

MODIFICAZIONE DEL DNA CON BISOLFITO DI SODIO

L'analisi dello stato di metilazione dei promotori dei geni *MGMT* ed *EMP3* ha richiesto la modificazione del DNA genomico tumorale mediante bisolfito di sodio. Il bisolfito reagisce con le citosine del filamento di DNA a singola elica che vengono così convertite in uracile per deaminazione ossidativa, mentre le 5-metilcitosine (5-mC) rimangono intatte perché protette dalla reazione (Fig. 23).

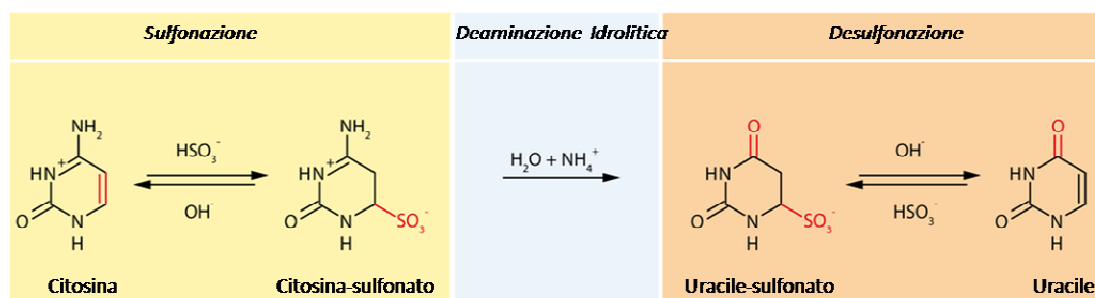


Figura 23 Modificazione chimica delle citosine del DNA mediante bisolfito [91].

La modificazione chimica del DNA, mediante il *MethylEasy™ Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification kit* (Human Genetics Signatures Pty Ltd, Sydney, NSW, Australia), è stata

effettuata su 1 µg di DNA genomico denaturato con NaOH 3M e successivamente incubato con bisolfito di sodio 3M.

In ogni esperimento di modificazione, e quindi anche di analisi di metilazione, sono stati inclusi due controlli interni di reazione:

- C+, controllo positivo di metilazione rappresentato dal DNA universalmente metilato CpGenome™ *Universal Methylated DNA* (Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA);
- C1, controllo negativo di metilazione rappresentato da un DNA linfocitario normale.

PCR METILAZIONE-SPECIFICA (MSP)

In seguito alla modificazione chimica del DNA ad opera del bisolfito di sodio, si generano sequenze nucleotidiche che differiscono per la presenza di uracile al posto delle citosine non metilate. Le sequenze di DNA possono quindi essere distinte mediante amplificazione, in una reazione di PCR, attraverso due coppie di *primers* specifiche rispettivamente per la sequenza metilata e non-metilata (Fig. 24). Le stesse sequenze dei *primers* infatti differiscono per la presenza di basi in grado di appaiarsi correttamente alle citosine metilate o a quelle non-metilate, quindi all'uracile, permettendo così la discriminazione in base al profilo di metilazione.

L'analisi dello stato di metilazione dei promotori dei geni *MGMT* ed *EMP3* è stata eseguita come già descritto rispettivamente da Esteller *et al.* [93] e Alaminos *et al.* [86]. Le coppie di *primers* impiegate sono riportate in Tab. 13 (Fig. 25). Entrambe le coppie sono marcate al 5' del *primer forward* con il fluorocromo 6-FAM™.

Ogni campione di DNA genomico modificato è stato amplificato separatamente con le coppie di *primers* specifiche per le sequenze metilate e non metilate secondo le condizioni riportate nelle tabelle 14.

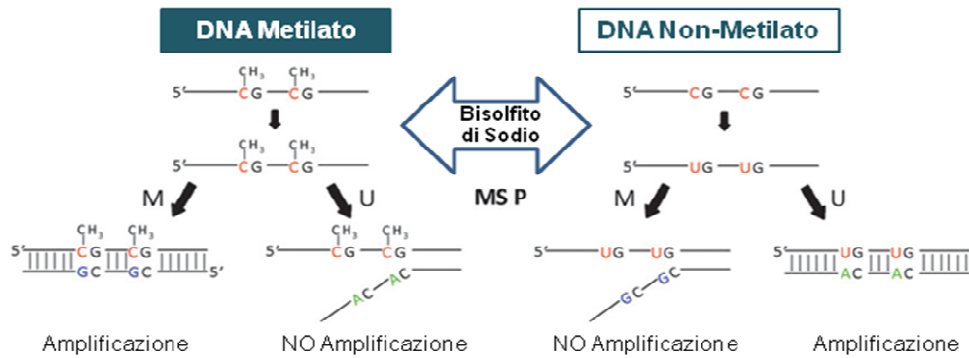


Figura 24 Principio della PCR metilazione-specifica (MSP). Il DNA genomico viene modificato con il bisolfito di sodio che converte le citosine non metilate in uracile, mentre le citosine metilate rimangono inalterate. I primers metilazione-specifici (M) possono amplificare solo le sequenze metilate. I primers specifici per le sequenze non metilate (U) possono amplificare solo le sequenze non metilate [92].

PRIMERS	SEQUENZA	TAGLIA FRAMMENTO
MGMT-M F	TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC	81 bp
MGMT-M R	GCACTCTTCCGAAAACGAAACG	
MGMT-U F	TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT	93 bp
MGMT-U R	AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA	
EMP3-M F	GACGTAGAAGGAGAGCGAGC	148 bp
EMP3-M R	CCTCGCTCGAACCTCCGTA	
EMP3-U F	GAAGAGATGTAGAAGGAGAGTGAGT	157 bp
EMP3-U R	CTTATCCCTCACTCAAACCTCCATA	

Tabella 13 Sequenze delle coppie di primers impiegate nelle reazioni di MSP.

131,265,404 tgggtctcgc cccgtctctag accccgcccc acgcccgcct ccccgtgccc a) **MGMT**

131,265,454 ctcggccccg cccccgcc ccggatATGC TGGGACAGCC CGCGCCCTA Esone 1

131,265,504 GAACCGCTTTG CGTCCCGAG CCCGCAGGTC CTCGCGGTGC GCACCGTTG

131,265,554 CGACTTGGTG AGTGTCTGGG TCCGCTCGCT CCCGGAAGAG TGCGGAGCTC Introne 1

131,265,604 TCCCTCGGGA CGGTGGCAGC CTCGAGTGGT CCTGCAGGCG CCCTCACTTC

48,828,579 tgggtttata aaaggtcag tatatattga gaggaggaga gaaagagaaa b) **EMP3**

48,828,629 cgaggcaag agagaaggag gcccagacag tgaggcagc agggagagaa Esone 1

48,828,679 gagacgcaga aggagagcga gcgagagaga aaggattctg gattgagag

48,828,729 gagagcaag gagggagaa gagcagtaga gagcagggg cctcaggag

48,828,779 gtgaaaggag gagggagaa gagcagcag gagcagggg gagcagggg

48,828,829 agactccgac tccagctctg acttttttcg cggtctcga taagttcca Introne 1

48,828,879 gtccggttatt cagggctggg acttcttaaat ttacttggga atgtagcaqt

Figura 25 Posizione dei primers forward e reverse corrispondenti rispettivamente alle sequenze metilate (sottolineate in rosso) e non metilate (evidenziate in giallo) per i geni *MGMT* (a) (sequenza GenBank NM_002412) e *EMP3* (b) (sequenza GenBank NM_001425). Sulle sequenze sono evidenziate in verde le regioni 5'-UTR, in nero le sequenze esoniche e in grigio le sequenze introniche. Le isole CpG sono sottolineate ed evidenziate dal colore azzurro.

A) REAGENTE	CONCENTRAZIONE
<i>Buffer 360 (10 X)</i>	1 X
<i>Primers M/U (2 µM)</i>	0,4 µM
MgCl₂ (25 mM)	2 mM
dNTP_s (2.5 mM)	0,2 mM
AmpliTaq Gold 360™ (5 U/µL)	1 U
DNA modificato	100 ng
<i>Enhancer</i>	0,5 µL
H₂O	q.b.
Vol. Finale	10 µL

B) FASE	TEMPO	TEMPERATURA	
Attivazione	5 Minuti	95°C	
Denaturazione	30 Secondi	95°C	
<i>Annealing</i>	30 Secondi	59°C	35 CICLI
Estensione	30 Secondi	72°C	
Estensione Finale	30 Minuti	72°C	

Tabella 14 Reagenti per la reazione MSP (A) e profilo termico per l'amplificazione dei frammenti dalle coppie di primers M e U (B). AmpliTaq Gold 360™ (Life Technologies).

I prodotti di amplificazione delle reazioni di MSP sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 3% insieme al marcatore di peso molecolare BenchTop® 100bp DNA Ladder (100-1500 bp) (Promega Corporation) mediante il programma AlphaDigiDoc RT® (ProteinSimple Inc., Santa Clara, CA, USA). La visualizzazione degli ampliconi è stato un passaggio fondamentale in quanto ha permesso di valutare:

- La corretta riuscita della modificazione chimica mediante la valutazione dell'amplificazione dei controlli di reazione (C+, C1);
- La presenza di eventuali contaminazioni mediante la valutazione del controllo negativo di PCR (C neg);
- La valutazione dell'intensità delle bande di ogni frammento al fine di stabilire la diluizione ottimale per il caricamento al sequenziatore.

Analisi dei prodotti di MSP mediante elettroforesi capillare

I frammenti amplificati mediante MSP sono stati sottoposti a separazione elettroforetica capillare su sequenziatore automatico ABI® 3130 *Genetic Analyzer*. Gli elettroferogrammi risultanti sono stati analizzati mediante il programma *Gene Mapper ID*® versione 4.0.

Per la quantificazione dello stato di metilazione è stato calcolato il rapporto tra le altezze dei picchi degli alleli metilato e non metilato. Valori di questo rapporto superiori o uguali a 0,1 sono stati considerati evidenza di uno stato di metilazione dei promotori dei geni *MGMT* ed *EMP3* (media di due replicati) [94].

ANALISI DELLO STATO DI AMPLIFICAZIONE DEL GENE *EGFR*

La valutazione dello stato di amplificazione del gene *EGFR* è stata effettuata mediante co-amplificazione, in una normale reazione di PCR, di un frammento del gene *EGFR* (sequenza GenBank NM_005228) e di un frammento del gene *IFN- γ* (sequenza GenBank NM_000619), impiegato come gene *housekeeping* di riferimento (Tab. 15; 16).

PRIMERS	SEQUENZA	TAGLIA FRAMMENTO
EGFR F	AGCCATGCCCGCATTAGCTC	110 bp
EGFR R	AAAGGAATGCAACTCCCAA	
IFN-γ F	GCAGAGCCAAATTGTCTCT	85 bp
IFN-γ R	GGTCTCCCACTCTTTGGA	

Tabella 15 Sequenze delle coppie di *primers* impiegati per la valutazione dello stato di amplificazione del gene *EGFR*. Entrambe le coppie di *primers* sono marcate, al 5' del *primer forward*, con il fluorocromo 6-FAM™.

I prodotti di amplificazione delle reazioni di PCR sono stati separati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 3% insieme al marcatore di peso molecolare BenchTop 100bp DNA *Ladder* (100-1500 bp). La visualizzazione è stata effettuata mediante il programma AlphaDigiDoc RT® al fine di valutare la presenza di contaminazioni e l'intensità delle bande dei frammenti.

I campioni sono stati quindi sottoposti ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico ABI® 3130 *Genetic Analyzer* e gli elettroferogrammi risultanti sono stati analizzati mediante il programma *Gene Mapper ID*® versione 4.0.

Lo stato di amplificazione del gene *EGFR* è stato valutato misurando il rapporto tra le altezze dei picchi corrispondenti rispettivamente agli ampliconi di *EGRF* e *IFN- γ* . Un rapporto

superiore a 2,09 è stato considerato come evidenza della presenza di un numero di copie del gene superiore a 2 (media di due replicati) [95].

A) REGENTE	CONCENTRAZIONE
<i>Buffer (10 X)</i>	1 X
<i>Primers EGFR (2 µM)</i>	0,4 µM
<i>Primers IFN-γ (2 µM)</i>	0,4 µM
MgCl₂ (25 mM)	2 mM
dNTP_s (2.5 mM)	0,2 mM
GoTaq® Flexi (5 U/µL)	0,375 U
DNA (50 ng/µL)	50 ng
H₂O	q.b.
Vol. Finale	10 µL

B) FASE	TEMPO	TEMPERATURA	
Attivazione	5 Minuti	95°C	
Denaturazione	30 Secondi	95°C	
<i>Annealing</i>	30 Secondi	56°C	24 CICLI
Estensione	30 Secondi	72°C	
Estensione Finale	30 Minuti	72°C	

Tabelle 16 Reagenti per la co-amplificazione di *EGFR* e *IFN-γ* (A) e profilo termico della reazione di PCR (B). GoTaq® Flexi (Promega Corporation).

ANALISI DI SEQUENZA DEI GENI *IDH1*, *IDH2* E *TP53*

Al fine di identificare variazioni nelle sequenze esoniche e nelle giunzioni esone/introne (fino a circa 80 bp della sequenza intronica fiancheggiante), sono state disegnate specifiche coppie di *primers* per i geni *IDH1* (esone 4), *IDH2* (esone 4) e *TP53* (esoni 2-11), mediante l'ausilio del programma Primer3® (<http://frodo.wi.mit.edu>) (Tab. 17).

I frammenti sono stati amplificati mediante reazione di PCR secondo il protocollo termico *touchdown* mostrato nelle tabelle 18.

PRIMERS	SEQUENZA	TAGLIA FRAMMENTO
IDH1 Ex 4 F IDH1 Ex 4 R	ATCACCAAATGGCACCATAC TCATACCTTGCTTAATGGGTGT	161 bp
IDH2 Ex 4 F IDH2 Ex 4 R	CTGTCCTCACAGAGTTCAAGC TCAGTGGATCCCTCTCC	221 bp
TP53 Ex 2-3 F TP53 Ex 2-3 R	GATCCCCACTTTTCCTCTTG GGGTGAAAAGAGCAGTCAGA	377 bp
TP53 Ex 4a F TP53 Ex 4a R	TCTGGTAAGGACAAGGGTTG GGAAGGGACAGAAGATGACA	336 bp
TP53 Ex 4b F TP53 Ex 4b R	CAGATGAAGCTCCAGAATG AAAGAAATGCAGGGGATAC	285 bp
TP53 Ex 5 F TP53 Ex 5 R	GTTTCTTGCTGCCGTCTT GCCAGACCTAAGAGCAATCA	379 bp
TP53 Ex 6 F TP53 Ex 6 R	TGCTCAGATAGCGATGGTG AAATAAGCAGCAGGAGAAAGC	339 bp
TP53 Ex 7 F TP53 Ex 7 R	GAGCGAGATTCATCTCAA GTCAGAGGCAAGCAGAGG	299 bp
TP53 Ex 8 F TP53 Ex 8 R	GGGACAGGTAGGACCTGATT AAGAGGCAAGGAAAGGTGAT	303 bp
TP53 Ex 9 F TP53 Ex 9 R	AGCAAGCAGGACAAGAAGC GGTAAAACAGTCAAGAAGAAAACG	254 bp
TP53 Ex 10 F TP53 Ex 10 R	GCATGTTGCTTTGTACCG ATGAAGGCAGGATGAGAATG	311 bp
TP53 Ex 11 F TP53 Ex 11 R	GCACAGACCCTCTCACTCAT AAGACCCAAAACCCAAAATG	225 bp

Tabella 17 Sequenze delle coppie di *primers* impiegate per l'analisi di sequenza dei geni *IDH1* (sequenza GenBankNM_005896), *IDH2* (sequenza GenBankNM_002168) e *TP53* (sequenza GenBankNM_000546).

Al termine della reazione, i frammenti sono stati separati per elettroforesi su gel d'agarosio all'1,5% per valutarne la corretta amplificazione e l'assenza di contaminazioni. Successivamente gli ampliconi sono stati purificati mediante gli enzimi EXO I (*Exonuclease I*, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) e SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, USB® Products, Cleveland, OH, USA) a 37°C per un'ora seguiti da un'incubazione a 80°C per 20 minuti. I frammenti purificati sono stati sottoposti a sequenziamento diretto bidirezionale con il kit BigDye® *Terminator Cycle Sequencing* versione 1.1 (Life Technologies).

Il prodotto della reazione di sequenza, previa purificazione con etanolo 100% (-20°C) e Na-Acetano 3M, è stato infine caricato al sequenziatore automatico. Gli elettroferogrammi risultanti sono stati analizzati mediante i programmi *Sequencing Analysis* versione 5.3.1 (Life Technologies) e *Chromas Lite* versione 2.1 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, QLD, Australia).

A) REGENTE	CONCENTRAZIONE
Buffer (10 X)	1 X
Primers (2 µM)	0,4 µM
MgCl₂ (50 mM)	2 mM
dNTP_s (2.5 mM)	0,2 mM
AB Taq (5 U/µL)	0,375 U
DNA (50 ng/µL)	50 ng
H₂O	q.b.
Vol. Finale	12,5 µL

B) FASE	TEMPO	TEMPERATURA	
Attivazione	9 Minuti	94°C	
Denaturazione	30 Secondi	94°C	20 CICLI con decremento di temperatura di <i>annealing</i> di 0,5°C/ciclo
<i>Annealing</i>	30 Secondi	65°C	
Estensione	30 Secondi	72°C	
Denaturazione	30 Secondi	94°C	30 CICLI
<i>Annealing</i>	30 Secondi	55°C	
Estensione	30 Secondi	72°C	
Estensione Finale	30 Minuti	72°C	

Tabella 18 Reagenti per l'amplificazione dei frammenti dei geni di *TP53*, *IDH1* e *IDH2* (A) e profilo termico della reazione di PCR *touchdown* (B). AB Taq (AB Analitica srl, Padova, Italia).

Le mutazioni identificate per il gene *TP53* sono state verificate sui *databases* disponibili in rete:

- UMD_*TP53 mutation database* R1, Giugno 2012 (<http://p53.free.fr>);
- COSMIC *database* versione 62, Novembre 2012 (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*, <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic>);
- IARC *TP53 database* R16, Novembre 2012 (<http://www.p53.iarc.fr>).

L'effetto delle variazioni introniche sullo *splicing* è stato inoltre valutato mediante i programmi NNSplice (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) e SpliceView (http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwspliceview_ex.html).

ANALISI STATISTICA DEI RISULTATI

Le associazioni tra le variabili categoriche analizzate sono state valutate mediante l'impiego di tabelle di contingenza 2 X 2 mediante il test esatto di Fisher a due code o il test del chi-quadro (χ^2).

La sopravvivenza totale (OS) è stata definita come il tempo (mesi) percorso dalla data della diagnosi istologica all'ultimo *follow-up* del paziente. Le curve di sopravvivenza sono state generate mediante il metodo di Kaplan-Meier. Il Log-Rank test (Mantel-Cox) è stato utilizzato nell'analisi univariata per confrontare le curve dei vari sottogruppi di pazienti. L'analisi di regressione di Cox è stata impiegata nell'analisi multivariata.

L'analisi statistica è stata effettuata grazie l'ausilio del programma SPSS versione 17.0 (IBM SPSS®, Chicago, IL, USA).

L'analisi delle curve di sopravvivenza è stata eseguita solo relativamente alla casistica di oligodendrogliomi al fine di valutare l'eventuale significato diagnostico, prognostico e predittivo dei marcatori molecolari presi in esame.

3 Risultati

RISPOSTA AI TRATTAMENTI TERAPEUTICI

L'analisi delle curve di sopravvivenza ottenute mediante il metodo di Kaplan-Meier è stata effettuata limitatamente alla sola casistica di oligodendrogliomi.

In questo tipo di tumori, preliminarmente allo studio del significato prognostico e predittivo, è stata analizzata la sopravvivenza totale dei pazienti in risposta alla tipo di trattamento applicato. L'eventuale significato prognostico dei marcatori presi in esame in questo studio è imprescindibile dall'effetto del trattamento terapeutico sulla sopravvivenza dei pazienti.

Di 51/93 pazienti era noto il *follow-up* mentre di 42 pazienti non sono state reperite informazioni. La maggior parte dei pazienti (27/51 ovvero il 52,9%) è stata sottoposta alla terapia combinata con radio- e chemioterapia, 10/51 pazienti sono stati sottoposti alla sola chemioterapia (19,6%) mentre solo 5/51 pazienti hanno usufruito del solo trattamento radioterapico (9,8%) come mostrato in tabella 19.

TRATTAMENTO	PAZIENTI (n°)	OS MEDIA (Mesi)	FOLLOW-UP MEDIO (Mesi)
Radioterapia	5	47	(3 – 103)
Chemioterapia	10	54	(3 – 113)
Radioterapia + Chemioterapia	27	67	(2 – 233)
Nessun trattamento	9	19	(1 – 32)

Tabella 19 Distribuzione dei trattamenti terapeutici applicati ai pazienti con oligodendroglioma (II e III grado)

L'analisi delle curve di sopravvivenza ha evidenziato che i pazienti sottoposti al trattamento combinato di radio- e chemioterapia sono caratterizzati da una sopravvivenza maggiore, anche se non statisticamente significativa, rispetto ai pazienti sottoposti alle singole terapie o non trattati ($p = 0,119$) (Tab. 20; Fig. 26).

TRATTAMENTO			Troncati		Log-Rank (Mantel-Cox)
	N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
Nessun trattamento (No)	9	5	4	44,4%	$\chi^2 = 2,436$ $p = 0,119$
RT	5	3	2	40%	
CHT	10	1	9	90%	
RT+CHT	27	18	9	33,3%	
Globale	51	27	24	47,1%	

Tabella 20 Frequenze dei trattamenti terapeutici somministrati ai pazienti con oligodendrogliomi relative alla curva di sopravvivenza ottenuta con il metodo di Kaplan-Meier (Fig. 26).

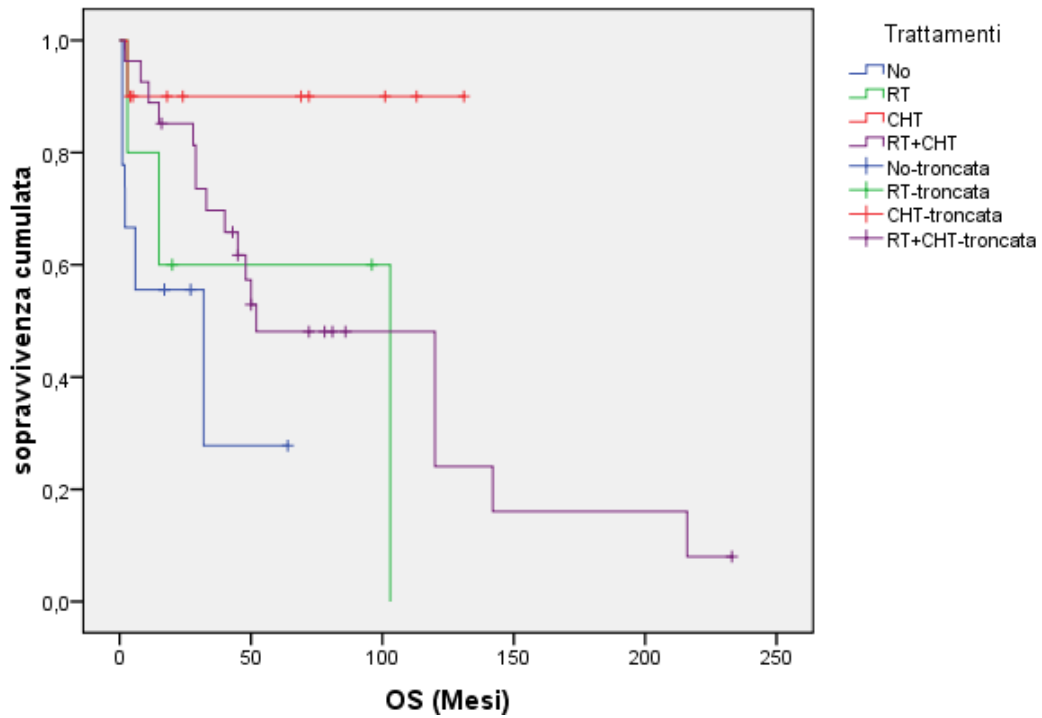


Figura 26 Curve di sopravvivenza con il metodo di Kaplan-Meier per la stratificazione dei pazienti, con oligodendroglioma (II e III grado), secondo il tipo di trattamento somministrato.

CO-DELEZIONE DEI CROMOSOMI 1p E 19q

La frequenza della co-delezione 1p/19q è stata determinata mediante MLPA® su 120/139 gliomi (86,3%) (Fig. 27 e 28).

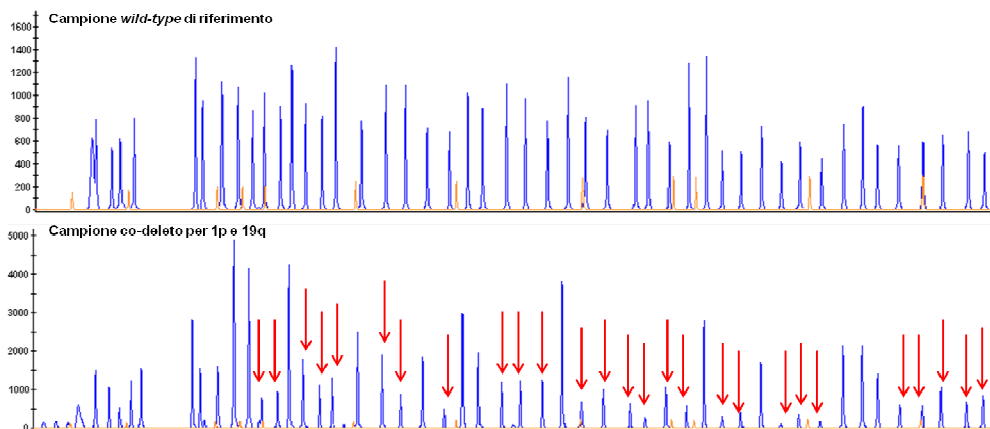


Figura 27 Elettroferogrammi di un campione normale di riferimento e di un campione con co-delezione dei cromosomi 1p e 19q. I picchi arancioni corrispondono al peso molecolare GeneScan™ 500-Liz (Life Technologies). Le frecce indicano la riduzione dei picchi corrispondenti alle sonde specifiche per i *loci* in esame.

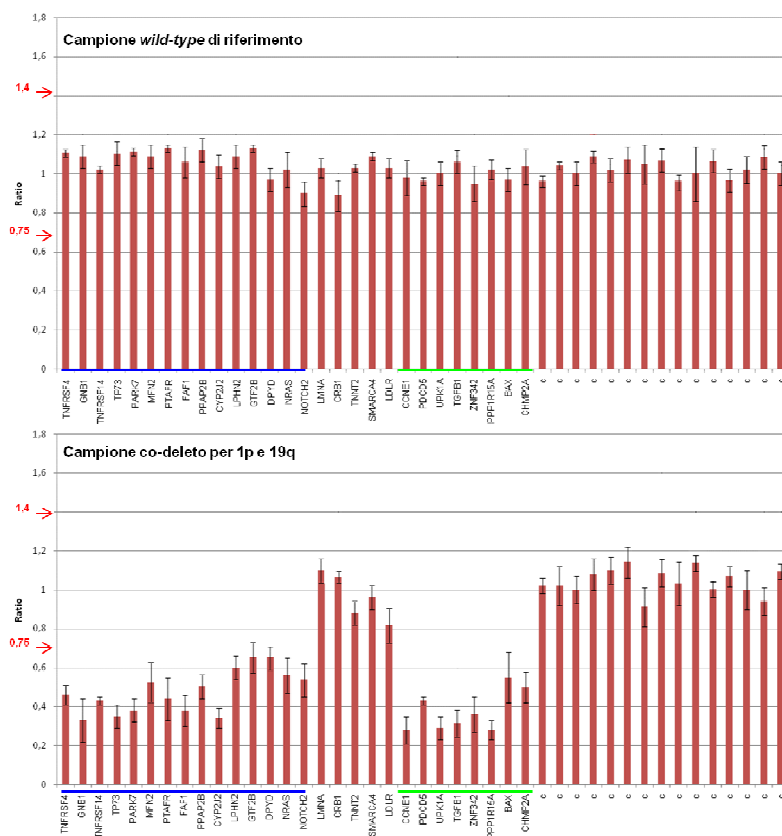


Figura 28 Grafici a colonne di un campione normale di riferimento e di un campione con co-delezione dei cromosomi 1p e 19q ottenuti dall'elaborazione mediante Coffalyser® dei dati ottenuti dalla reazione MLPA®. Il *Ratio* è il valore normalizzato corrispondente alle singole sonde. In rosso sono indicati i valori del *cut-off* di normalità ($0,75 < X < 1,4$). Le sonde evidenziate dalla linea blu sono localizzate sul cromosoma 1p mentre le sonde in verde corrispondono a quelle del cromosoma 19q.

È stata effettuata una distinzione tra le delezioni cromosomiche complete e le delezioni parziali. Sono state definite come complete le delezioni che interessano l'intero braccio cromosomico, rispettivamente dai *loci* 1p36 (*TNFRSF4*) – 1p12 (*NOTCH2*) per il cromosoma 1 e dei *loci* 19q12 (*CCNE1*) – 19q13.43 (*CHMP2A*) per il cromosoma 19 (Fig. 24). Delezioni con estensione minima di due *loci*, ovvero di due sonde consecutive con valore $< 0,75$, di tipo interstiziale, pericentromerica o telomerica sono state definite come parziali. Le frequenze di tali alterazioni nella casistica esaminata sono riportate nelle tabelle 21.

Nella casistica di oligodendrogliomi, la delezione completa dei cromosomi 1p e 19q è risultata l'alterazione più frequente, essendo stata identificata in 41 casi su 84 (48,8%). Tale frequenza risulta essere inferiore a quelle riportate in letteratura, ottenute però con metodiche a singolo *locus*, quali FISH o LOH su 1p36 e 19q13.3. Considerando in generale la presenza di delezioni di 1p e 19q, senza distinzione tra totali o parziali, i casi con co-delezione

risultano 65 su 84 (77,2%). Questa frequenza è concordante con quanto già descritto ed ottenuto con le metodiche sopracitate.

A) 1p/19q	OLIGODENDROGLIOMI II Grado (N=51)		OLIGODENDROGLIOMI III Grado (N=33)		TOTALE (N=84)	
	N	%	N	%	N	%
1p (WT) / 19q (WT)	7/51	13,7	6/33	18,2	13/84	15,5
1p (T) / 19q (T)	28/51	54,9	13/33	39,4	41/84	48,8
1p (P) / 19q (T)	3/51	5,9	7/33	21,2	10/84	11,9
1p (P) / 19q (P)	11/51	21,6	3/33	9,1	14/84	16,7
1p (P) / 19q (WT)	2/51	3,9	4/33	18,2	6/84	7,1

B) 1p/19q	OLIGOASTROCITOMI II Grado (N=10)		OLIGOASTROCITOMI III Grado (N=8)		TOTALE (N=18)	
	N	%	N	%	N	%
1p (WT) / 19q (WT)	1/10	10	3/8	37,5	4/18	22,2
1p (T) / 19q (T)	0/10	0	1/8	12,5	1/18	5,6
1p (P) / 19q (T)	2/10	20	0/8	0	2/18	11,1
1p (P) / 19q (P)	2/10	20	0/8	0	2/18	11,1
1p (P) / 19q (WT)	1/10	10	3/8	37,5	4/18	22,2
1p (WT) / 19q (P)	3/10	30	1/8	12,5	4/18	22,2
1p (T) / 19q (P)	1/10	10	0/8	0	1/18	5,6

C) 1p/19q	ASTROCITOMI II Grado (N=12)		ASTROCITOMI III Grado (N=6)		TOTALE (N=18)	
	N	%	N	%	N	%
1p (WT) / 19q (WT)	7/12	58,3	3/6	50	10/18	55,6
1p (T) / 19q (T)	1/12	8,3	0/6	0	1/18	5,6
1p (P) / 19q (T)	0/12	0	2/6	33,3	2/18	11,1
1p (P) / 19q (WT)	2/12	16,7	1/6	16,7	3/18	16,7
1p (WT) / 19q (P)	1/12	8,3	0/6	0	1/18	5,6
1p (WT) / 19q (T)	1/12	8,3	0/6	0	1/18	5,6

Tabelle 21 Stato dei cromosomi 1p e 19q nei tumori oligodendrogliali (A), oligoastrocitari (B) e astrocitari (C). le alterazioni a carico dei due cromosomi sono state suddivise, secondo l'estensione, in totali (T) e parziali (P).

La co-delezione dei cromosomi 1p e 19q, parziale o totale, è stata trovata essere associata all'istologia oligodendrogliale del tumore ($p < 0,0001$), anche considerando le sole delezioni totali ($p < 0,0001$). La co-delezione totale nella casistica di oligodendrogliomi di II e III grado, è risultata correlata alle mutazioni dei geni *IDH1/2* ($p = 0,0100$) e allo stato di metilazione dei promotori del gene *EMP3* ($p = 0,0466$) e del gene *p14^{ARF}* ($p = 0,0609$), quest'ultimo in modo

non statisticamente significativo. Si è osservata invece un'associazione inversa con lo stato di amplificazione del gene *EGFR* ($p = 0,0138$).

L'analisi di sopravvivenza attraverso il metodo di Kaplan-Meier, negli oligodendrogliomi stratificati per l'estensione delle delezioni a carico dei cromosomi 1p e 19q, è illustrata in tabella 22. Sebbene non sia stata trovata un'associazione statisticamente significativa ($p = 0,167$), si può osservare che i pazienti con co-delezione totale dei cromosomi 1p e 19q possiedono una sopravvivenza maggiore mentre i pazienti con co-delezione parziale o con la sola delezione parziale di 1p hanno invece una sopravvivenza sovrapponibile a quella dei casi *wild-type*, con i primi favoriti rispetto ai secondi (Fig. 29).

1p/19q			Troncati		Log-Rank (Mantel-Cox)
	N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
1p (WT) / 19q (WT)	11	6	5	45,5%	$\chi^2 = 1,907$ $p = 0,167$
1p (T) / 19q (T)	33	13	20	60,6%	
1p (P) / 19q (T)	9	4	5	55,6%	
1p (P) / 19q (P)	10	6	4	40%	
1p (P) / 19q (WT)	4	3	1	25%	
Globale	67	32	35	52,2%	

Tabella 22 Frequenze delle alterazioni a carico dei cromosomi 1p e 19q nell'intera casistica di oligodendrogliomi relative alla curva di sopravvivenza ottenuta con il metodo di Kaplan-Meier (Fig. 29).

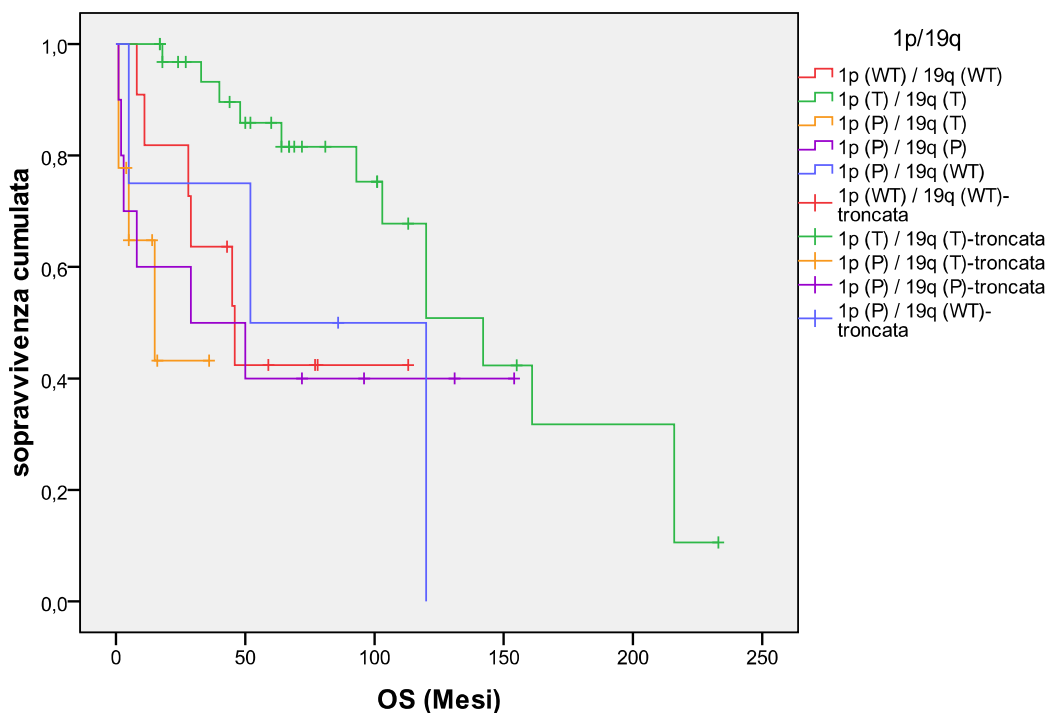


Figura 29 Curve di sopravvivenza con il metodo di Kaplan-Meier per la stratificazione, in parziale e totale, delle delezioni a carico dei cromosomi 1p e 19q.

La casistica di oligodendrogliomi è stata quindi suddivisa a seconda della presenza della co-delezione totale dei cromosomi 1p e 19q, di altri tipi di alterazioni e per l'assenza di perdite. La curva di sopravvivenza ottenuta, sebbene non statisticamente significativa, evidenzia come l'andamento dei pazienti *wild-type* e dei pazienti con delezioni di 1p e 19q, diverse dalla totale, sia quasi sovrapponibile (Log-Rank test, $p = 0,447$) (Tab. 23; Fig 30).

1p/19q			Troncati		Log-Rank (Mantel-Cox)
	N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
1p (WT) / 19q (WT)	10	6	4	40%	$\chi^2 = 0,579$ $p = 0,447$
1p (T) / 19q (T)	33	13	20	60,6%	
Altre alterazioni	23	12	11	47,8%	
Globale	66	31	35	53%	

Tabella 23 Stratificazione dei pazienti con oligodendroglioma per la presenza della co-delezione totale di 1p/19q, di altre alterazioni e per l'assenza di perdite relative alla curva di sopravvivenza ottenuta con il metodo di Kaplan-Meier (Fig. 30).

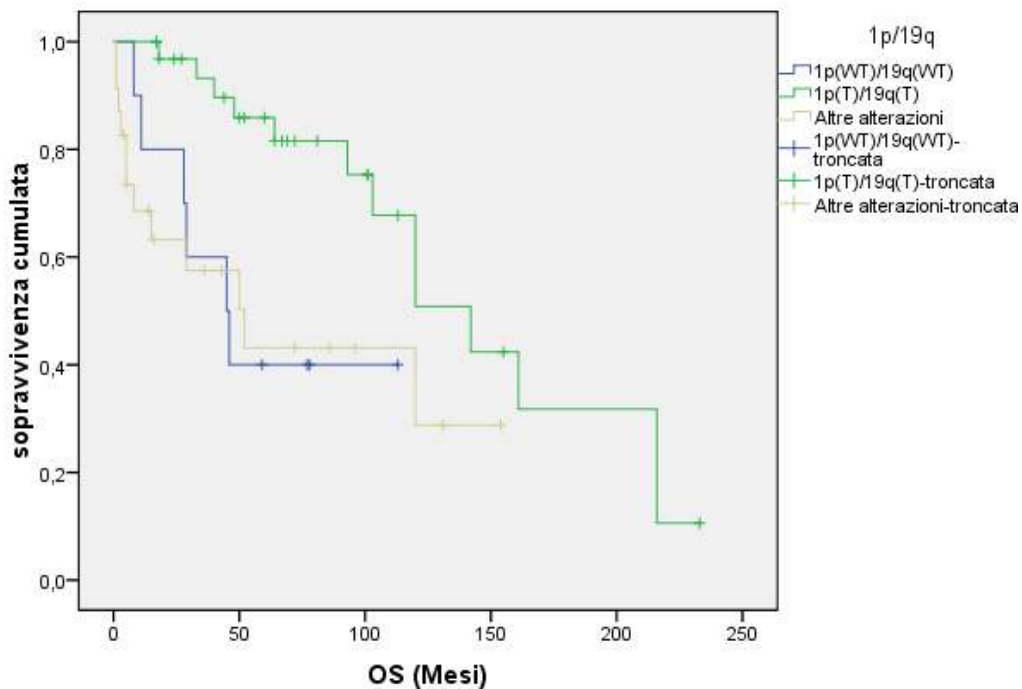


Figura 30 Curva di sopravvivenza con il metodo di Kaplan-Meier per i pazienti con co-delezione totale dei cromosomi 1p e 19q verso i pazienti senza alterazioni e con altri tipi di delezione.

Raggruppando quindi i pazienti *wild-type* e con altri tipi di delezione, la co-delezione totale delle regioni cromosomiche 1p e 19q è risultata significativamente associata ad una

maggior sopravvivenza dei pazienti affetti da oligodendroglioma (Log-Rank test, $p = 0,004$), come illustrato in tabella 24 e in figura 31.

1p/19q			Troncati		Log-Rank (Mantel-Cox)
	N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
Altro	33	18	15	45,5%	$\chi^2 = 8,079$ $p = 0,004$
1p (T) / 19q (T)	34	14	20	58,8%	
Globale	67	32	35	52,2%	

Tabella 24 Frequenze della co-delezione totale di 1p e 19q nell'intera casistica di oligodendrogliomi relative alla curva di sopravvivenza ottenuta con il metodo di Kaplan-Meier (Fig. 31).

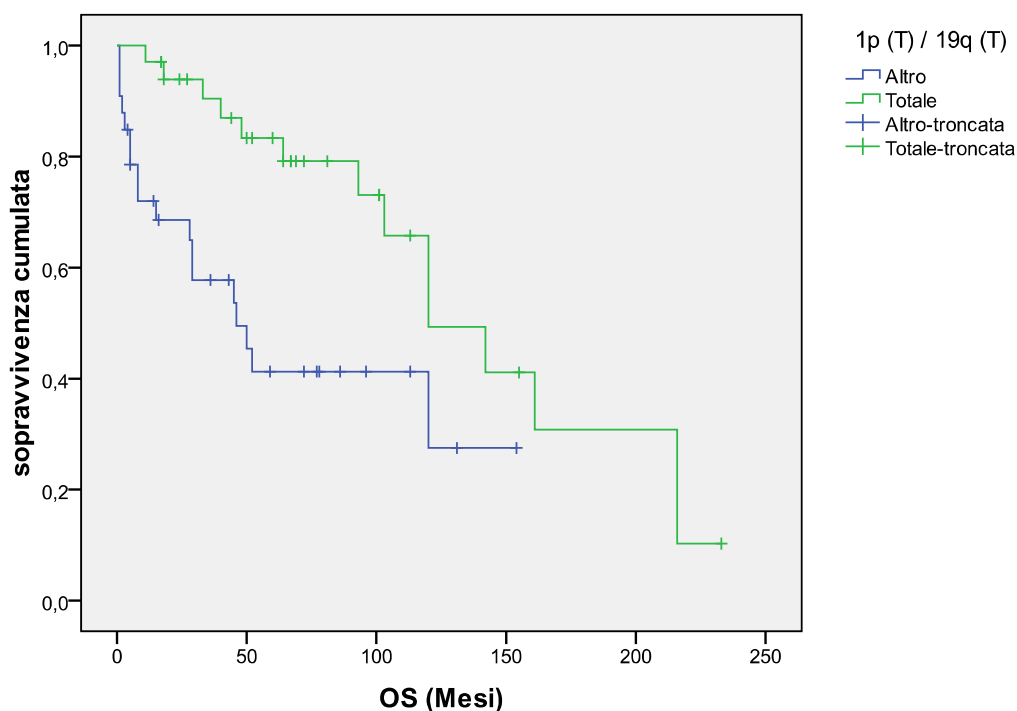


Figura 31 Curva di sopravvivenza con il metodo di Kaplan-Meier per i pazienti con co-delezione totale dei cromosomi 1p e 19q verso il gruppo di pazienti senza alterazioni e con altri tipi di delezione.

In seguito alla stratificazione dei pazienti per grado istologico di malignità, l'analisi delle curve di sopravvivenza ha evidenziato che la co-delezione totale di 1p e 19q è associata ad una maggior sopravvivenza totale nei pazienti affetti da oligodendroglioma anaplastico (III grado) (Log-Rank test, $p = 0,011$) (Fig. 32). Negli oligodendrogliomi di II grado invece si può osservare una correlazione non statisticamente significativa (Log-Rank test, $p = 0,080$) come illustrato in tabella 25.

Grado	1p/19q			Troncati		Log-Rank (Mantel-Cox)
		N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
II	Altro	18	7	11	61,1%	$\chi^2 = 8,079$ $p = 0,080$
	1p (T) / 19q (T)	22	4	18	81,8%	
	Globale	40	11	29	72,5%	
III	Altro	15	11	4	26,7%	$\chi^2 = 8,079$ $p = 0,011$
	1p (T) / 19q (T)	12	10	2	16,7%	
	Globale	27	21	6	22,2%	
Globale		67	32	35	52,2%	$\chi^2 = 9,406$ $p = 0,002$

Tabella 25 Frequenze della co-delezione totale di 1p e 19q negli oligodendrogliomi stratificata per il grado istologico relativa alla curva di sopravvivenza ottenuta con il metodo di Kaplan-Meier (Fig. 32).

III Grado

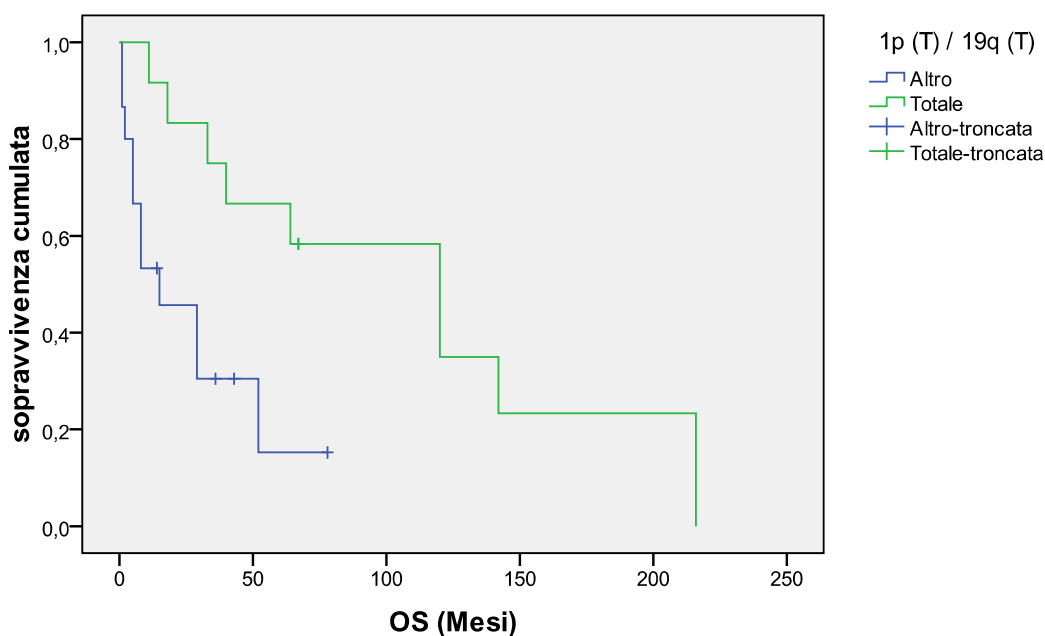


Figura 32 Curva di sopravvivenza con il metodo di Kaplan-Meier per gli oligodendrogliomi anaplastici con co-delezione totale dei cromosomi 1p e 19q verso i casi con altri tipi di delezione o senza alterazioni.

Confrontando la sopravvivenza dei pazienti sottoposti a trattamento combinato di radio- e chemioterapia, stratificati secondo l'estensione delle delezioni a carico di 1p/19q, si è evidenziato che i pazienti con co-delezione totale sono caratterizzati da una maggior sopravvivenza totale (Log-Rank test, $p = 0,009$) (Tab. 26; Fig. 33).

Tra i pazienti con co-delezione totale di 1p/19q, escludendo l'unico paziente che ha subito il solo trattamento di radioterapia, la sopravvivenza media dei pazienti trattati con RT + CHT è stata di 108 mesi mentre, per i soli pazienti sottoposti alla chemioterapia è stata di 65 mesi.

TRATTAMENTO	1p/19q			Troncati		Log-Rank (Mantel-Cox)
		N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
Nessun trattamento	1p (T) / 19q (T)	4	0	4	100%	$\chi^2 = 5,000$ $p = 0,082$
	1p (P) / 19q (T)	1	1	0	0%	
	1p (P) / 19q (P)	1	1	0	0%	
	Globale	6	2	4	66,7%	
RT	1p (T) / 19q (T)	1	1	0	0%	$\chi^2 = 2,000$ $p = 0,368$
	1p (P) / 19q (T)	1	1	0	0%	
	1p (P) / 19q (P)	1	0	1	100%	
	Globale	3	2	1	33,3%	
CHT	1p (T) / 19q (T)	5	0	5	100%	$\chi^2 = 2,333$ $p = 0,311$
	1p (P) / 19q (T)	2	0	2	100%	
	1p (P) / 19q (P)	3	1	2	66,7%	
	Globale	10	1	9	90%	
Terapia combinata RT+CHT	1p (WT) / 19q (WT)	3	2	1	33,3%	$\chi^2 = 13,491$ $p = 0,009$
	1p (T) / 19q (T)	10	7	3	30%	
	1p (P) / 19q (T)	1	0	1	100%	
	1p (P) / 19q (P)	4	4	0	0%	
	1p (P) / 19q (WT)	4	2	2	50%	
	Globale	22	15	7	31,8%	

Tabella 26 Stratificazione dei pazienti (II e III grado) secondo l'estensione delle delezioni a carico di 1p/19q per i trattamenti ricevuti di radioterapia, chemioterapia o combinati (radioterapia + chemioterapia) relativa alle curve di sopravvivenza ottenute con il metodo di Kaplan-Meier.

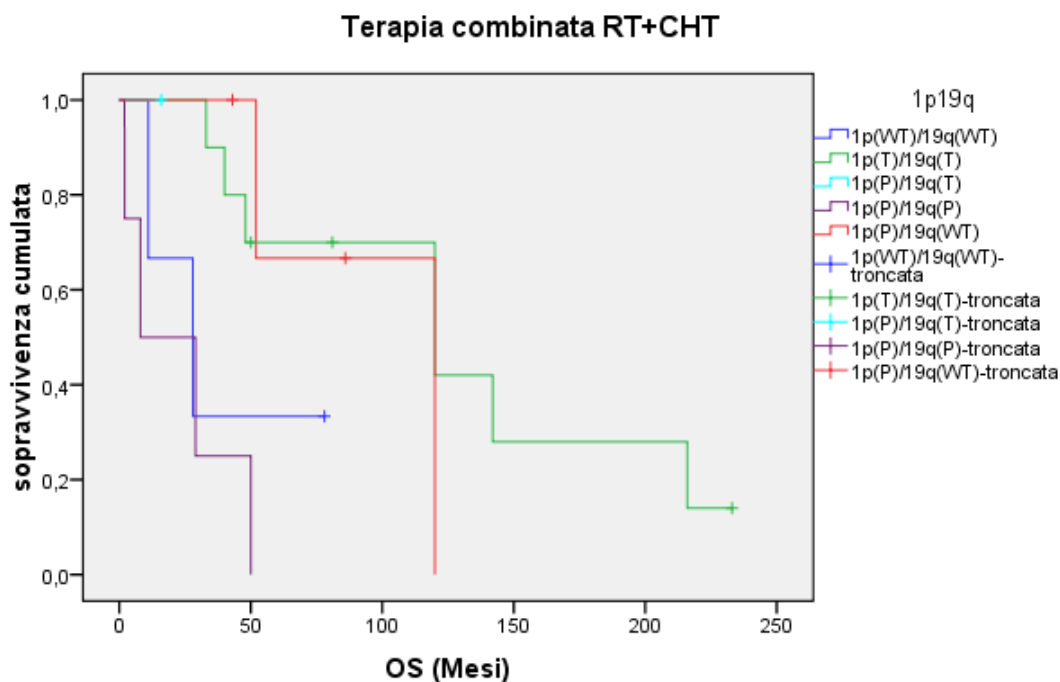


Figura 33 Curva di sopravvivenza con il metodo di Kaplan-Meier per i pazienti sottoposti al trattamento combinato di radio- e chemioterapia stratificati per la tipologia di delezione dei cromosomi 1p e 19q.

METILAZIONE DEL PROMOTORE DEL GENE *MGMT*

Lo stato di metilazione del gene *MGMT* è stato determinato mediante MS-PCR su 117/139 gliomi (84,1%) (Fig. 34). Il promotore del gene *MGMT* è risultato metilato in 75 casi su 117 (64,1%). Le frequenze di tale alterazione sono riportate in tabella 27.

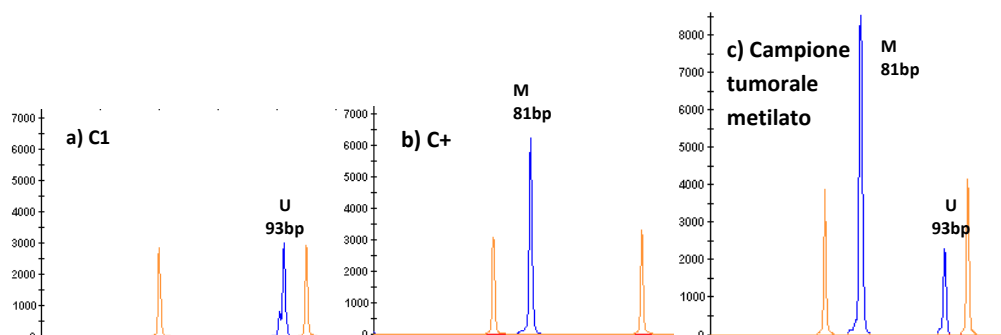


Figura 34 Elettroferogrammi dei frammenti ottenuti dalla reazione di MS-PCR per il gene *MGMT*. In arancione sono visibili i picchi corrispondenti al peso molecolare GeneScan™ 500-Liz (Life Technologies). (a) Campione normale di riferimento normale (C1) non metilato (U). (b) Campione di riferimento (C+) universalmente metilato (M). (c) Campione tumorale metilato (rapporto M/U > 0,1).

<i>MGMT</i>	Grado	Metilati		Non Metilati		TOTALE Metilati	
		N	%	N	%	N	%
Oligodendrogliomi N = 79	II (N=47)	32/47	68,1	15/47	31,9	56/79	70,9
	III (N=32)	24/32	75	8/32	25		
Oligoastrocitomi N = 18	II (N=10)	6/10	60	4/10	40	12/18	66,7
	III (N=8)	6/8	75	2/8	25		
Astrocitomi N = 22	II (N=15)	5/15	33,3	10/15	66,7	7/22	31,8
	III (N=7)	2/7	28,6	5/7	71,4		

Tabella 27 Frequenza della metilazione del promotore del gene *MGMT* nella casistica di gliomi suddivisa per tipo tumorale.

La metilazione del gene *MGMT* è stata trovata essere associata ai tumori oligodendrogliali rispetto ai tumori astrocitari e misti ($p = 0,0162$).

L'analisi di sopravvivenza attraverso il metodo di Kaplan-Meier ha mostrato che questa alterazione non è correlata alla sopravvivenza totale dei pazienti nell'intera casistica di oligodendrogliomi (Tab. 28).

In seguito alla stratificazione dei pazienti per grado istologico di malignità, l'analisi delle curve di sopravvivenza ha evidenziato che la metilazione del gene *MGMT* è però associata ad

una maggior sopravvivenza totale nei pazienti affetti da oligodendroglioma anaplastico (Log-Rank test, $p = 0,041$), come illustrato in tabella 29 e figura 35.

MGMT			Troncati		Log-Rang (Mantel-Cox)
	N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
Non Metilati	19	11	8	42,1%	$\chi^2 = 0,857$ $p = 0,355$
Metilati	46	25	21	45,7%	
Globale	65	36	29	44,6%	

Tabella 28 Frequenza dello stato del promotore di *MGMT* nell'intera casistica di gliomi analizzata con il metodo di Kaplan-Meier.

Grado	MGMT			Troncati		Log-Rang (Mantel-Cox)
		N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
II	Non Metilato	12	4	8	66,7%	$\chi^2 = 0,154$ $p = 0,695$
	Metilato	24	7	17	70,8%	
	Totale	36	11	25	69,4%	
III	Non Metilato	6	6	0	0%	$\chi^2 = 4,182$ $p = 0,041$
	Metilato	22	18	4	18,2%	
	Totale	28	24	4	14,3%	
Globale		64	35	29	45,3%	$\chi^2 = 3,009$ $p = 0,083$

Tabella 29 Frequenza della metilazione del promotore di *MGMT* nella casistica di oligodendrogliomi stratificata per grado istologico di malignità. La curva di sopravvivenza con il metodo di Kaplan-Meier ha evidenziato una correlazione negli oligodendrogliomi anaplastici (Fig. 35).

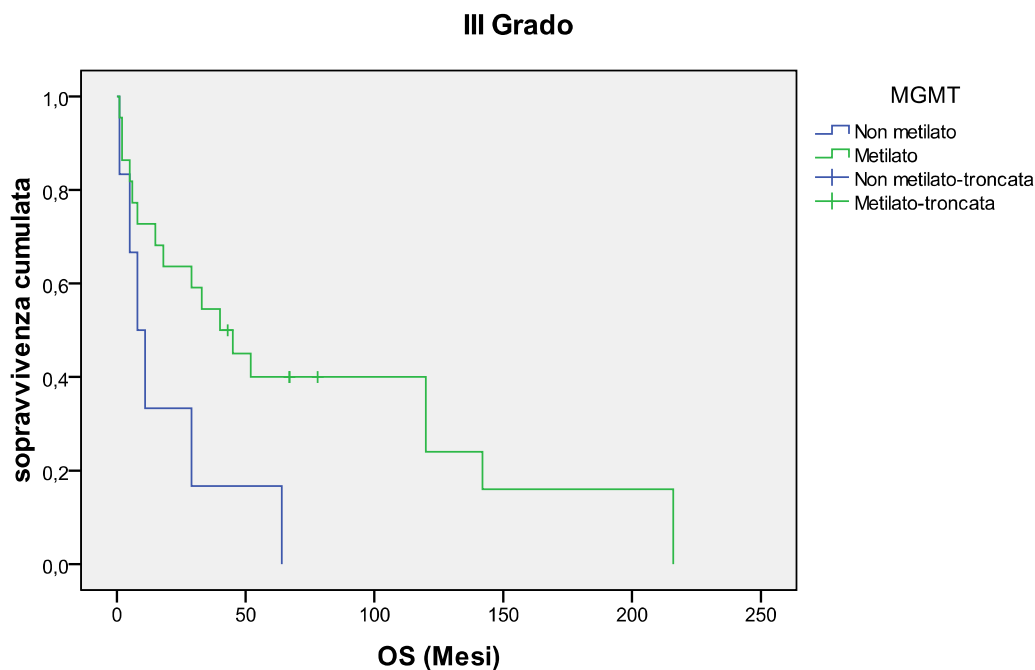


Figura 35 Curva di sopravvivenza con il metodo di Kaplan-Meier che illustrano l'associazione tra lo stato di metilazione del promotore del gene *MGMT* e gli oligodendrogliomi anaplastici (III grado).

Confrontando la sopravvivenza dei pazienti sottoposti a trattamento combinato di radio- e chemioterapia, si è evidenziato che i pazienti con metilazione del promotore del gene *MGMT* sono caratterizzati da una maggior sopravvivenza totale (Log-Rank test, $p = 0,0008$) (Tab. 30; Fig. 36).

TRATTAMENTO	MGMT			Troncati		Log-Rank (Mantel-Cox)
		N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
Nessun trattamento	Non metilati	2	1	1	50%	$\chi^2 = 0,290$ $p = 0,590$
	Metilati	5	4	1	20%	
	Globale	7	5	2	28,6%	
RT	Non metilati	1	0	1	100%	$\chi^2 = 0,500$ $p = 0,480$
	Metilati	2	2	0	0%	
	Globale	3	2	1	33,3%	
CHT	Non metilati	4	1	3	75%	$\chi^2 = 1,250$ $p = 0,264$
	Metilati	5	0	5	100%	
	Globale	9	1	8	88,9%	
Terapia combinata RT+CHT	Non metilati	7	6	1	14,3%	$\chi^2 = 7,065$ $p = 0,008$
	Metilati	18	11	7	38,9%	
	Globale	25	17	8	32%	

Tabella 30 Stratificazione dei pazienti con metilazione del promotore del gene *MGMT* per i trattamenti ricevuti di radioterapia, chemioterapia o combinati (radioterapia + chemioterapia) relativa alle curve di sopravvivenza ottenute con il metodo di Kaplan-Meier.

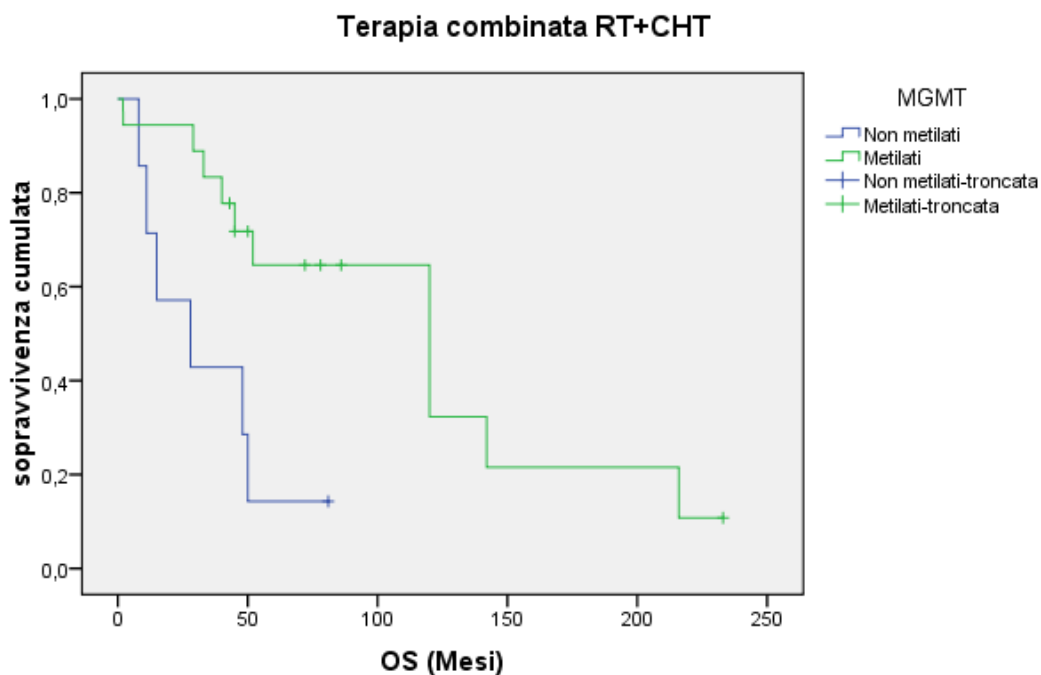


Figura 36 Curve di sopravvivenza con il metodo di Kaplan-Meier per i pazienti con metilazione del promotore del gene *MGMT* sottoposti ai trattamenti al trattamento combinato di radio- e chemioterapia.

MUTAZIONI DEI GENI *IDH1* E *IDH2*

Lo stato mutazionale dei geni *IDH1* e *IDH2* è stato determinato, mediante sequenziamento diretto, su 131/139 gliomi (94,2%). Le mutazioni dei geni *IDH1/2* sono state osservate in 84 casi su 131 (64,1%). Le frequenze di tali alterazioni sono riportate in tabella 31.

Le mutazioni identificate nella casistica in esame sono illustrate in figura 37 e 38.

<i>IDH1/2</i>	Grado	Mutati		<i>Wild-Type</i>		TOTALE Mutati	
		N	%	N	%	N	%
Oligodendrogliomi N = 87	II (N=56)	43/56	76,8	13/56	23,2	59/87	67,8
	III (N=31)	16/31	51,6	15/31	43,4		
Oligoastrocitomi N = 20	II (N=12)	11/12	91,7	1/12	8,3	14/20	70
	III (N=8)	3/8	37,5	5/8	62,5		
Astrocitomi N = 24	II (N=15)	5/15	33,3	10/15	66,7	11/24	45,8
	III (N=9)	6/9	66,7	3/9	33,3		

Tabella 31 Frequenze delle mutazioni dei geni *IDH1/2* nella casistica di gliomi suddivisa per istotipo tumorale.

Tra gli 84 casi trovati mutati, l'alterazione più frequentemente osservata è stata la sostituzione amminoacidica p.R132H a carico del gene *IDH1* (76/84; 90,5%) seguita dalla p.R132G (3/84; 3,6%). Altre mutazioni a carico del codone 132 di *IDH1* e del codone 172 di *IDH2* sono invece state riscontrate in singoli casi, come riportato in tabella 32.

GENE	Variazione Nucleotidica	Variazione Amminoacidica	Casi Mutati (N)	Frequenza (%)
<i>IDH1</i>			82	97,6
	c.395G>A	p.R132H	76	92,7
	c.394C>G	p.R132G	3	3,7
	c.394C>T	p.R132C	1	1,2
	c.394C>A	p.R132S	1	1,2
	c.395G>T	p.R132L	1	1,2
<i>IDH2</i>			2	2,5
	c.515G>T	p.R172M	1	50
	c.516G>T	p.R172S	1	50

Tabella 32 Tipologia e frequenza delle mutazioni a carico dei codoni 132 di *IDH1* e 172 di *IDH2*. La numerazione nucleotidica e amminoacidica è riferita al sito d'inizio della trascrizione (+1) rispettivamente per le sequenze depositate su GenBank NM_005896 (*IDH1*) e NM_002168 (*IDH2*).

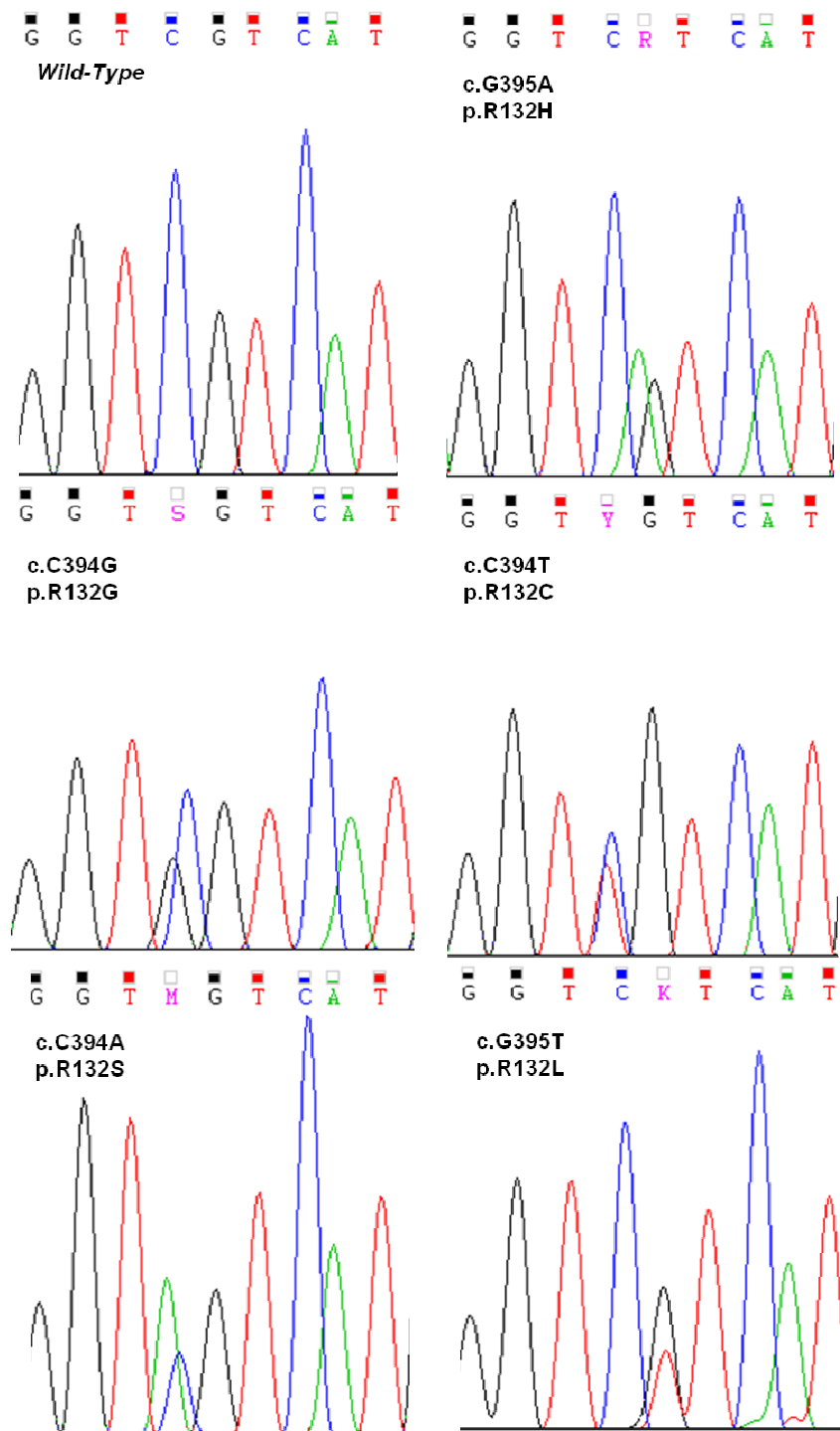


Figura 37 Elettroferogramma di un campione di riferimento normale (*wild-type*) e di campioni esemplificativi per le mutazioni identificate a carico del codone 132 del gene *IDH1*.

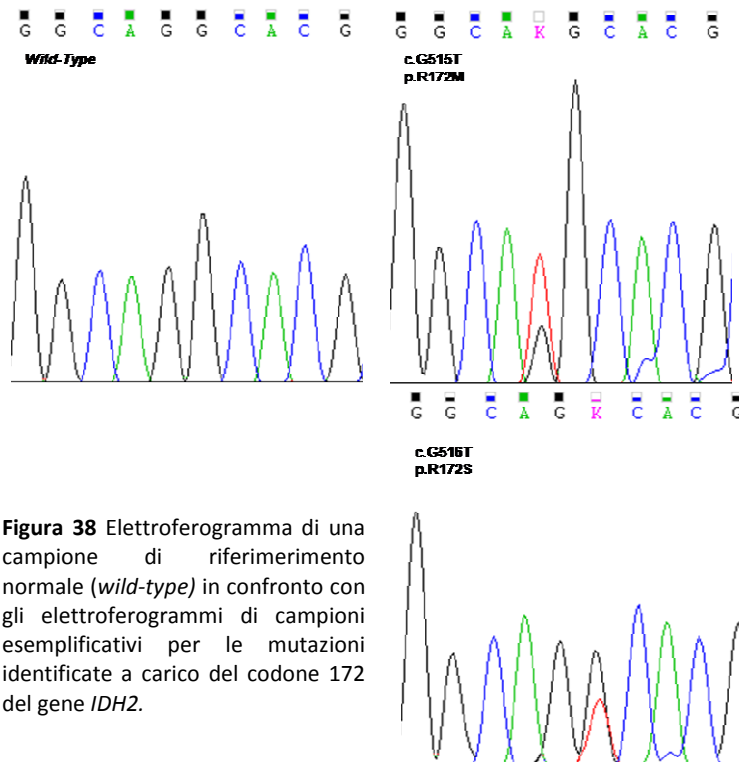


Figura 38 Elettroferogramma di un campione di riferimento normale (*wild-type*) in confronto con gli elettroferogrammi di campioni esemplificativi per le mutazioni identificate a carico del codone 172 del gene *IDH2*.

Le mutazioni dei geni *IDH1/2* non sono risultate correlate agli oligodendrogliomi rispetto agli astrocitomi e ai tumori misti oligoastrocitari ($p = 0,2494$). Queste alterazioni sono state però trovate essere correlate, negli oligodendrogliomi, alla presenza della co-delezione totale dei cromosomi 1p e 19q ($p = 0,0100$), alla metilazione del promotore del gene *EMP3* ($p = 0,0004$) e, al limite della significatività statistica, del gene $p14^{ARF}$ ($p = 0,0504$). Nelle neoplasie oligodendrogliali, è stata inoltre osservata un'associazione inversa di queste mutazioni con lo stato di amplificazione del gene *EGFR* ($p = 0,0206$).

L'analisi di sopravvivenza attraverso il metodo di Kaplan-Meier ha evidenziato che i pazienti affetti da oligodendroglioma con mutazione dei geni *IDH1/2* possiedono una sopravvivenza significativamente maggiore rispetto ai pazienti senza tale alterazione (Log-Rank test, $p < 0,0001$) (Tab. 33; Fig. 39).

<i>IDH1/2</i>			Troncati		Log-Rang (Mantel-Cox)
	N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
<i>Wild-type</i>	24	16	8	33,3%	$\chi^2 = 15,287$ $p < 0,0001$
Mutati	47	20	27	57,4%	
Globale	71	36	35	49,3%	

Tabella 33 Frequenze delle mutazioni a carico dei geni *IDH1/2* nell'intera casistica di oligodendrogliomi relative alla curva di sopravvivenza ottenuta con il metodo di Kaplan-Meier (Fig. 39).

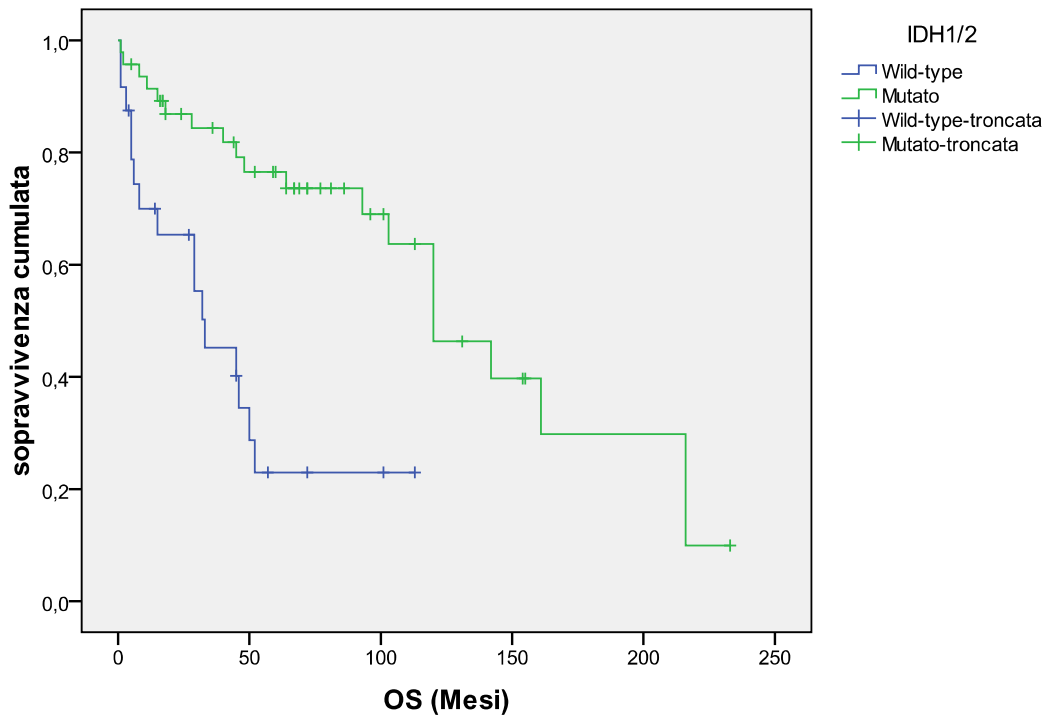


Figura 39 Curva di sopravvivenza con il metodo di Kaplan-Meier per i pazienti con mutazione dei geni *IDH1/2* verso i pazienti senza tale alterazione.

Il vantaggio, in termini di sopravvivenza totale, dei pazienti con oligodendroglioma con mutazione di *IDH1/2* è confermato sia nei tumori di II grado che, in modo più significativo, nei tumori di III grado (Log-Rank test, $p = 0,048$ e $p = 0,006$) (Tab. 34; Fig. 40).

Grado	<i>IDH1/2</i>			Troncati		Log-Rang (Mantel-Cox)
		N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
II	<i>Wild-type</i>	12	5	7	58,3%	$\chi^2 = 3,906$ $p = 0,048$
	Mutato	32	8	24	75%	
	Globale	44	13	31	70,5%	
III	<i>Wild-type</i>	12	11	1	8,3%	$\chi^2 = 7,478$ $p = 0,006$
	Mutato	15	12	3	20%	
	Globale	27	23	4	14,8%	
Globale		71	36	35	49,3%	$\chi^2 = 11,384$ $p = 0,001$

Tabella 34 Frequenze delle mutazioni a carico dei geni *IDH1/2* nell'intera casistica di oligodendrogliomi, stratificata per grado istologico, relative alle curve di sopravvivenza ottenute con il metodo di Kaplan-Meier (Fig. 40).

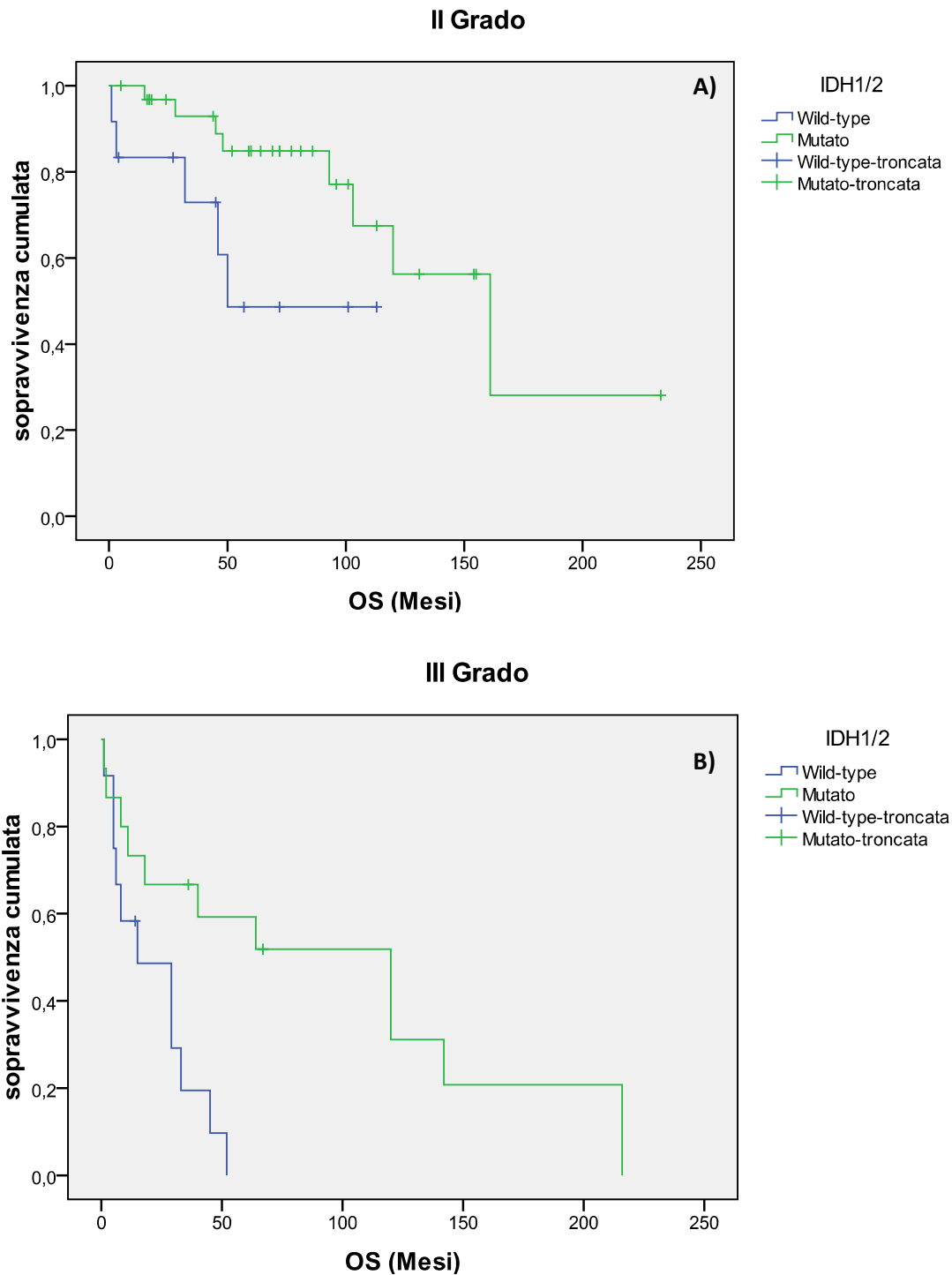


Figura 40 Curve di sopravvivenza con il metodo di Kaplan-Meier per i pazienti con mutazione dei geni *IDH1/2* stratificati secondo il grado istologico, II (A) o III (B), della neoplasia.

La stratificazione dei pazienti con mutazioni dei geni *IDH1/2* secondo il tipo di trattamento ricevuto di chemioterapia, radioterapia, o combinato di radio- e chemioterapia non ha evidenziato un'associazione tra la presenza di questa alterazione e la sopravvivenza dei pazienti trattati (Tab. 35).

TRATTAMENTO	IDH1/2			Troncati		Log-Rang (Mantel-Cox)
		N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
Nessun trattamento	Wild-type	4	3	1	25%	$\chi^2 = 2,161$ $p = 0,142$
	Mutated	4	1	3	75%	
	Globale	8	4	4	50%	
RT	Wild-type	1	1	0	0%	$\chi^2 = 2,000$ $p = 0,157$
	Mutated	2	1	1	50%	
	Globale	3	2	1	33,3%	
CHT	Wild-type	4	1	3	75%	$\chi^2 = 0,429$ $p = 0,513$
	Mutated	6	0	6	100%	
	Globale	10	1	9	90%	
Terapia combinata RT+CHT	Wild-type	8	6	2	25%	$\chi^2 = 2,686$ $p = 0,101$
	Mutated	15	11	4	26,7%	
	Globale	23	17	6	26,1%	

Tabella 35 Stratificazione dei pazienti con mutazioni dei geni *IDH1/2* per i trattamenti ricevuti di radioterapia, chemioterapia o combinati (radioterapia + chemioterapia) relative alle curve di sopravvivenza ottenute con il metodo di Kaplan-Meier.

METILAZIONE DEL PROMOTORE DEL GENE *EMP3*

Lo stato di metilazione del gene *EMP3* è stato determinato su 112/139 gliomi (80,6%) mediante la metodica di MS-PCR (Fig. 41). Il promotore del gene *EMP3* è risultato metilato in 67 casi su 112 (59,2%). Le frequenze di tale alterazione sono riportate in tabella 36.

<i>EMP3</i>	Grado	Metilati		Non Metilati		TOTALE Metilati	
		N	%	N	%	N	%
Oligodendrogliomi N = 75	II (N=47)	35/46	76,1	11/46	23,9	47/75	62,7
	III (N=29)	12/29	41,4	17/29	58,6		
Oligoastrocitomi N = 20	II (N=12)	9/12	75	3/12	25	14/20	70
	III (N=8)	5/8	62,5	3/8	37,5		
Astrocitomi N = 17	II (N=9)	3/9	33,3	6/9	67,7	6/17	35,3
	III (N=8)	3/8	37,5	5/8	62,5		

Tabella 36 Frequenze della metilazione del promotore del gene *EMP3* nella casistica di gliomi suddivisa per istotipo tumorale.

La metilazione del gene *EMP3* non è risultata associata alle neoplasie oligodendrogliali nella casistica di gliomi in esame ($p = 0,4172$). È stata osservata, negli oligodendrogliomi, un'associazione con la presenza della co-delezione totale dei cromosomi 1p e 19q ($p = 0,0466$), le mutazioni dei geni *IDH1/2* ($p = 0,0003$) e, sebbene non statisticamente significativa, con la

metilazione del promotore del gene $p14^{ARF}$ ($p = 0,0609$). È stata inoltre evidenziata una correlazione inversa con lo stato di amplificazione del gene $EGFR$ ($p = 0,0003$).

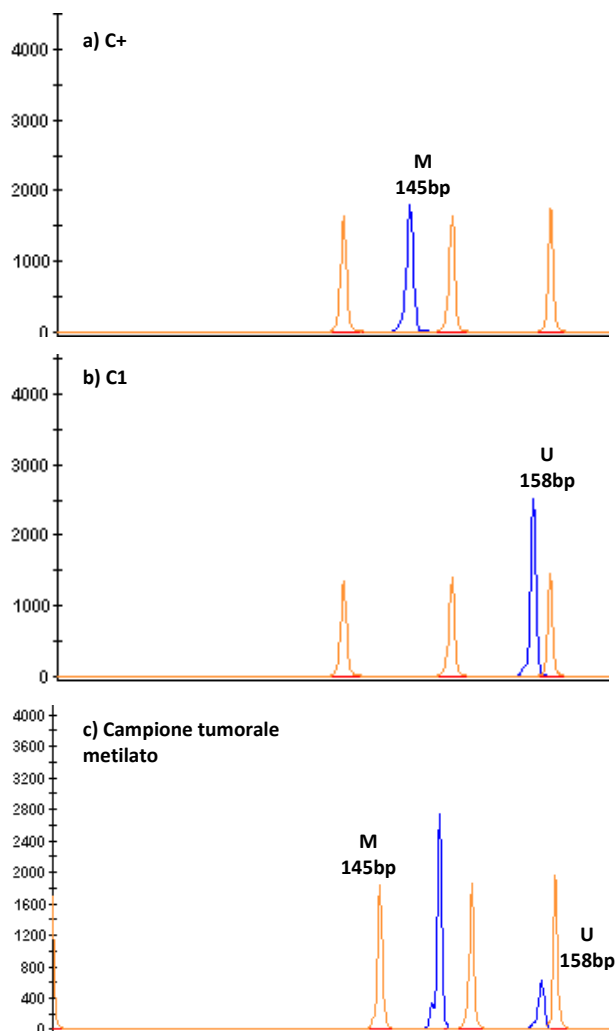


Figura 41 Elettroferogrammi dei frammenti ottenuti dalla reazione di MS-PCR per il gene $EMP3$. In arancione sono visibili i picchi corrispondenti al peso molecolare GeneScan™ 500-Liz (Life Technologies). (a) Campione di riferimento (C+), universalmente metilato (M). (b) Campione di riferimento normale (C1) non metilato (U). (c) Campione tumorale metilato (rapporto M/U > 0,1).

L'analisi di sopravvivenza attraverso il metodo di Kaplan-Meier ha evidenziato che i pazienti affetti da oligodendroglioma con metilazione del gene $EMP3$ possiedono una sopravvivenza maggiore rispetto ai pazienti senza tale alterazione (Log-Rank test, $p = 0,003$) (Tab. 37; Fig. 42).

<i>EMP3</i>			Troncati		Log-Rank (Mantel-Cox)
	N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
Non metilati	22	13	9	40,9%	$\chi^2 = 8,588$ $p = 0,003$
Metilati	41	20	21	51,2%	
Globale	63	33	30	47,6%	

Tabella 37 Frequenze della metilazione del promotore del gene *EMP3* nell'intera casistica di oligodendogliomi relative alla curva di sopravvivenza ottenuta con il metodo di Kaplan-Meier (Fig. 42).

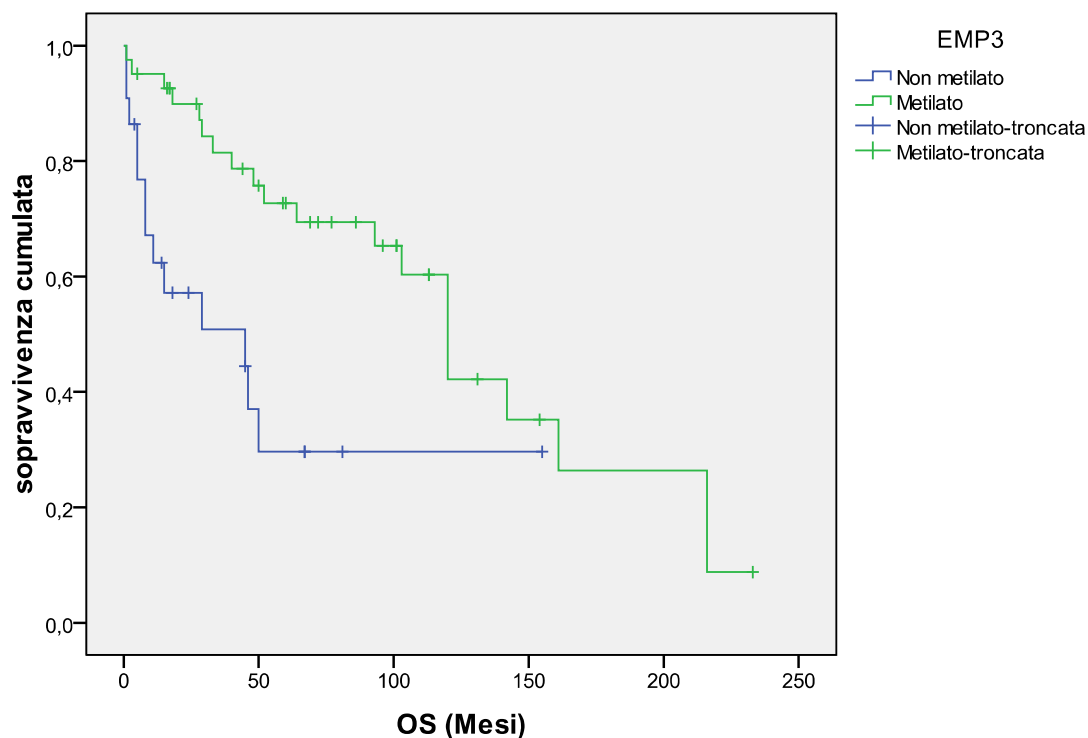


Figura 42 Curva di sopravvivenza con il metodo di Kaplan-Meier per i pazienti con metilazione del gene *EMP3* verso i pazienti senza tale alterazione.

La stratificazione dei pazienti con metilazione del promotore del gene *EMP3* secondo il tipo di trattamento ricevuto di radioterapia, chemioterapia, o combinato di radio- e chemioterapia non ha evidenziato associazioni tra la presenza di questa alterazione e la sopravvivenza dei pazienti (Tab. 38).

TRATTAMENTI	EMP3			Troncati		Log-Rang (Mantel-Cox)
		N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
Nessun Trattamento	Non metilato	2	2	0	0%	$\chi^2 = 2,161$ $p = 0,142$
	Metilato	4	1	3	75%	
	Globale	6	3	3	50%	
RT	Non metilato	1	1	0	0%	$\chi^2 = 2,000$ $p = 0,157$
	Metilato	2	1	1	50%	
	Globale	3	2	1	33,3%	
CHT	Non metilato	3	0	3	100%	$\chi^2 = 0,429$ $p = 0,513$
	Metilato	7	1	6	85,7%	
	Globale	10	1	9	90%	
Terapia combinata RT+CHT	Non metilato	7	5	2	28,6%	$\chi^2 = 2,686$ $p = 0,101$
	Metilato	15	11	4	26,7%	
	Globale	22	16	6	27,3%	

Tabella 38 Stratificazione dei pazienti con metilazione del promotore del gene *EMP3* per i trattamenti ricevuti di radioterapia, chemioterapia o combinati (radioterapia + chemioterapia) relative alle curve di sopravvivenza ottenute con il metodo di Kaplan-Meier.

AMPLIFICAZIONE DEL GENE *EGFR*

Lo stato di amplificazione del gene *EGFR* è stato determinato su 115/139 gliomi (82,7%) mediante co-amplificazione di un frammento del gene *EGFR* e di un frammento del gene *IFN γ* , impiegato come *housekeeping* (Fig. 43). Il gene *EGFR* è risultato amplificato in 14 casi su 115 (12,2%). Le frequenze con tale alterazione sono riportate in tabella 39.

L'amplificazione del gene *EGFR* non è risultata associata, nella casistica in esame, con i tumori oligodendrogliali ($p = 0,5432$). Lo stato di amplificazione del gene *EGFR* è risultato però associato alle delezioni dei geni *p16^{INK4A}* ($p = 0,0024$) e *p14^{ARF}*, quest'ultimo ai limiti della significatività statistica ($p = 0,0530$). Si è inoltre osservata per questa alterazione una correlazione inversa con le mutazioni dei geni *IDH1/2* ($p = 0,0206$), la presenza della co-delezione totale a carico dei cromosomi 1p e 19q ($p = 0,0138$) e la metilazione dei promotori dei geni *EMP3* ($p = 0,0003$), *p14^{ARF}* ($p = 0,0180$) e *p16^{INK4A}*, sebbene al limite della significatività statistica ($p = 0,0518$).

<i>EGFR</i>	Grado	Amplificati		Non Amplificati		TOTALE Amplificati	
		N	%	N	%	N	%
Oligodendrogliomi N = 78	II (N=48)	2/48	4,2	46/48	95,8	11/78	14,1
	III (N=30)	9/30	30	21/30	70		
Oligoastrocitomi N = 15	II (N=12)	0	0	12/12	100	2/15	13,3
	III (N=8)	2/8	25	6/8	75		
Astrocitomi N = 22	II (N=14)	0	0	14/14	100	1/22	4,5
	III (N=8)	1/8	12,5	7/8	87,5		

Tabella 39 Frequenze dello stato di amplificazione del gene *EGFR* nella casistica di gliomi suddivisa per istotipo tumorale.

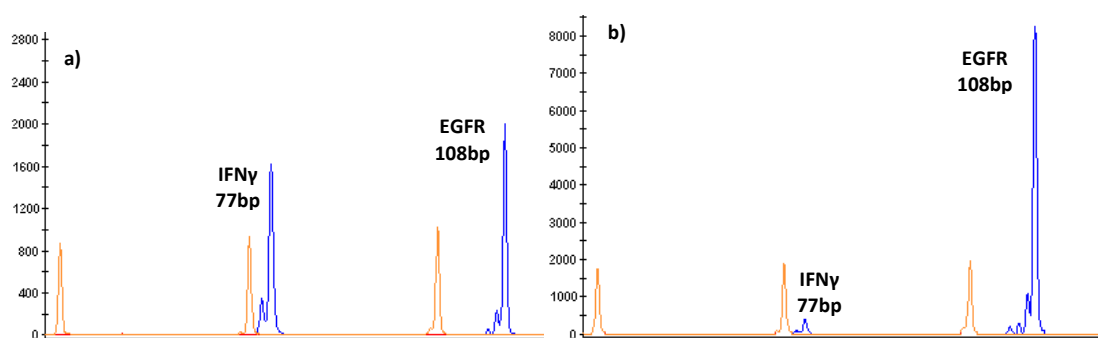


Figura 43 Elettroferogrammi dei frammenti ottenuti dalla co-amplificazione dei frammenti di *EGFR* e *IFNγ*. In arancione sono visibili i picchi corrispondenti al peso molecolare GeneScan™ 500-Liz (Life Technologies). Nel campione di riferimento (a) si possono osservare i picchi corrispondenti a *EGFR* e *IFNγ* con analoga intensità. Il campione nell'elettroferogramma (b) presenta amplificazione del gene *EGFR* osservabile come differenza nell'altezza dei picchi corrispondenti all'amplicone del gene in esame e del gene di riferimento.

L'analisi di sopravvivenza attraverso il metodo di Kaplan-Meier ha evidenziato che lo stato di amplificazione di *EGFR* è correlato ad una minor sopravvivenza dei pazienti con neoplasie oligodendrogliali (Tab. 40; Fig. 44).

<i>EGFR</i>			Troncati		Log-Rank (Mantel-Cox)
	N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
Non amplificato	54	25	29	53,7%	$\chi^2 = 19,601$ $p < 0,0001$
Amplificato	8	7	1	12,5%	
Globale	62	32	30	48,4%	

Tabella 40 Frequenze dello stato di amplificazione del gene *EGFR* nell'intera casistica di oligodendrogliomi relative alla curva di sopravvivenza ottenuta con il metodo di Kaplan-Meier (Fig. 44).

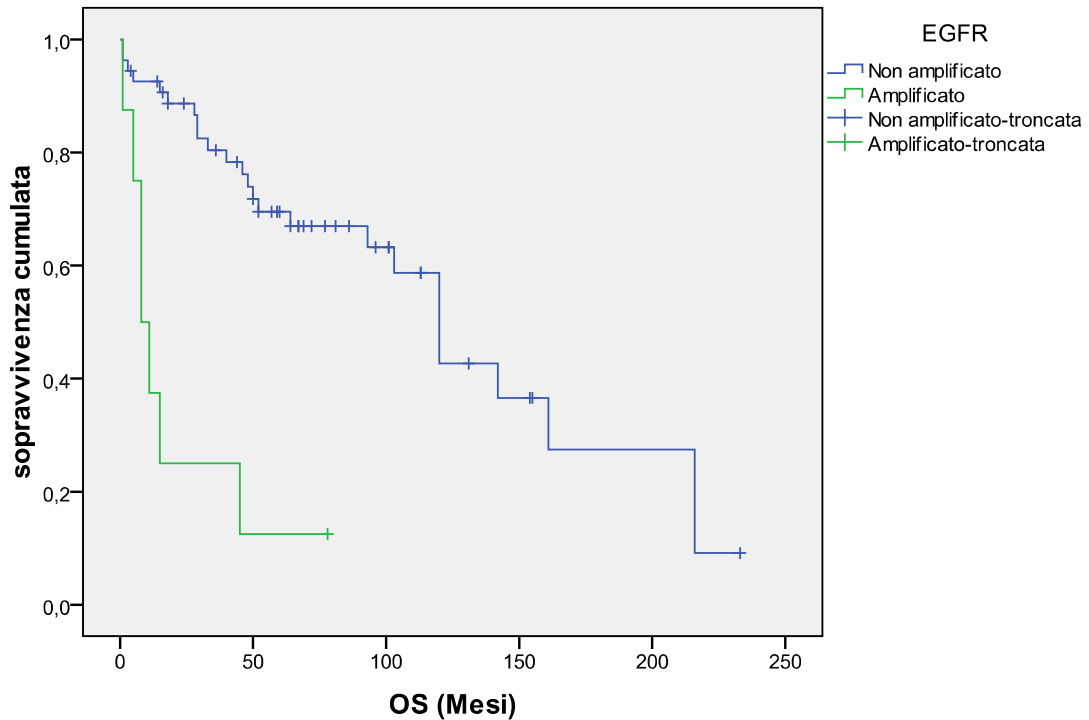


Figura 44 Curva di sopravvivenza con il metodo di Kaplan-Meier per i pazienti con amplificazione del gene *EGFR* verso i pazienti senza tale alterazione.

La stratificazione dei pazienti, con amplificazione del gene *EGFR*, secondo il tipo di trattamento ricevuto di radioterapia, chemioterapia, o combinato di radio- e chemioterapia non ha evidenziato una correlazione con la sopravvivenza dei pazienti (Tab. 41).

TRATTAMENTI	EGFR			Troncati		Log-Rank (Mantel-Cox)
		N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
Nessun trattamento	Non amplificato	2	1	1	50%	-
	Amplificato	1	1	0	0%	
	Globale	3	2	1	33,3%	
RT	Non amplificato	2	1	1	50%	-
	Amplificato	1	1	0	0%	
	Globale	3	2	1	33,3%	
CHT	Non amplificato	9	1	8	88,9%	$\chi^2 = 0,167$ $p = 0,683$
	Globale	9	1	8	88,9%	
Terapia combinato RT+CHT	Non amplificato	18	13	5	27,8%	$\chi^2 = 1,591$ $p = 0,207$
	Amplificato	4	3	1	25%	
	Globale	22	16	6	27,3%	

Tabella 41 Stratificazione dei pazienti con amplificazione del gene *EGFR* per i trattamenti ricevuti di radioterapia, chemioterapia o combinati (radioterapia + chemioterapia) relativa alle curve di sopravvivenza ottenute con il metodo di Kaplan-Meier.

MUTAZIONI DEL GENE *TP53*

Lo stato mutazionale del gene *TP53* è stato determinato, mediante sequenziamento diretto, su 107/139 gliomi (77%) (Tab. 42). Il gene *TP53* è risultato mutato in 34 casi su 107 (31,8%). Le frequenze con tale alterazione sono riportate in tabella 43.

<i>TP53</i>	Istotipo	Variazione nucleotidica	Variazione amminoacidica
Introne 3	Oligodendroglioma	IVS3-3C>T	-
Esone 4	Oligodendroglioma	c.100C>T c.375G>A	p.P34S* p.T125T
	Astrocitoma	c.124G>A c.337T>G	p.D42N* p.F113V
Esone 5	Oligodendroglioma	c.380C>T c.448A>G c.503A>G	p.S127F p.T150A p.H168R
	Oligoastrocitoma	c.455C>T	p.P151L
	Astrocitoma	c.501delG c.505A>G	p.Q167HfsX2* p.M169V
Esone 6	Oligodendroglioma	c.585C>T c.606T>C c.659A>C	p.I195I p.R202R p.Y220C
	Oligoastrocitoma	c.581T>C c.589G>A c.659A>G c.693A>G	p.L194P p.V197M* p.Y220C p.R213R
	Astrocitoma	c.630C>T c.584C>T	p.N210N p.I195T
Introne 6	Oligodendroglioma	IV6+1G>A	-
Esone 7	Oligodendroglioma	c.707A>G c.748G>A c.773A>G	p.Y236C* p.R248Q p.E258G
	Oligoastrocitoma	c.701A>G c.733G>A	p.Y234C p.G245S
	Astrocitoma	c.707A>G	p.T236C
Introne 7	Astrocitoma	IVS7-9C>T	-
Esone 8	Oligodendroglioma	c.787A>G c.814G>T c.817C>T c.821T>C c.849C>T c.868C>T	p.N263D p.V272L p.R273C p.V274A p.R283R p.R290C
	Oligoastrocitoma	c.814G>A c.817C>T c.856G>A	p.V272L p.R273C p.E286K
	Astrocitoma	c.813G>A c.865C>T	p.E271E p.L289F
Esone 10	Astrocitoma	c.1009C>T	p.R337C

Tabella 42 Mutazioni del gene *TP53* identificate nella casistica in esame. Le variazioni introniche identificate sono responsabili di varianti di *splicing*. In grassetto sono riportati i codoni *hotspot* di mutazione. Le variazioni identificate *de novo* nei gliomi sono indicate da un asterisco (*).

TP53	Grado	Mutati		Wild-Type		TOTALE Mutati	
		N	%	N	%	N	%
Oligodendrogliomi N = 69	II (N=42)	11/42	26,2	31/42	73,8	16/69	23,2
	III (N=27)	5/27	18,5	22/27	81,5		
Oligoastrocitomi N = 15	II (N=8)	6/8	75	2/8	25	9/15	60
	III (N=7)	3/7	42,9	4/7	57,1		
Astrocitomi N = 23	II (N=16)	6/16	37,5	10/16	62,5	9/20	39,1
	III (N=7)	3/7	42,9	4/7	57,1		

Tabella 43 Frequenze delle mutazioni del gene *TP53* nella casistica di gliomi suddivisa per istotipo tumorale.

Le mutazioni dei geni *TP53* sono risultate inversamente correlate all'istologia oligodendrogliale del tumore ($p = 0,0163$).

L'analisi di sopravvivenza attraverso il metodo di Kaplan-Meier ha mostrato che le mutazioni a carico del gene *TP53* non sono associate alla sopravvivenza totale dei pazienti affetti da oligodendroglioma (Log-Rank, $p = 0,701$) (Tab. 44).

TP53			Troncati		Log-Rank (Mantel-Cox)
	N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
Wild-type	41	22	19	46,3%	$\chi^2 = 0,147$ $p = 0,701$
Mutato	13	7	6	46,2%	
Globale	54	29	25	46,3%	

Tabella 44 Frequenze delle mutazioni a carico del gene *TP53* nell'intera casistica di oligodendrogliomi relative alla curva di sopravvivenza ottenuta con il metodo di Kaplan-Meier.

La stratificazione dei pazienti, con mutazioni del gene *TP53*, secondo il tipo di trattamento ricevuto di radioterapia, chemioterapia, o combinato di radio- e chemioterapia ha evidenziato che la presenza di tali alterazioni non è associata alla sopravvivenza totale dei pazienti (Tab. 45).

TRATTAMENTO	TP53			Troncati		Log-Rank (Mantel-Cox)
		N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
Nessun trattamento	Wild-type	6	5	1	16,7%	$\chi^2 = 2,500$ $p = 0,114$
	Globale	6	5	1	16,7%	
RT	Wild-type	3	2	1	33,3%	-
	Globale	3	2	1	33,3%	
CHT	Wild-type	6	1	5	83,3%	-
	Mutato	1	0	1	100%	
	Globale	7	1	6	85,7%	
Trattamento combinato RT+CHT	Wild-type	10	6	4	40%	$\chi^2 = 0,100$ $p = 0,752$
	Mutato	10	7	3	30%	
	Globale	20	13	7	35%	

Tabella 45 Stratificazione dei pazienti con mutazioni del gene *TP53* per i trattamenti ricevuti di radioterapia, chemioterapia o combinati (radioterapia + chemioterapia) relativa alle curve di sopravvivenza ottenute con il metodo di Kaplan-Meier.

DELEZIONE DEI *LOCI CDKN2A E CDKN2B*

Le delezioni dei geni *p14^{ARF}*, *p16^{INK4A}* e *p15^{INK4B}* sono state determinate mediante MS-MLPA® su 76/93 oligodendrogliomi (81,7%) e su 15/20 oligoastrocitomi (75%) (Fig. 45 e 46).

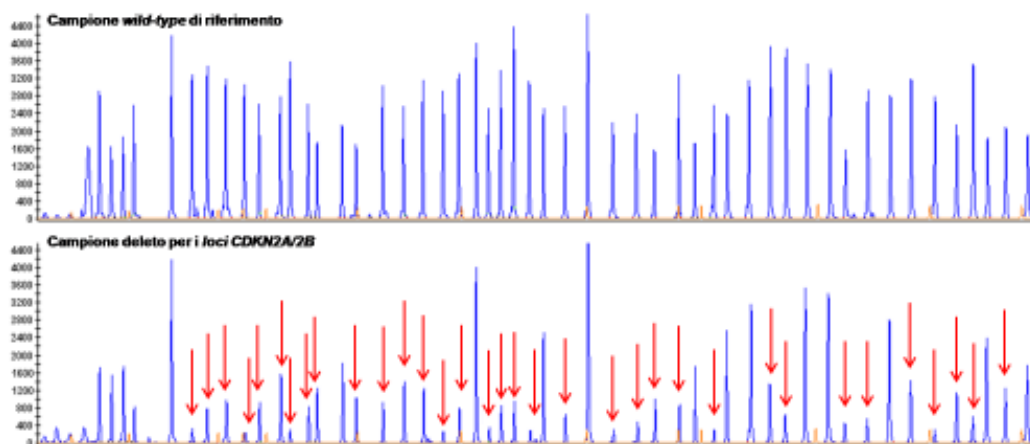


Figura 45 Elettroferogrammi di un campione normale di riferimento e di un campione con delezione dei *loci CDKN2A/2B*. I picchi arancioni corrispondono al peso molecolare GeneScan™ 500-Liz (Life Technologies). Le frecce indicano la riduzione dei picchi corrispondenti alle sonde specifiche per i *loci* in esame.

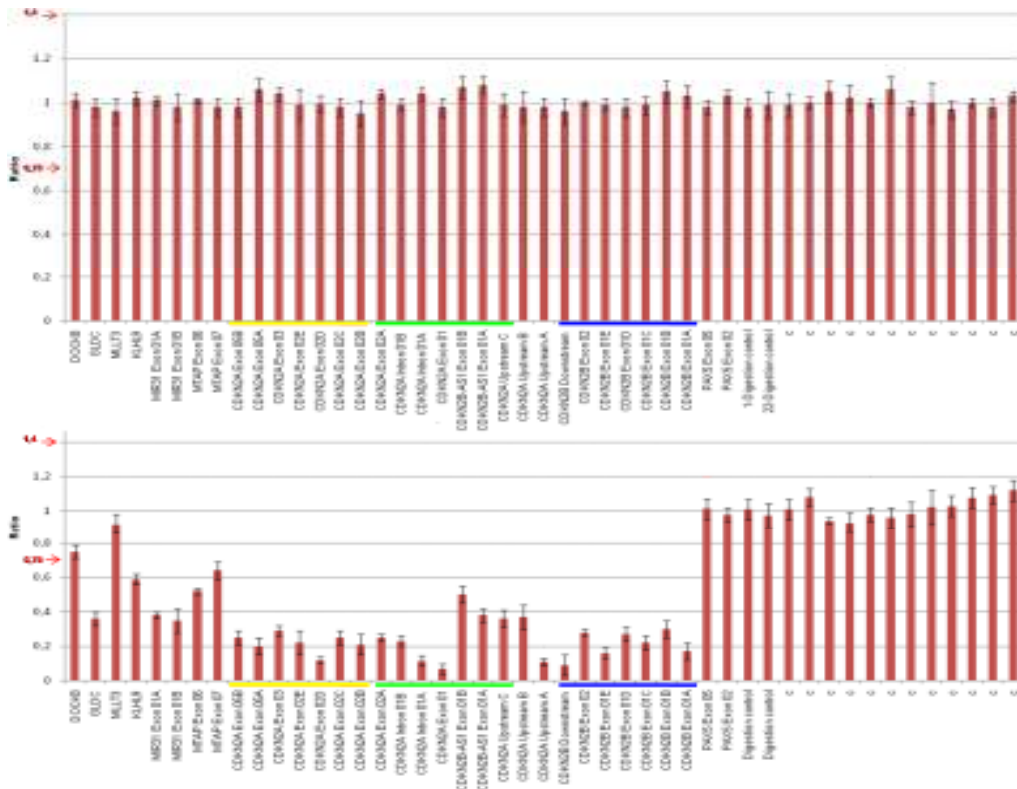


Figura 46 Grafici a colonne di un campione normale di riferimento e di un campione con delezione dei *loci CDKN2A/2B* ottenuti dall'elaborazione mediante Coffalyser® dei dati ottenuti dalla reazione MS-MLPA®. Il *Ratio* è il valore normalizzato corrispondente alle singole sonde. In rosso sono indicati i valori del *cut-off* di normalità ($0,75 < X < 1,4$). Le sonde evidenziate dalla linea gialla corrispondono al gene $p16^{INK4A}$, dalla linea verde al gene $p14^{ARF}$ e dalla linea al gene $p15^{INK4B}$.

Le frequenze delle delezioni a carico dei *loci CDKN2A/2B* per la casistica analizzata sono riportate in tabella 46.

<i>CDKN2A/2B</i>		Grado	Deleti		Non Deleti		TOTALE Deleti	
			N	%	N	%	N	%
$p16^{INK4A}$	Oligodendrogliomi N = 76	II (N=48)	12/48	25	36	75	26/76	34,2
		III (N=28)	14/28	50	14/28	50		
	Oligoastrocitomi N = 15	II (N=9)	3/9	33,3	6/9	66,7	8/15	53,3
		III (N=6)	5/6	83,6	1/6	16,7		
$p14^{ARF}$	Oligodendrogliomi N = 76	II (N=48)	15/48	31,3	33/48	68,8	30/76	39,5
		III (N=28)	15/28	53,6	13/28	46,4		
	Oligoastrocitomi N = 15	II (N=9)	4/9	44,4	5/9	55,6	9/15	60
		III (N=6)	5/6	83,6	1/6	16,7		
$p15^{INK4B}$	Oligodendrogliomi N = 76	II (N=48)	11/48	22,9	37/48	77,1	23/76	30,3
		III (N=28)	12/28	42,9	16/28	57,2		
	Oligoastrocitomi N = 15	II (N=9)	3/9	33,3	6/9	67,7	7/15	46,7
		III (N=6)	4/6	66,7	2/6	33,3		

Tabella 46 Frequenze delle delezioni dei *loci CDKN2A/2B* nella casistica di gliomi suddivisa per istotipo tumorale.

Le delezioni dei geni $p16^{INK4A}$, $p14^{ARF}$ e $p15^{INK4B}$ non sono risultate associate all'istologia oligodendrogliale nella casistica in esame ($p = 1,0000$; $p = 0,0845$; $p = 0,5983$).

La delezione del gene $p16^{INK4A}$, negli oligodendrogliomi, è risultata correlata alle delezioni dei geni $p14^{ARF}$ ($p < 0,0001$) e $p15^{INK4B}$ ($p < 0,0001$) e all'amplificazione genica di $EGFR$ ($p = 0,0024$). Questa alterazione è risultata inoltre inversamente associata alla metilazione del promotore di $p14^{ARF}$ ($p = 0,0283$) e dello stesso $p16^{INK4A}$ ($p = 0,0208$).

La delezione del gene $p14^{ARF}$ è risultata anch'essa correlata alle delezioni dei geni $p16^{INK4A}$ ($p < 0,0001$) e $p15^{INK4B}$ ($p < 0,0001$) e, ai limiti della significatività statistica, all'amplificazione del gene $EGFR$ ($p = 0,0530$). Questa alterazione è risultata inoltre inversamente associata alla metilazione del promotore di $p16^{INK4A}$ ($p = 0,0127$).

La delezione del gene $p15^{INK4B}$ è risultata correlata alle delezioni dei geni $p16^{INK4A}$ ($p < 0,0001$) e $p14^{ARF}$ ($p < 0,0001$) ed inversamente associata, in modo non statisticamente significativo, alla metilazione del promotore di $p16^{INK4A}$ ($p = 0,0628$).

L'analisi di sopravvivenza attraverso il metodo di Kaplan-Meier ha evidenziato che nessuna di queste alterazioni risulta associata alla sopravvivenza totale dei pazienti affetti da oligodendroglioma (Tab. 47).

CDKN2A/2B				Troncati		Log-Rang (Mantel-Cox)
		N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
$p16^{INK4A}$	Non deleto	40	16	24	60%	$\chi^2 = 2,313$ $p = 0,128$
	Deleto	19	11	8	42,1%	
	Globale	59	27	32	54,2%	
$p14^{ARF}$	Non deleto	36	15	21	58,3%	$\chi^2 = 1,410$ $p = 0,235$
	Deleto	23	12	11	47,8%	
	Globale	59	27	32	54,2%	
$p15^{INK4B}$	Non deleto	42	17	25	59,5%	$\chi^2 = 1,449$ $p = 0,229$
	Deleto	17	10	7	41,2%	
	Globale	59	27	32	54,2%	

Tabella 47 Frequenze delle delezioni dei loci $CDKN2A/2B$ nella casistica di oligodendrogliomi. Le curve di sopravvivenza con il metodo di Kaplan-Meier non hanno evidenziato una correlazione con la sopravvivenza totale dei pazienti.

La stratificazione dei pazienti, con delezioni a carico dei loci $CDKN2A/2B$, secondo il tipo di trattamento ricevuto di radioterapia, chemioterapia, o combinato di radio- e chemioterapia ha evidenziato che la presenza di tali alterazioni non è associata alla sopravvivenza totale dei pazienti (Tab. 48).

TRATTAMENTO	<i>p16^{INK4A}</i>	(A)		Troncati		Log-Rang (Mantel-Cox)
		N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
Nessun trattamento	<i>Wild-type</i>	3	0	3	100%	$\chi^2 = 2,500$ $p = 0,114$
	Deleto	3	2	1	33,3%	
	Globale	6	2	4	66,7%	
RT	<i>Wild-type</i>	1	0	1	100%	-
	Deleto	1	1	0	0%	
	Globale	2	1	1	50%	
CHT	<i>Wild-type</i>	5	0	5	100%	-
	Deleto	2	0	2	100%	
	Globale	7	0	7	100%	
Terapia combinata RT+CHT	<i>Wild-type</i>	14	8	6	42,9%	$\chi^2 = 1,000$ $p = 0,752$
	Deleto	6	5	1	16,7%	
	Globale	20	13	7	35%	

TRATTAMENTO	<i>p14^{ARF}</i>	(B)		Troncati		Log-Rang (Mantel-Cox)
		N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
Nessun trattamento	<i>Wild-type</i>	3	0	3	100%	$\chi^2 = 2,500$ $p = 0,114$
	Deleto	3	2	1	33,3%	
	Globale	6	2	4	66,7%	
RT	Deleto	2	1	1	50%	-
	Globale	2	1	1	50%	
CHT	<i>Wild-type</i>	6	0	6	100%	-
	Deleto	1	0	1	100%	
	Globale	7	0	7	100%	
Terapia combinata RT+CHT	<i>Wild-type</i>	11	7	4	36,4%	$\chi^2 = 0,068$ $p = 0,794$
	Deleto	9	6	3	33,3%	
	Globale	20	13	7	35%	

TRATTAMENTO	$p15^{INK4B}$	(C)		Troncati		Log-Rang (Mantel-Cox)
		N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
Nessun trattamento	Wild-type	3	0	3	100%	$\chi^2 = 2,500$ $p = 0,114$
	Mutato	3	2	1	33,3%	
	Globale	6	2	4	66,7%	
RT	Mutat0	2	1	1	50%	-
	Globale	2	1	1	50%	
CHT	Wild-type	6	0	6	100%	-
	Mutato	1	0	1	100%	
	Globale	7	0	7	100%	
Terapia combinata RT+CHT	Wild-type	14	8	6	42,9%	$\chi^2 = 0,201$ $p = 0,654$
	Mutato	6	5	1	16,7%	
	Globale	20	13	7	35%	

Tabelle 48 Stratificazione dei pazienti con delezioni dei geni $p14^{ARF}$ (A), $p16^{INK4A}$ (B) e $p15^{INK4B}$ (C) per i trattamenti ricevuti di radioterapia, chemioterapia o combinati (radioterapia + chemioterapia) relativa alle curve di sopravvivenza ottenute con il metodo di Kaplan-Meier.

METILAZIONE DEI *LOCI CDKN2A E CDKN2B*

Lo stato di metilazione dei geni $p14^{ARF}$, $p16^{INK2A}$ e $p15^{INK4B}$ è stato determinato mediante MS-MLPA® su 74/93 oligodendrogliomi (79,6%) e su 12/20 oligoastrocitomi (60%) (Fig. 47).

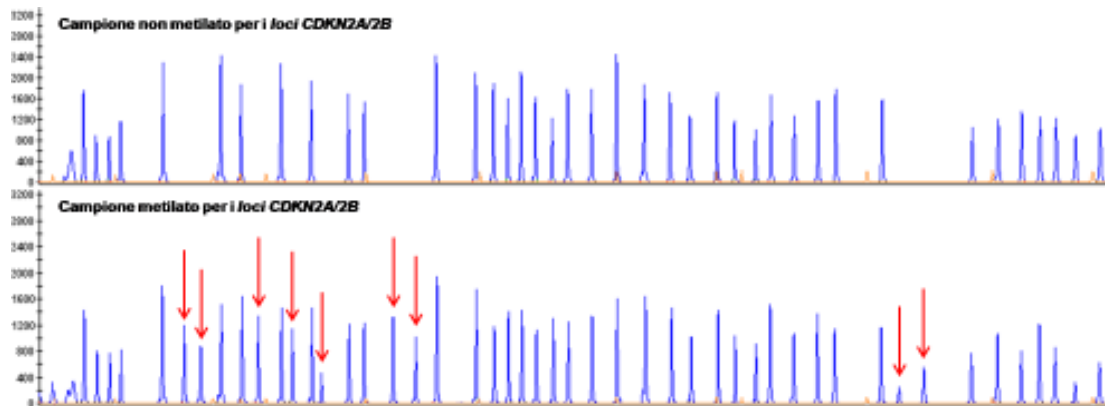


Figura 47 Elettroferogrammi di un campione normale di riferimento e di un campione con metilazione dei promotori dei geni $p14^{ARF}$, $p16^{INK4A}$ e $p15^{INK4B}$. I picchi arancioni corrispondono al peso molecolare GeneScan™ 500-Liz (Life Technologies). Le frecce indicano le sonde con il sito specifico per l'enzima di restrizione HhaI (Promega) e quindi specifiche per l'analisi di metilazione. Sono state considerate indice di metilazione le sonde con valore > 0,1 e quindi con metilazione > 10%.

Le frequenze della metilazione dei promotori dei geni $p14^{ARF}$, $p16^{INK4A}$ e $p15^{INK4B}$ per la casistica analizzata sono riportate in tabella 49.

CDKN2A/2B		Grado	Metilati		Non Metilati		TOTALE Metilati	
			N	%	N	%	N	%
p16^{INK4A}	Oligodendrogliomi N = 74	II (N=47)	37/47	78,7	10/47	21,3	47/74	63,5
		III (N=27)	10/27	37	17/27	63		
	Oligoastrocitomi N = 12	II (N=7)	6/7	85,7	1/7	14,3	8/12	66,7
		III (N=5)	2/5	40	3/5	60		
p14^{ARF}	Oligodendrogliomi N = 74	II (N=47)	33/47	70,2	14/47	29,8	43/74	58,1
		III (N=27)	10/27	37	17/27	63		
	Oligoastrocitomi N = 12	II (N=7)	5/7	51,4	2/7	28,6	6/12	50
		III (N=5)	1/5	20	4/5	80		
p15^{INK4B}	Oligodendrogliomi N = 74	II (N=47)	26/47	55,3	21/47	44,7	34/40	45,9
		III (N=27)	8/27	29,6	19/27	70,4		
	Oligoastrocitomi N = 12	II (N=7)	3/7	42,9	4/7	57,1	4/12	33,3
		III (N=5)	1/5	20	4/5	80		

Tabella 49 Frequenze della metilazione dei promotori dei geni $p14^{ARF}$, $p16^{INK4A}$ e $p15^{INK4B}$ nella casistica di gliomi suddivisa per istotipo tumorale.

La metilazione dei geni $p16^{INK4A}$, $p14^{ARF}$ e $p15^{INK4B}$ non sono risultate associate con l'istologia oligodendrogliale nella casistica in esame ($p = 1,0000$; $p = 0,7551$; $p = 0,5367$).

La metilazione del promotore del gene $p16^{INK4A}$, negli oligodendrogliomi, è risultata correlata alla metilazione dei promotori dei geni $p14^{ARF}$ ($p < 0,0001$) e $p15^{INK4B}$ ($p < 0,0001$). Essa è inoltre inversamente associata alle delezioni di $p14^{ARF}$ ($p = 0,0127$), dello stesso $p16^{INK4A}$ ($p = 0,0208$). Si è inoltre evidenziata un'associazione inversa ai limiti della significatività statistica con l'amplificazione genica di $EGFR$ ($p = 0,0518$) e, in modo non statisticamente significativo, con la delezione del gene $p15^{INK4B}$ ($p = 0,0628$).

La metilazione del promotore del gene $p14^{ARF}$ è risultata anch'essa correlata alla metilazione dei promotori dei geni $p16^{INK4A}$ ($p < 0,0001$) e $p15^{INK4B}$ ($p = 0,0045$) e, ai limiti della significatività statistica con le mutazioni dei geni $IDH1/2$ ($p = 0,0504$). È risultata un'associazione, non statisticamente significativa, con la presenza della co-delezione totale dei cromosomi 1p e 19q ($p = 0,0609$) e con la metilazione del gene $EMP3$ ($p = 0,0609$). È stata evidenziata una correlazione inversa con l'amplificazione del $EGFR$ ($p = 0,0180$), le mutazioni del gene $TP53$ ($p = 0,0464$) e la delezione del gene $p16^{INK4A}$ ($p = 0,0283$).

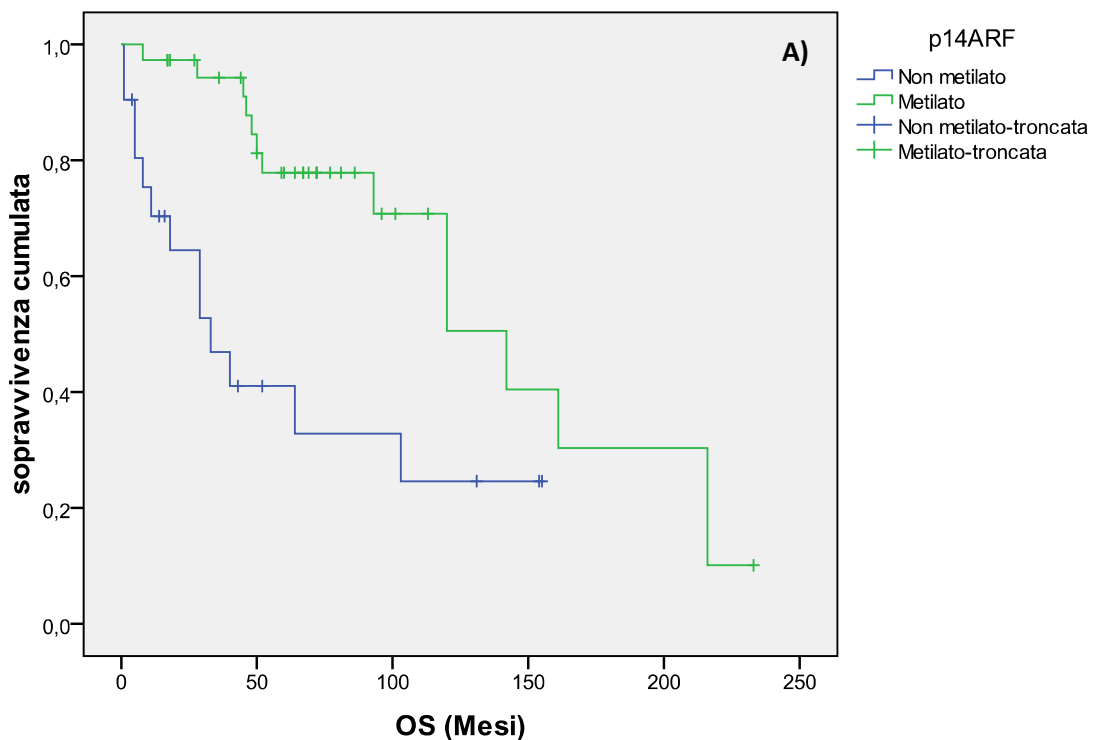
La metilazione del promotore del gene $p15^{INK4B}$ è invece risultata correlata alla metilazione dei promotori dei geni $p16^{INK4A}$ ($p < 0,0001$) e $p14^{ARF}$ ($p = 0,0045$).

L'analisi di sopravvivenza attraverso il metodo di Kaplan-Meier ha evidenziato che la metilazione dei promotori dei geni $p16^{INK4A}$ e $p14^{ARF}$ risulta essere associata ad una maggior

sopravvivenza totale dei pazienti affetti da oligodendroglioma (Log-Rank, $p = 0,009$ e $p = 0,002$) (Tab. 50; Fig. 48).

CDKN2A/2B				Troncati		Log-Rang (Mantel-Cox)
		N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
<i>p16^{INK4A}</i>	Non metilato	21	15	6	28,6%	$\chi^2 = 6,758$ $p = 0,009$
	Metilato	37	12	25	67,6%	
	Globale	58	27	31	53,4%	
<i>p14^{ARF}</i>	Non metilato	21	13	8	38,1%	$\chi^2 = 9,818$ $p = 0,002$
	Metilato	37	14	23	62,2%	
	Globale	58	27	31	53,4%	
<i>p15^{INK4B}</i>	Non metilato	32	17	15	46,9%	$\chi^2 = 1,983$ $p = 0,159$
	Metilato	26	10	16	61,5%	
	Globale	58	27	31	53,4%	

Tabella 50 Frequenza della metilazione dei promotori dei geni *p14^{ARF}*, *p16^{INK4A}* e *p15^{INK4B}* nella casistica di oligodendrogliomi. Le curve di sopravvivenza con il metodo di Kaplan-Meier hanno evidenziato un'associazione tra la metilazione dei promotori dei geni *p14^{ARF}* e *p16^{INK4A}* ed una maggior sopravvivenza totale dei pazienti con oligodendroglioma (Fig. 46).



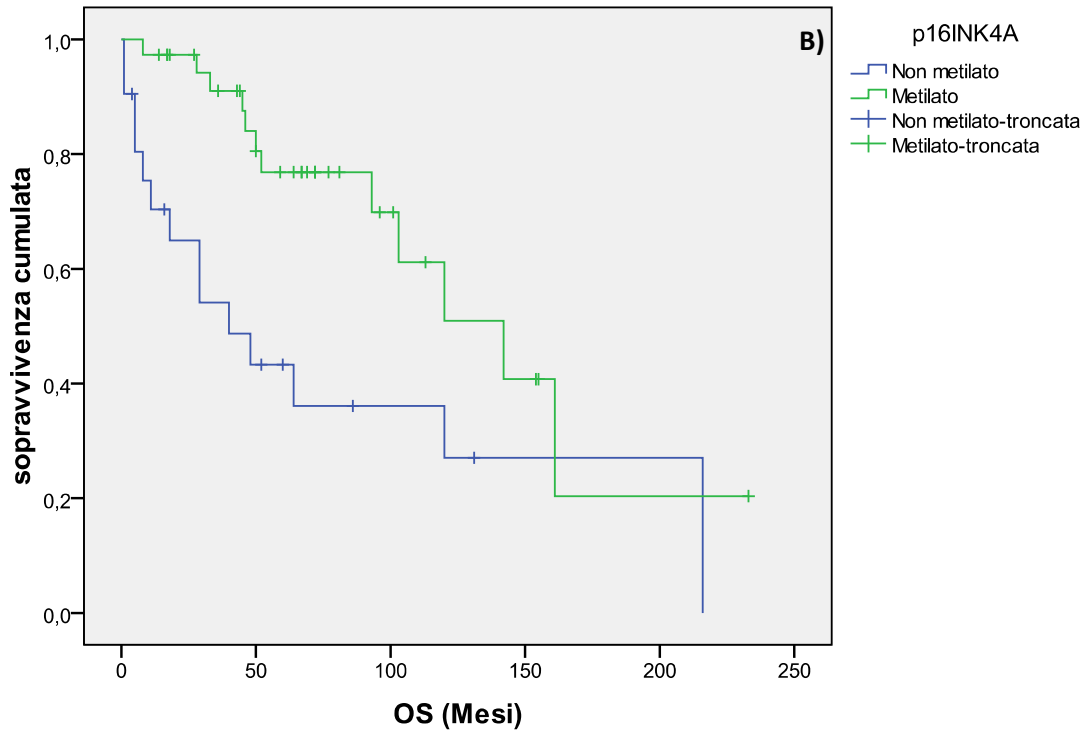


Figura 48 Curve di sopravvivenza con il metodo di Kaplan-Meier che illustrano l'associazione tra la metilazione dei promotori dei geni $p14^{ARF}$ (A) e $p16^{INK4A}$ (B) e la sopravvivenza totale dei pazienti affetti da oligodendroglioma.

La stratificazione dei pazienti, con metilazione dei promotori dei loci *CDKN2A/2B*, secondo il tipo di trattamento ricevuto di radioterapia, chemioterapia, o combinato di radio- e chemioterapia ha evidenziato che la presenza della metilazione di $p14^{ARF}$ è associata ad una maggior sopravvivenza dei pazienti trattati con radio- e chemioterapia (Tab. 51; Fig. 49).

TRATTAMENTO	$p16^{INK4A}$	(A)		Troncati		Log-Rang (Mantel-Cox)
		N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
Nessun trattamento	Non metilato	2	2	0	0%	$\chi^2 = 5,000$ $p = 0,025$
	Metilato	4	0	4	100%	
	Globale	6	2	4	66,7%	
RT	Metilato	2	1	1	50%	-
	Globale	2	1	1	50%	
CHT	Non metilato	2	0	2	100%	-
	Metilato	5	0	5	100%	
	Globale	7	0	7	100%	
Terapia combinata RT+CHT	Non metilato	9	7	2	22,2%	$\chi^2 = 1,586$ $p = 0,208$
	Metilato	11	6	5	45,5%	
	Globale	20	13	7	35%	

TRATTAMENTO	$p14^{ARF}$	(B)		Troncati		Log-Rang (Mantel-Cox)
		N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
Nessun trattamento	Non metilato	2	2	0	0%	$\chi^2 = 5,000$ $p = 0,025$
	Metilato	4	0	4	100%	
	Globale	6	2	4	66,7%	
RT	Non metilato	1	1	0	0%	-
	Metilato	1	0	1	100%	
	Globale	2	1	1	50%	
CHT	Non metilato	2	0	2	100%	-
	Metilato	5	0	5	100%	
	Globale	7	0	7	100%	
Terapia combinata RT+CHT	Non metilato	7	5	2	28,6%	$\chi^2 = 11,242$ $p = 0,001$
	Metilato	13	8	5	38,5%	
	Globale	20	13	7	35%	

TRATTAMENTO	$p15^{INK4B}$	(C)		Troncati		Log-Rang (Mantel-Cox)
		N totale	N. di eventi	N	Percentuale	
Nessun Trattamento	Non metilato	3	2	1	33,3%	$\chi^2 = 2,500$ $p = 0,114$
	Metilato	3	0	3	100%	
	Globale	6	2	4	66,7%	
RT	Non metilato	1	1	0	0%	-
	Metilato	1	0	1	100%	
	Globale	2	1	1	50%	
CHT	Non metilato	4	0	4	100%	-
	Metilato	3	0	3	100%	
	Globale	7	0	7	100%	
Terapia combinata RT+CHT	Non metilato	8	6	2	25%	$\chi^2 = 1,504$ $p = 0,220$
	Metilato	12	7	5	41,7%	
	Globale	20	13	7	35%	

Tabelle 51 Stratificazione dei pazienti con metilazione dei promotori dei geni $p14^{ARF}$ (A), $p16^{INK4A}$ (B) e $p15^{INK4B}$ (C) per i trattamenti ricevuti di radioterapia, chemioterapia o combinati (radioterapia + chemioterapia) relativa alle curve di sopravvivenza ottenute con il metodo di Kaplan-Meier.

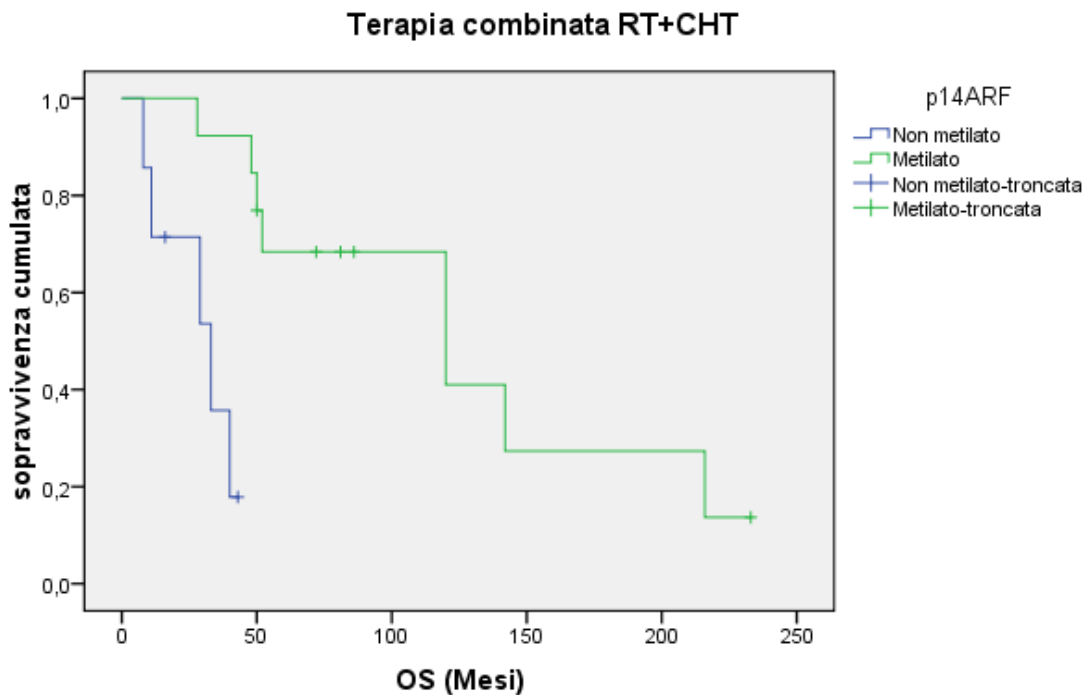


Figura 49 Curva di sopravvivenza con il metodo di Kaplan-Meier per i pazienti con metilazione del promotore del gene $p14^{ARF}$ sottoposti al trattamento al trattamento combinato di radio- e chemioterapia.

ANALISI MULTIVARIATA

Al fine d'identificare, nella casistica di oligodendrogliomi in esame, gli eventuali fattori prognostici indipendenti tra i marcatori molecolari analizzati è stata effettuata l'analisi multivariata con il modello di regressione di Cox.

Le mutazioni a carico dei geni $IDH1/2$ sono risultate il più potente fattore prognostico indipendente, seguite dalla metilazione del promotore del gene $p14^{ARF}$ (Tab. 52).

VARIABILI	<i>p</i> (Log-Rank test)
Co-delezione totale di 1p/19q	0,324
Mutazioni di $IDH1/2$	0,002
Metilazione di $EMP3$	0,199
Metilazione di $MGMT$	0,927
Metilazione di $p14^{ARF}$	0,028
Metilazione di $p16^{INK4A}$	0,061

Tabella 52 Analisi multivariata delle variabili indagate.

TABELLA RIASSUNTIVA

Nella seguente tabella sono riportati i risultati dei significati prognostici e predittivi e degli studi di associazione tra le variabili indagate identificate nella casistica in esame di oligodendrogliomi (Tab. 53).

MARCATORE	DIAGNOSTICO Associazione con l'istologia oligodendrogliale	PROGNOSTICO (OS)	PREDITTIVO Trattamento combinato RT + CHT
	<i>p</i> (Log-Rank test)	<i>p</i> (Log-Rank test)	<i>p</i> (Log-Rank test)
Co-delezione totale di 1p/19q	< 0,0001	0,004	0,009
Metilazione di <i>MGMT</i>	0,0162	0,041*	0,008
Mutazioni di <i>IDH1/2</i>	-	< 0,0001	-
Metilazione di <i>EMP3</i>	-	0,003	-
Amplificazione di <i>EGFR</i>	-	< 0,0001 ⁺	-
Mutazioni di <i>TP53</i>	0,0163 ⁺	-	-
Delezione di <i>p16^{INK4A}</i>	-	-	-
Delezione di <i>p14^{ARF}</i>	-	-	-
Delezione di <i>p15^{INK4B}</i>	-	-	-
Metilazione di <i>p16^{INK4A}</i>	-	0,009	-
Metilazione di <i>p14^{ARF}</i>	-	0,002	0,001
Metilazione di <i>p15^{INK4B}</i>	-	-	-

Tabella 53 Significati diagnostici (associazione all'istologia oligodendrogliale del tumore), prognostici e predittivi di risposta al trattamento combinato RT+CHT dei marcatori esaminati nella casistica di oligodendrogliomi. Tali valori sono stati identificati dall'analisi delle curve di sopravvivenza ottenute con il metodo di Kaplan-Meier. (*) Statisticamente significativo solo negli oligodendrogliomi di III grado. (+) Correlazione inversa.

4 Discussione

DISCUSSIONE

I gliomi rappresentano la metà dei tumori del Sistema Nervoso Centrale. A causa del loro ampio spettro morfologico, la loro classificazione dipende in gran parte dalle caratteristiche istologiche del tumore [2].

In generale i gliomi sono ritenuti delle neoplasie non curabili ma il loro trattamento negli ultimi anni ha subito grossi cambiamenti. I nuovi approcci chirurgici, di radioterapia e di chemioterapia hanno infatti contribuito a migliorare la qualità di vita dei pazienti con neoplasie di diverso grado di malignità. Tra i principali fattori di questi progressi vi sono anche gli sviluppi della diagnostica molecolare.

La classificazione dei tumori del SNC stabilita dal WHO (2007) divide i gliomi in astrocitari, il più frequente e maligno dei quali è il GBM, oligodendrogliali e misti [2]. Gli oligodendrogliomi nella loro rarità (0,2 casi/100000 individui/anno) hanno generalmente prognosi più favorevole rispetto agli altri tipi di glioma. L'esame istopatologico del tessuto tumorale rappresenta il *gold standard* per la diagnosi e la classificazione dei gliomi e negli ultimi anni è stato affiancato da approcci molecolari di analisi. I differenti tipi tumorali possiedono fenotipi diversi con valore diagnostico, ma anche prognostico e predittivo di risposta alle terapie farmacologiche e radioterapiche. La diagnosi istologica, corroborata dall'analisi molecolare assume quindi un'importanza fondamentale.

Diversi marcatori molecolari sono divenuti negli ultimi anni oggetto di studio per una migliore classificazione e prognosi dei gliomi e per l'istituzione di una migliore e più specifica strategia terapeutica [11-12].

Lo scopo di questo lavoro è consistito nello studio di alcune alterazioni molecolari (co-delezione dei cromosomi 1p/19q, metilazione del promotore dei geni *MGMT* e *EMP3*, mutazioni a carico dei geni *IDH1/2* e *TP53*, amplificazione del gene *EGFR*), in una casistica costituita da 93 oligodendrogliomi di II e III grado. Le frequenze di tali alterazioni sono state confrontate con quelle osservate in due serie parallele, composte ciascuna da 26 astrocitomi e 20 oligoastrocitomi. A completezza dell'analisi molecolare, limitatamente alla sola casistica di oligodendrogliomi e oligoastrocitomi, sono stati inoltre valutate le delezioni dei *loci CDKN2A* e *CDKN2B* e lo stato di metilazione dei rispettivi promotori. In aggiunta, sono stati indagati nella sola casistica di oligodendrogliomi il possibile ruolo di questi marcatori in termini diagnostici, prognostici e predittivi di risposta ai trattamenti di radio- e chemioterapia e le rispettive associazioni.

La perdita combinata dei cromosomi 1p e 19q è considerata il principale marcatore molecolare degli oligodendrogliomi [2]. In questo studio, la valutazione dello stato dei cromosomi 1p e 19q è stato effettuato mediante MLPA®. Altre metodiche comunemente impiegate per questo scopo sono la FISH e LOH. Entrambe sono facilmente applicabili nella *routine* dei laboratori diagnostici, possono però essere fuorvianti nell'assegnazione della presenza o assenza della co-delezione di 1p/19q in quanto tecniche di analisi a singolo *locus*. L'analisi mediante LOH è basata sull'identificazione dello sbilanciamento allelico tra il DNA tumorale e costitutivo del paziente, ma non consente la distinzione tra perdite o guadagni funzionali. Nella FISH sono comunemente impiegate, oltre alle due sonde centromeriche di controllo, una sonda per il cromosoma 1p (1p36) e una sonda per il 19q (19q13.3). Entrambe le sonde si estendono per circa 400 Kb in corrispondenza delle regioni critiche dei cromosomi 1p e 19q. Tuttavia, queste non permettono di distinguere tra delezioni parziali, in questo caso telomeriche, da delezioni totali che si estendono dal telomero fino alla regione pericentromerica [99-101].

Diversamente da FISH e LOH, l'MLPA® è una tecnica multi-*locus* che non richiede la disponibilità del DNA costitutivo del paziente e permette la valutazione, all'interno di un'unica reazione, delle intere regioni cromosomiche d'interesse. Il *kit* impiegato infatti contiene 15 sonde per il cromosoma 1p, corrispondenti ad una regione di circa 120 Mb (1p36 – 1p12), e 8 sonde per il cromosoma 19q, corrispondenti ad una regione di circa 29 Mb (19q12 – 19q13.43).

La metodica MLPA® ha quindi permesso di effettuare, nel corso dell'analisi, una distinzione tra le delezioni complete, che interessano l'intero braccio cromosomico, e parziali, comprendenti le perdite interstiziali, pericentromeriche o telomeriche. I risultati di tale analisi hanno evidenziato che tumori astrocitari, misti e oligodendrogliali possiedono *pattern* distinti di alterazione del numero di copie dei cromosomi 1p e 19q.

Nella casistica di oligodendrogliomi, la delezione completa dei cromosomi 1p e 19q è risultata l'alterazione più frequente, essendo stata identificata in 41 casi su 84 (48,8%). Tale frequenza risulta essere inferiore a quelle riportate in letteratura, ottenute però con metodiche a singolo *locus* (FISH o LOH sulle regioni critiche 1p36 e 19q13.3). Considerando in generale la presenza di delezioni di 1p e 19q, senza distinzione tra totali o parziali, i casi con co-delezione risultano 65 su 84 (77,2%). Questa frequenza è concordante con quanto già descritto ed ottenuto con le metodiche sopracitate [20-22]. La co-delezione di 1p/19q, totale o parziale,

è correlata all'istologia tumorale oligodendrogliale ($p < 0,0001$), confermando quindi il suo ruolo nella diagnosi istologica di oligodendroglioma.

In ordine decrescente, tra gli oligodendrogliomi, si osservano le delezioni parziali di 1p e 19q in 14 casi su 84 (16,7%) e le delezioni parziali di 1p associate alla delezione totale di 19q in 10 casi su 84 (11,9%). La sola delezione parziale dell'1p, con 19q intatto, è stata riscontrata in 6 casi su 84 (7,1%) mentre 13 pazienti su 84 sono risultati *wild-type* per entrambi i cromosomi.

Negli oligoastrocitomi, le alterazioni più frequentemente riscontrate sono state le delezioni parziali e indipendenti tra loro dei singoli cromosomi 1p e 19q, entrambi in 4/18 casi (22,2%). In 2 casi su 18 (11,1%) è stata rilevata la delezione parziale di 1p in associazione alla delezione parziale o totale di 19q. La co-delezione totale di entrambi i cromosomi e la delezione totale di 1p con co-delezione parziale di 19q sono state osservate in 1 caso su 18 (5,6%). Su 18 oligoastrocitomi, 4 pazienti sono risultati non possedere alterazioni a carico dei *loci* in esame.

La maggioranza dei tumori astrocitari (10/18 ovvero 55,6%) è risultata *wild-type* per i cromosomi 1p e 19q. L'alterazione più frequente è risultata la delezione isolata del solo cromosoma 1p, osservata in 3 casi su 18 (16,7%). In 2 astrocitomi su 18 (11,1%) è stata riscontrata la delezione parziale di 1p associata alla delezione totale di 19q. Le delezioni, parziali e totali, del cromosoma 19q non associate ad alterazioni di 1p sono state riscontrate ciascuna in un solo paziente (5,6%).

In termine di prognosi, l'analisi delle curve di sopravvivenza con stratificazione dei pazienti in base all'estensione delle delezioni non ha evidenziato un'associazione statisticamente significativa con la sopravvivenza totale ($p = 0,167$). Si può comunque osservare che i pazienti con co-delezione totale dei cromosomi 1p e 19q possiedono una sopravvivenza maggiore mentre i pazienti con co-delezione parziale o con la sola delezione parziale di 1p hanno, al contrario, una sopravvivenza sovrapponibile a quella dei casi *wild-type*, con i primi favoriti rispetto ai secondi. I pazienti con prognosi peggiore sono caratterizzati dalla delezione parziale del cromosoma 1p e dalla delezione totale del 19q.

Nella co-delezione totale o parziale di entrambi i cromosomi, si può osservare una situazione di bilanciamento tra le perdite cromosomiche. Le due situazioni di sbilanciamento sono caratterizzate dalla perdita parziale del cromosoma 1p e si distinguono rispettivamente per la perdita totale del 19q o per l'assenza di alterazioni a suo carico, con i secondi favoriti rispetto ai primi in termini di prognosi. Lo stato del cromosoma 19q, non bilanciato dalle delezioni del cromosoma 1p, sembrerebbe quindi essere l'elemento critico in grado

d'influenzare negativamente la prognosi dei pazienti con oligodendroglioma. Ulteriori studi sono richiesti per avvalorare questa ipotesi.

Dal confronto con il gruppo di pazienti caratterizzati da altre tipologie di delezioni o *wild-type*, la co-delezione totale dei cromosomi 1p e 19q risulta essere un fattore prognostico per i pazienti affetti da oligodendroglioma (Log-Rank, $p = 0,004$). La stratificazione dei pazienti in base al grado istologico di malignità ha inoltre evidenziato che l'effetto prognostico maggiore si ha nei tumori di III grado (Log Rank, $P = 0,011$) rispetto a quelli di II grado (Log-Rank $p = 0,08$).

La distinzione tra le diverse tipologie di delezione riscontrabili nelle neoplasie oligodendrogliali ha evidenziato un loro differente significato predittivo di risposta ai trattamenti terapeutici. Considerando infatti i soli pazienti trattati con radio- e chemioterapia, si evidenzia una maggior sopravvivenza nei pazienti con co-delezione totale dei cromosomi 1p e 19q (Log-Rank test, $p = 0,009$). In ordine decrescente si osservano invece i pazienti con co-delezione parziale di 1p e 19q intatto ed infine, in maniera quasi sovrapponibile, i pazienti senza alterazioni o con co-delezione parziale di entrambi i cromosomi. Non sono disponibili dati sufficienti per la valutazione dell'effetto della co-delezione sbilanciata 1p (P) / 19q (T) sulla predizione dell'effetto della terapia combinata RT + CHT. Un futuro ampliamento della casistica, in termini di numero dei casi e di pazienti con *follow-up* noto, sarà utile per meglio definire il ruolo di questo sbilanciamento cromosomico. Per una migliore comprensione del fenomeno sarà inoltre utile comparare i dati con quelli relativi ai GBMO (glioblastomi con aree oligodendrogliali) e al comportamento del gene 19q nei glioblastomi [102-104].

Il gene *MGMT* (10q26) codifica per una proteina di riparo dei danni al DNA causati per esempio dagli agenti alchilanti. *MGMT* è infatti responsabile del riparo del danno al DNA attraverso il trasferimento irreversibile del gruppo metilico dalla posizione O⁶ della guanina ad un suo residuo di cisteina riducendo così l'effetto citotossico del TMZ. La metilazione del promotore del gene *MGMT*, che causa il suo silenziamento genico, è risultata più frequente negli oligodendrogliomi (70,9%) rispetto agli oligoastrocitomi (66,7%) e agli astrocitomi (31,8%). Limitatamente agli oligodendrogliomi analizzati, questa alterazione è risultata essere più frequente nei III gradi (75%) rispetto ai II gradi (68,1%).

In termine di prognosi, l'analisi delle curve di sopravvivenza non ha evidenziato un'associazione statisticamente significativa tra lo stato di metilazione del promotore del gene *MGMT* e la sopravvivenza totale dei pazienti nell'intera casistica di oligodendrogliomi ($p = 0,167$). Il significato prognostico di questa alterazione è però risultato evidente negli

oligodendrogliomi anaplastici (Log-Rank test, $P = 0.041$) e non negli oligodendrogliomi di II grado (Log-Rank test, $p = 0,695$), come già descritto in letteratura [25; 105; 106]. Il ruolo predittivo di risposta ai trattamenti dello stato di metilazione del promotore del gene *MGMT*, già ampiamente discusso in passato anche nei pazienti affetti da GBM, si conferma nella nostra casistica per i pazienti trattati sia con radio- che chemioterapia (Log-Rank test, $p = 0,008$) [67; 105].

Le mutazioni dei geni *IDH1/2* sono state descritte per la prima volta nei gliomi nel 2008 durante uno studio, parte del progetto *Cancer Genome Atlas*, di analisi *genome-wide* di 22 GBM [40]. Queste mutazioni colpiscono preferenzialmente il codone 132 del gene *IDH1* e il suo omologo nel gene *IDH2* (codone 172), sono riscontrabili in uno stato di eterozigosi e in modo mutualmente esclusivo tra di loro. Il ruolo dell'enzima IDH mutato nel processo di gliomagenesi è complesso e in questi anni sono state avanzate diverse ipotesi come la perdita di funzione (riduzione dei livelli di NADPH) e il guadagno di funzione (produzione dell'oncometabolita α -KG).

Nella nostra casistica, le mutazioni dei geni *IDH1/2* sono state riscontrate nel 67,8% degli oligodendrogliomi, nel 70% degli oligoastrocitomi e nel 45,8% degli astrocitomi, con una netta prevalenza in generale nei II gradi rispetto ai III gradi. Il 97,6% delle alterazioni sono state rilevate a carico del codone 132 gene *IDH1* mentre *IDH2* è risultato mutato nel codone 172 nel 2,4% dei casi.

In termini di prognosi, l'analisi delle curve di sopravvivenza ha evidenziato che lo stato mutazionale di *IDH1/2* è fortemente correlato ad una maggior sopravvivenza dei pazienti (Log-Rank test, $p < 0.0001$) confermando quanto già osservato in altri studi [40; 43; 45; 61]. Tale significato prognostico è stato confermato nelle neoplasie di II grado e, maggiormente, in quelle di III grado (Log-Rank test, $p = 0,048$ e $p = 0,006$) [41; 61]. Il ruolo predittivo delle mutazioni dei geni *IDH1/2* rimane controverso. In questo studio non è stato riscontrato alcun significato predittivo di risposta al trattamento combinato con radio- e chemioterapia (Log-Rank test, $p = 0,101$) in accordo con quanto già descritto da van den Bent *et al.* 2010, Qi *et al.* 2011 e, per gli astrocitomi di basso grado, da Dubbink *et al.* 2009 [43; 62; 108]. Alcuni studi sostengono invece che vi sia una correlazione con la risposta ai trattamenti [108; 109]; ulteriori approfondimenti sono quindi richiesti per definire l'eventuale significato predittivo.

Il gene *EMP3* (19q13.32) è uno dei geni che, nel corso di diversi studi, sono stati proposti come geni oncosoppressori candidati per la regione critica 19q13 [86-88, 110]. La funzione del prodotto del gene *EMP3* rimane ancora poco conosciuta ma si ritiene che esso sia coinvolto

nella proliferazione cellulare e nelle interazioni cellula-cellula. Il silenziamento di *EMP3* mediante ipermetilazione delle isole CpG del suo promotore è stato descritto con una frequenza del 24% inizialmente nei neuroblastomi e successivamente nei gliomi (39%) [86]. Nella nostra casistica il promotore del gene *EMP3* è risultato metilato nel 62,7% degli oligodendrogliomi, nel 70% degli oligoastrocitomi e nel 35,3% degli astrocitomi. L'analisi delle curve di sopravvivenza, ha evidenziato un significato prognostico di questa alterazione nei pazienti affetti da oligodendroglioma (Log-Rank test, $p = 0,003$) ma non predittivo di risposta ai trattamenti di radio- e chemioterapia.

Nei gliomi, ed in particolar modo nei GBM, risultano incrementate molte vie di segnalazione mediate dai diversi fattori di crescita e dai loro recettori. Ad esempio, il *pathway* di EGFR è sovra-regolato in circa il 30% dei gliomi tra cui il 60% dei GBM [2]. Nella casistica in esame, l'amplificazione genica di *EGFR* è risultata rara o assente nelle neoplasie di II grado. Al contrario, nei tumori di III grado è stata riscontrata nel 30% degli oligodendrogliomi, nel 25% degli oligoastrocitomi e nel 12,5% degli astrocitomi. L'analisi delle curve di sopravvivenza ha evidenziato un ruolo prognostico fortemente negativo di questa alterazione negli oligodendrogliomi (Log-Rank test, $p < 0,0001$) e nessun ruolo predittivo (Log-Rank test, $p = 0,201$). Il significato di questi risultati va ricercato anche nella quasi esclusiva presenza di amplificazione di *EGFR* nel GBM primario che origina come tale *de novo* rispetto al secondario che si ritiene origini per anaplasia da un precedente astrocitoma [2].

L'analisi del cromosoma 9p, in particolar modo dei loci *CDKN2A* e *CDKN2B*, è stata eseguita sulla sola casistica di oligodendrogliomi e oligoastrocitomi mediante la metodica MS-MLPA® al fine di analizzare la presenza di delezioni geniche e lo stato di metilazione dei rispettivi promotori. I geni *p14^{ARF}*, *p16^{INK4A}* e *p15^{INK4B}* sono risultati deleti rispettivamente nel 34,2%, 39,5% e 46,7% degli oligodendrogliomi. Nonostante la prevalenza di queste alterazioni nelle neoplasie di III grado rispetto a quelle di II grado, come già descritto in letteratura, non sono state trovate associazioni statisticamente significative in termini prognostici e predittivi [18; 20]. Lo studio dello stato di metilazione delle regioni promotrici ha invece evidenziato che la metilazione di *p14^{ARF}* e *p16^{INK4A}* è correlata ad una maggior sopravvivenza dei pazienti ($p = 0,009$ e $p = 0,002$) e che, limitatamente a *p14^{ARF}*, esiste un'associazione con la risposta al trattamento combinato di radio- e chemioterapia ($p = 0,001$).

Le mutazioni del gene *TP53* sono risultate essere un evento poco frequente negli oligodendrogliomi (23,2%) e più frequente negli astrocitomi (39,1%) e nei tumori misti oligoastrocitari (60%). Quest'ultimo dato non è di facile comprensione, ma a questo proposito

e anche a proposito di altri dati relativi agli oligoastrocitomi, bisogna tenere presente che questo tumore è di assai difficile diagnosi istologica, sia nel grado II che III. Nel grado II l'incertezza riguarda la componente astrocitaria (tumorale o reattiva) mentre nel grado III riguarda la quota oligodendrogliale che potrebbe anche non essere tumorale [77].

L'analisi delle associazioni tra le variabili in esame ha evidenziato che l'istologia oligodendrogliale del tumore è significativamente correlata alla presenza della co-delezione dei cromosomi 1p/19q ($p < 0,0001$), alle mutazioni dei geni *IDH1/2* ($p = 0,0100$) e alla metilazione dei promotori dei geni *EMP3* e *p14^{ARF}* ($p = 0,0466$ e $p = 0,0609$). L'associazione identificata tra le mutazioni dei geni *IDH1/2* e lo stato di metilazione dei geni *EMP3* e *p14^{ARF}* sembra confermare la teoria della presenza di un fenotipo metilatore G-CIMP indotto dalle mutazioni di questi enzimi [53 - 55]. La metilazione del promotore del gene *MGMT* sembra invece essere un evento epigenetico indipendente dalle mutazioni di *IDH1/2* ma comunque associato all'istologia oligodendrogliale ($p = 0,0011$).

L'amplificazione del gene *EGFR* è risultata inversamente correlata agli oligodendrogliomi insieme alle mutazioni del gene *TP53* ($p = 0,0138$ e $p = 0,0163$). Tale alterazione è infatti già stata descritta come segno di progressione maligna del tumore e con significato prognostico negativo [2; 18; 20]. In generale, quest'ultima alterazione, insieme alla delezione del *locus CDKN2A*, sebbene non associata alle neoplasie oligodendrogliali, sembrano caratterizzare un maggior grado di malignità del tumore.

L'analisi multivariata con il modello di regressione di Cox ha identificato le mutazioni dei geni *IDH1/2* come il più potente fattore prognostico indipendente (Log-Rank test, $p = 0,002$) seguite dalla metilazione del promotore del gene *p14^{ARF}* (Log-Rank test, $p = 0,028$). Tali dati, confermano quanto già osservato in letteratura per il ruolo delle mutazioni dei geni *IDH1/2* come principale fattore prognostico indipendente, negli oligodendrogliomi di III grado, e identificano un nuovo fattore, la metilazione del promotore del gene *p14^{ARF}*, non ancora investigato per tale ruolo [62; 111; 112].

Il presente lavoro svolto sui gliomi, in particolare sugli oligodendrogliomi, dimostra come l'analisi genetica e molecolare delle varie neoplasie sia ormai un aiuto insostituibile per validare la diagnosi fenotipica, per emettere la prognosi e, soprattutto, per stabilire una strategia terapeutica personalizzata. Accanto ai numerosi problemi nati dallo studio del fenotipo tumorale e risolti con l'analisi genetica e molecolare, altri problemi nascono proprio da questi sussidi. Ci si limita ad indicare alcuni punti diventati problematici e alla cui chiarificazione sono diretti gli sforzi attuali della ricerca. Un punto fondamentale è

rappresentato dagli oligoastrocitomi, riportabili nella citogenesi allo stadio di progenitori prima della differenziazione astro- o oligodendrogliale. La loro diagnosi fenotipica è molto incerta e la concordanza diagnostica fra i neuropatologi piuttosto bassa. Un altro punto è la progressione maligna degli oligodendrogliomi in cui ci si chiede dove risieda la controparte genetica in quelli senza l'amplificazione di EGFR. Infine, l'esistenza (dubbia) di GBMO o di GBM con delezione del cromosoma 19q ci riporta al quesito se esistano GBM di origine oligodendrogliale o se siano riconoscibili fenotipicamente e distinguibili dai GBM, oligodendrogliomi totalmente dedifferenziati e con grosse atipie. La strada del raffronto genotipo/fenotipo nei tumori gliali è lungi dall'essere completa.

5 Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

1. Ohgaki H, Kleihues P, (2005), *Acta Neuropathol (Berl)*, **109(1)**, 93-108;
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, and Cavenee WK, (2007), "*WHO classification of tumors of the central nervous system*", 4th Ed., Lyon, France, IARC Press;
3. Bailey PC, Cushing H, (1926), "*A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis*", Lippincott, Philadelphia (PA), USA;
4. Visvader JE, Lindeman GJ, (2008), *Nat Rev Cancer*, **8(10)**, 755-768;
5. Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS, (2005), *N Engl J Med*, **353(8)**, 811-822;
6. Schiffer D, Mellai M, Annovazzi L, Piazzini A, Monzeglio O, Caldera V, (2012), *Stem Cell Discovery*, **2(3)**, 122-131;
7. Schiffer D, (2003), *Neurol Sci*, **24**, S575-579;
8. Nduom EK, Hadjipanayis CG, Van Meir EG, (2012), *Cancer J*, **18(1)**, 100-106;
9. Riemenschneider MJ, Reifenberger G, (2009), *Int J Mol Sci*, **10(1)**, 184-212;
10. Weller M, (2011), *Swiss Med Wkly*, **141**, w13210;
11. Brat DJ, Prayson RA, Ryken TC, Olson JJ, (2008), *J Neurooncol*, **89(3)**, 287-311;
12. Pfister S, Janzarik WG, Remke M, Ernst A, Werft W, Becker N, Toedt G, Wittmann A, Kratz C, Olbrich H, Ahmadi R, Thieme B, Joos S, Radlwimmer B, Kulozik A, Pietsch T, Herold-Mende C, Gnekow A, Reifenberger G, Korshunov A, Scheurlen W, Omran H, Lichter P, *J Clin Invest*, **118(5)**, 1739-1749;
13. Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G, (2010), *Acta Neuropathol*, **120(5)**, 567-584;
14. Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Bäcklund LM, Ichimura K, Collins VP, (2008), *Cancer Res*, **68(21)**, 8673-8677;
15. Lin A, Rodriguez FJ, Karajannis MA, Williams SC, Legault G, Zagzag D, Burger PC, Allen JC, Eberhart CG, Bar EE, (2012), *J Neuropathol Exp Neurol*, **71(1)**, 66-72;
16. Ohgaki H, Kleihues P, *Am J Pathol*, **170(5)**, 1445-1453;
17. Bleeker FE, Molenaar RJ, Leenstra S, (2012), *J Neurooncol*, **108(1)**, 11-27;
18. Van den Bent MJ, Reni M, Gatta G, Vecht C, (2008), *Crit Rev Oncol Hematol*, **66(3)**, 262-272;
19. Van den Bent MJ, (2004), *Curr Opin Neurol*, **17(6)**, 675-680;
20. Bromberg JE, Van den Bent MJ, (2009), *Oncologist*, **14(2)**, 155-163;

21. Van den Bent MJ, (2007), *Neurol Clin*, **25(4)**, 1089-1109;
22. Van den Bent MJ, (2004), *Semin Oncol*, **31(5)**,645-652;
23. Corsa P, Parisi S, Raguso A, Troiano M, Perrone A, Cossa S, Munafo T, Piombino M, Spagnoletti G, Borgia F, (2006), *Tumori*, **92(4)**, 299-305;
24. Shaw EG, Berkey B, Coons SW, Brachman D, Buckner JC, Stelzer KJ, Barger GR, Brown PD, Gilbert MR, Mehta M, (2006), *J Clin Oncol*, **30(25)**, 3065-3070;
25. Wick W, Hartmann C, Engel C, Stoffels M, Felsberg J, Stockhammer F, Sabel MC, Koeppe S, Ketter R, Meyermann R, Rapp M, Meisner C, Kortmann RD, Pietsch T, Wiestler OD, Ernemann U, Bamberg M, Reifenberger G, von Deimling A, Weller M, (2009), *J Clin Oncol*, **27(35)**, 5874-5880;
26. Ishii D, Natsume A, Wakabayashi T, Hatano H, Asano Y, Takeuchi H, Shimato S, Ito M, Fujii M, Yoshida J, (2007), *Neurol Med Chir*, **47(8)**, 341-350;
27. Mikkelsen T, Doyle T, Anderson J, Margolis J, Paleologos N, Gutierrez J, Croteau D, Hasselbach L, Avedissian R, Schultz L, (2009), *J Neurooncol*, **92(1)**, 57-63;
28. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R, (2005), *N Engl J Med*, **352(10)**, 997-1003;
29. Stupp R, Van den Bent MJ, Hegi ME, (2005), *Curr Neurol Neurosci Rep*, **5(3)**, 198-206;
30. Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, Nikkhah G, Papsdorf K, Steinbach JP, Sabel M, Combs SE, Vesper J, Braun C, Meixensberger J, Ketter R, Mayer-Steinacker R, Reifenberger G, Weller M, (2012), *Lancet Oncol*, **13(7)**, 707-715;
31. Sahebjam S, McNamara M, Mason WP, (2012), *Clin Adv Hematol Oncol*, **10(6)**, 379-386;
32. Laperriere N, Weller M, Stupp R, Perry JR, Brandes AA, Wick W, Van den Bent MJ, (2012), *Cancer Treat Rev*, Published online 21 June 2012;
33. Barbashina V, Salazar P, Holland EC, Rosenblum MK, Ladanyi M, (2005), *Clin Cancer Res*, **11(3)**, 1119-1128;
34. Iuchi T, Namba H, Iwadate Y, Shishikura T, Kageyama H, Nakamura Y, Ohira M, Yamamura A, Osato K, Sakiyama S, Nakagawara A, (2002), *Genes Chromosomes Cancer*, **35(2)**, 170-175;
35. Griffin CA, Burger P, Morsberger L, Yonescu R, Swierczynski S, Weingart JD, Murphy KM, (2006), *J Neuropathol Exp Neurol*, **65(10)**, 988-984;
36. Aldape K, Burger PC, Perry A, (2007), *Arch Pathol Lab Med*, **131(2)**, 242-251;

37. Franco-Hernández C, Martínez V, de Campos JM, Isla A, Vaquero J, Gutiérrez M, Casartelli C, Rey JA, (2009), *Cancer Genet Cytogenet*, **190(2)**, 93-96;
38. Buckley PG, Alcock L, Heffernan J, Woods J, Brett F, Stalling RL, Farrell MA, (2011), *J Neuropathol Exp Neurol*, **70(3)**, 177-182;
39. Jankowski S, Currie-Fraser E, Xu L, Coffa J, (2009), *J Biomol Tech*, **19(4)**, 238-243;
40. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW, (2008), *Science*, **321(5897)**, 1807-1812;
41. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD, (2009), *N Engl J Med*, **360(8)**, 765-773;
42. Houillier C, Wang X, Kaloshi G, Muktari K, Guillevin R, Laffaire J, Paris S, Boisselier B, Idbaih A, Laigle-Donadey F, Houang-Xuan K, Sanson M, Delattre JY, (2010), *Neurology*, **75(17)**, 1560-1566;
43. Dubbink HJ, Taal W, van Marion R, Kros JM, van Heuvel I, Bromberg JE, Zonnenberg BA, Zonnenberg CB, Postma TJ, Gijtenbeek JM, Boogerd W, Groenendijk FH, Smitt PA, Dinjens WN, Van den Bent MJ, (2009), *Neurology*, **73(21)**, 1792-1795;
44. Kim TK, Lee P, Colman RF, (2003), *J Biol Chem*, **278(49)**, 49323-49331;
45. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, Felsberg J, Wolter M, Mawrin C, Wick W, Weller M, Herold-Mende C, Unterberg A, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G, von Deimling A, (2009), *Acta Neuropathol*, **118(4)**, 469-474;
46. Yan H, Bigner DD, Velculescu V, Parsons DW, (2009), *Cancer Res*, **69(24)**, 9157-9159;
47. Bleeker FE, Lamba S, Leenstra S, Troost D, Hulsebos T, Vandertop WP, Frattini M, Molinari F, Knowles M, Cerrato A, Rodolfo M, Scarpa A, Felicioni L, Buttitta F, Malatesta S, Marchetti A, Bardelli A, (2009), *Hum Mutat*, **30(1)**, 7-11;
48. Watanabe T, Vital A, Nobusawa S, Kleihues P, Ohgaki H, (2009), *Acta Neuropathol*, **117(6)**, 653-656;
49. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, Su SM, (2009), *Nature*, **462(7274)**, 739-744;

50. Zhao S, Lin Y, Xu W, Jiang W, Zha Z, Wang P, Yu W, Li Z, Gong L, Peng Y, Ding J, Lei Q, Guan KL, Xiong Y, (2009), *Science*, **324(5924)**,261-265;
51. Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, Ito S, Yang C, Wang P, Xiao MT, Liu LX, Jiang WQ, Liu J, Zhang JY, Wang B, Frye S, Zhang Y, Xu YH, Lei QY, Guan KL, Zhao SM, Xiong Y, (2011), *Cancer Cell*,**19(1)**, 17-30;
52. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, Li Y, Bhagwat N, Vasanthakumar A, Fernandez HF, Tallman MS, Sun Z, Wolniak K, Peeters JK, Liu W, Choe SE, Fantin VR, Paietta E, Löwenberg B, Licht JD, Godley LA, Delwel R, Valk PJ, Thompson CB, Levine RL, Melnick A, (2010), *Cancer Cell*, **18(6)**:553-567;
53. Gupta R, Webb-Myers R, Flanagan S, Buckland ME, (2011), *J Clin Pathol*, **64(10)**: 835-844;
54. Prensner JR, Chinnaiyan AM, *Nat Med*, **17(3)**,291-293;
55. Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, Campos C, Fabius AMW, Lu C, Ward PS, Thompson CB, Kaufman A, Guryanova O, Levine R, Heguy A, Viale A, Morris LGT, Huse JT, Mellinghoff IK, Chan TA, (2012), *Nature*, **483(7390)**, 479-483;
56. Bleeker FE, Atai NA, Lamba S, Jonker A, Rijkeboer D, Bosch KS, Tigchelaar W, Troost D, Vandertop WP, Bardelli A, Van Noorden CJ, (2010), *Acta Neuropathol*, **119(4)**, 487-494;
57. Marie Sk, Shinjo SM, (2011), *Clinics*, **66(S1)**, 33-43;
58. Christensen BC, Smith AA, Zheng S, Koestler DC, Houseman EA, Marsit CJ, Wiemels JL, Nelson HH, Karagas MR, Wrensch MR, Kelsey KT, Wiencke JK, (2011), *J Natl Cancer Inst*, **103(2)**, 143-153;
59. Metellus P, Coulibaly B, Colin C, de Paula AM, Vasiljevic A, Taieb D, Barlier A, Boisselier B, Mokhtari K, Wang XW, Loundou A, Chapon F, Pineau S, Ouafik L, Chinot O, Figarella-Branger D, (2010), *Acta Neuropathol*, **120(6)**, 719-729;
60. Ichimura K, Pearson DM, Kocialkowski S, Bäcklund LM, Chan R, Jones DT, Collis VP, (2009), *Neuro Oncol*, **11(4)**, 341-347;
61. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre JY, (2009), *J Clin Oncol*, **27(25)**, 4150-4154;
62. Van den Bent MJ, Dubbink HJ, Marie Y, Brandes A, Taphoorn MJ, Wesseling P, Frenay M, Tijssen CC, Lacombe D, Idbaih A, van Marion R, Kros JM, Dinjens WN, Gorlia T, Sanson M, (2010), *Clin Cancer Res*,**16(5)**, 1597-1604;
63. Guo C, Pirozzi CJ, Lopez GY, Yan H, (2011), *Curr Opin Neurol*, **24(6)**, 648-652;
64. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP, (2007), *DNA Repair*, **6(8)**, 1079-1099;

65. Bugni JM, Han J, Tsai MS, Hunter DJ, Samson LD, (2007), *DNA Repair*, **6(8)**, 1116-1126;
66. Liu L, Gerson SL, (2006), *Clin Cancer Res*, **12(2)**, 328-331;
67. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG, (2000), *N Engl J Med*, **343(19)**, 1350-1354;
68. Crinière E, Kaloshi G, Laigle-Donadey F, Lejeune J, Auger N, Benouaich-Amiel A, Everhard S, Mokhtari K, Polivka M, Delattre JY, Hoang-Xuan K, Thillet J, Sanson M, (2007), *J Neurooncol*, **83(2)**,173-179;
69. Jacinto FV, Esteller M, (2007), *DNA Repair*, **6(8)**, 1155-1160;
70. Huang PH, Xu AM, White FM, (2009), *Sci Signal*, **2(87)**,1-13;
71. Hynes NE, Lane HA, (2005), *Nat Rev Cancer*, **5(5)**, 341-354;
72. Pedersen MW, Meltorn M, Damstrup L, Poulsen HS, (2001), *Ann Oncol*, **12(6)**,745-760;
73. Seshacharyulu P, Ponnusamy MP, Haridas D, Jain M, Ganti AK, Batra SK, (2012), *Expert Opin Ther Targets*, **16(1)**, 15-31;
74. Pines G, Huang PH, Zwang Y, White FM, Yarden Y, (2010), *Oncogene*, **29(43)**, 5850-5860;
75. Bálint EE, Vousden KH, (2001), *Br J Cancer*, **85(12)**, 1813-1823;
76. Bullock AN, Fersht FR, (2001), *Nat Rev Cancer*, **1(1)**, 68-76;
77. Schiffer D, (2006), *Brain Tumor Pathology: Current diagnostic hotspots and pitfalls*, Springer Verlag Gmbh;
78. Sherr CJ, (2006), *Nat Rev Cancer*, **6(9)**, 663-673;
79. Krimpenfort P, Ipenberg A, Song JY, van der Valk M, Nawijn M, Zevenhoven J, Berns A, (2007), *Nature*, **448(7156)**, 943-947;
80. Nakamura M, Watanabe T, Klangby U, Asker C, Wiman K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H, (2001), *Brain Pathol*, **11(2)**, 159-168;
81. Zawlik I, Kita D, Vaccarella S, Mittelbronn M, Franceschi S, Ohgaki H, (2009), *Brain Pathol*, **19(2)**, 188-194;
82. Watanabe T, Yokoo H, Yokoo M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H, (2001), *J Neuropathol Exp Neurol*, **60(12)**, 1181-1189,
83. Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H, (1997), *Acta Neuropathol*, **94(4)**, 303-309;
84. Uhlmann K, Rohde K, Zeller C, Szymas J, Vogel S, Marczinek K, Thiel G, Nürnberg P, Laird PW, (2003), *Int J Cancer*, **106(1)**, 52-59;
85. Ben-Porath I, Kozak CA, Benvenisty N, (1998), *Genomics*, **49(3)**, 443-447;

86. Alaminos M, Dávalos V, Ropero S, Setién F, Paz MF, Herranz M, Fraga MF, Mora J, Cheung NK, Gerald WL, Esteller M, (2005), *Cancer Res*, **65(7)**, 2565-2571;
87. Kunitz A, Wolter M, van den Boom J, Felsberg J, Tews B, Hahn M, Benner A, Sabel M, Lichter P, Reifenberger G, von Deimling A, Hartmann C, (2007), *Brain Pathol*, **17(4)**, 363-370;
88. Li KK, Pang JC, Chung NY, Ng YL, Chan NH, Zhou L, Poon WS, Ng HK, (2007), *Int J Cancer*, **120(4)**, 947-950;
89. Jeuken J, Cornelissen S, Boots-Sprenger S, Gijsen S, Wesseling P, (2006), *J Mol Diagn*, **8(4)**, 433-443;
90. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, Schouten JP, Errami A, (2005), *Nucleic Acids Res*, **33(14)**, e128;
91. Tollefsbol T, (2011), *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics*, 1st Ed, London, San Diego, Academic Press;
92. Zhang Y, Bailey V, Puleo CM, Easwaran H, Griffiths E, Herman JG, Baylin SB, Wang TH, (2009), *Lab Chip*, **9(8)**, 1059-1064;
93. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG, (1999), *Cancer Res*, **59(4)**, 793-797;
94. Mellai M, Caldera V, Annovazzi L, Chiò A, Lanotte M, Cassoni P, Finocchiaro G, Schiffer D, (2009), *Cancer Genomics Proteomics*, **6(4)**, 219-227;
95. Waha A, Rollbrocker B, Wiestler OD, von Deimling A, (1996), *Diagn Mol Pathol*, **5(2)**, 147-150;
96. Juratli TA, Kirsc M, Robel K, Soucek S, Geiger K, von Kummer R, Schackert G, Krex D, (2012), *J Neurooncol*, **108(3)**, 403-410;
97. Nikiforova MN, Hamilton RL, (2011), (2011), *Arch Pathol Lab Med*, **135(5)**, 558-567;
98. Jansen M, Yip S, Louis DN, (2010), *Lancet Neurol*, **9(7)**, 717-726;
99. Cairncross G, Jenkins R, (2008), *Cancer J*, **14(6)**, 352-357;
100. Jeuken JW, Sijben A, Bleeker FE, Boots-Sprenger SH, Rijntjes J, Gijtenbeek JM, Mueller W, Wesseling P, (2011), *Brain Pathol*, **21(3)**, 308-320;
101. Vogazianou AP, Chan R, Bäcklund LM, Pearson DM, Liu L, Langford CF, Gregory SG, Collins VP, Ichimura K, (2010), *Neuro Oncol*, **12(7)**, 664-678;
102. Kaneshiro D, Kobayashi T, Chao ST, Suh J, Prayson RA, (2009), *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, **17(6)**, 512-516;

103. Mizoguchi M, Yoshimoto K, Ma X, Guan Y, Hata N, Amano T, Nakamizo A, Suzuki SO, Iwaki T, Sasaki T, (2012), *Brain Tumor Pathol*, **29(3)**, 148-153;
104. Wang Y, Li S, Chen L, You G, Bao Z, Yan W, Shi Z, Chen Y, Yao K, Zhang W, Kang C, Jiang T, (2012), *Neuro Oncol*, **14(4)**, 518-525;
105. Everhard S, Kaloshi G, Crinière E, Benouaich-Amiel A, Lejeune J, Marie Y, Sanson M, Kujas M, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Thillet J, (2006), *Ann Neurol*, **60(6)**, 740-743;
106. Van den Bent MJ, Dubbink HJ, Sanson M, van der Lee-Haarloo CR, Hegi M, Jeuken JW, Ibdaih A, Brandes AA, Taphoorn MJ, Frenay M, Lacombe D, Gorlia T, Dinjens WN, Kros JM, (2009), *J Clin Oncol*, **27(35)**, 5881-5886;
107. Qi ST, Yu L, Lu YT, Ou YH, Li ZY, Wu LX, Yao F, (2011), *Oncol Rep*, **26(6)**, 1479-1485;
108. Houillier C, Wang X, Kaloshi G, Mokhtari K, Guillevin R, Laffaire J, Paris S, Boisselier B, Idbaih A, Laigle-Donadey F, Hoang-Xuan K, Sanson M, Delattre JY, (2010), *Neurology*, **75(17)**, 1560-1566;
109. Lv S, Teugels E, Sadones J, Quartier E, Huylebrouck M, DU Four S, LE Mercier M, DE Witte O, Salmon I, Michotte A, DE Grève J, Neyns B, (2011), *Anticancer Res*, **31(12)**, 4457-4463;
110. Pasini A, Iorio P, Bianchi E, Cerasoli S, Cremonini AM, Faedi M, Guarnieri C, Guiducci G, Riccioni L, Molinari C, Rengucci C, Calistri D, Giordano E, (2012), *Oncol Rep*, **28(6)**, 2271-2277;
111. Li S, Yan C, Huang L, Qiu X, Wang Z, Jiang T, (2012), *Neuro Oncol*, **14(1)**, 109-116;
112. Mukasa A, Takayanagi S, Saito K, Shibahara J, Tabei Y, Furuya K, Ide T, Narita Y, Nishikawa R, Ueki K, Saito N, (2012), *Cancer Sci*, **103(3)**, 587-592;

6 Pubblicazioni
Scientifiche

PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE

M. Mellai, **A. Piazzì**, V. Caldera, O. Monzeglio, P. Cassoni, D. Schiffer "IDH1 and IDH2 mutations, immunoistochemistry and associations in a series of brain tumors", J Neurooncol. 2011 Nov; 105(2): 345-57.

Caldera V., Mellai M., Annovazzi L., **Piazzì A.**, Cassoni P. and Schiffer D. "Antigenic and genotypic similarity between primary glioblastomas and their derived neurospheres", J Oncol. Epub 2011 Aug 18.

M. Mellai, O. Monzeglio, **A. Piazzì**, V. Caldera, L. Annovazzi, P. Cassoni, G. Valente, S. Cordera, C. Mocellini, D. Schiffer "MGMT promoter hypermethylation and its associations with genetic alterations in a series of 374 brain tumors", J Neurooncol. 2012 May; 107(3): 617-31.

Caldera V., Mellai M., Annovazzi L., Monzeglio O., **Piazzì A.**, Schiffer D. "MGMT hypermethylation and MDR system in glioblastoma cancer stem cells" Cancer Genomics Proteomics 2012 Jul; 9: 171-78.

Schiffer D., Mellai M., Annovazzi L., **Piazzì A.**, Monzeglio O., Caldera V. "Glioblastoma cancer stem cells: basis for a functional hypothesis" Stem Cell Discovery 2012 Jul; 2(3): 122-31.