

ALTERAZIONI GENETICHE DEI TUMORI DELLE GHIANDOLE SALIVARI

G. Floridia, F. Censi, V. Falbo, D. Taruscio

Introduzione

I tumori rappresentano un gruppo eterogeneo di patologie, con proprietà biologiche differenti, la cui genesi e progressione sono causate da un'acquisizione di mutazioni in geni che regolano positivamente e negativamente la proliferazione cellulare, l'apoptosi, la stabilità genomica, l'angiogenesi, l'invasione e le metastasi^{1,2}.

I tumori sono generalmente causati da mutazioni in cellule somatiche; tuttavia vi sono alcune eccezioni che riguardano tumori, per la maggior parte rari, dovuti a mutazioni in cellule germinali.

I geni responsabili della tumorigenesi possono essere divisi in tre classi: oncogeni, geni oncosoppressori e geni della stabilità³.

Gli oncogeni, quando mutati, diventano o costituzionalmente attivi o attivi in condizioni in cui normalmente non dovrebbero esserlo; l'attivazione oncogenica può essere il risultato di traslocazioni cromosomiche, di amplificazioni geniche o di mutazioni intrageniche criptiche. Una mutazione somatica che attiva un allele di un oncogene è generalmente sufficiente per conferire un vantaggio selettivo di crescita cellulare. Oncogeni noti sono *ERBB2*, *CCND1*, *MYC*³.

D'altra parte i geni oncosoppressori, quando mutati, hanno un'attività ridotta del prodotto genico; le inattivazioni del gene possono essere dovute a mutazioni "missenso" in residui fondamentali per l'attività del suo prodotto, a mutazioni che danno origine ad una proteina troncata, a delezioni o inserzioni di diversa grandezza, o a silenziamento epigenetico. Geni oncosoppressori noti sono *PTEN*, *RBI*, *CDKN2A*.

Generalmente è necessario che avvengano mutazioni nell'allele materno e paterno del gene oncosoppressore affinché la cellula acquisisca un vantaggio selettivo; questa situazione si verifica comunemente attraverso la delezione di un allele, tramite un riarrangiamento cromosomico, ed una mutazione intragenica dell'altro allele³.

Oncogeni e geni oncosoppressori operano in maniera simile a livello fisiologico: entrambi sono coinvolti nel processo neoplastico aumentando il numero di cellule tumorali attraverso una stimolazione della proliferazione cellulare e una inibizione della morte cellulare o dell'arresto del ciclo cellulare³.

Una terza classe di geni, chiamati geni "caretakers" o della stabilità genomica, promuove la tumorigenesi in un modo completamente differente. Questa classe include i geni "mismatch repair" "nucleotide-excision repair" e "base-excision repair", i quali sono responsabili della riparazione di errori che avvengono durante la normale replicazione del DNA o in seguito ad esposizione a mutageni. Altri geni della stabilità controllano processi che coinvolgono grosse parti dei cromosomi, quali, *BRCA1*, *BLM* e *ATM*, responsabili della ricombinazione mitotica e della segregazione cromosomica. I geni della stabilità mantengono al minimo le alterazioni genetiche e quindi, se alterate, si ha una frequenza più alta di mutazioni in altri geni; tuttavia solo le mutazioni negli oncogeni e nei geni oncosoppressori influenzano la crescita cellulare e possono conferire un vantaggio selettivo di crescita nelle cellule mutate³.

Così come per i geni oncosoppressori, entrambi gli alleli dei geni della stabilità devono essere inattivati affinché vi sia un effetto fisiologico.

I meccanismi genetici non sono unici nella alterazione della funzione di un gene nella cancerogenesi. Cambiamenti epigenetici patologici, cioè alterazioni che non coinvolgono la sequenza di DNA ereditate attraverso la divisione cellulare, sono alternativi a mutazioni e anomalie cromosomiche nell'alterazione della funzione genica; tali cambiamenti includono sia alterazioni globali, quali una ipometilazione del DNA e una ipoacetilazione della cromatina, sia ipometilazione o ipermetilazione di geni specifici, alterazioni della cromatina o perdita di imprinting. Tutto ciò può portare ad instabilità cromosomica, all'attivazione anomala di oncogeni e al silenziamento anomalo di geni oncosoppressori².

Inoltre, alla base dell'alterazione delle funzioni dei geni, vi sono meccanismi diversi in tumori differenti.

Le alterazioni genetiche/epigenetiche dei tumori possono essere analizzate usando un numero sempre maggiore di tecnologie genomiche a "larga scala" e genetico/citogenetico molecolari quali, ad esempio, l'analisi del bandeggio dei cromosomi, lo studio della perdita di eterozigosità (LOH), la comparative genomic hybridization (CGH), l'ibridazione in situ fluorescente (FISH). Alcune tecniche rilevano sbilanci allelici che avvengono per ricombinazione somatica o cambiamenti nel numero di copie, altre, quali la FISH e la CGH, sono sensibili solamente a cambiamenti fisici nella struttura del genoma o al numero di copie¹.

Queste analisi identificano un grosso numero di anomalie cromosomiche nei tumori solidi, tra cui una ploidia alterata, acquisto o perdita di cromosomi o porzioni di essi e riarrangiamenti strutturali.

Le alterazioni strutturali possono coinvolgere uno scambio equo di materiale tra due cromosomi o possono essere non reciproche, così che vi sono guadagni o perdite di regioni genomiche.

L'uso di microarray ha permesso di eseguire studi dell'espressione genica cellulare; microarray di oligonucleotidi o cDNA possono rilevare e quantizzare i trascritti di 30.000 geni contemporaneamente. I profili di espressione possono essere usati sia per identificare pathways molecolari che potrebbero essere alterati nella tumorigenesi sia per stratificare i tumori in categorie prognostiche che hanno implicazioni per decisioni nel trattamento⁴.

I tumori delle ghiandole salivari rappresentano un gruppo complesso ed eterogeneo di patologie dal punto di vista istopatologico e i meccanismi molecolari patogenetici non sono ancora del tutto noti; la rarità e la complessità rendono particolarmente difficile lo studio e l'analisi di queste neoplasie.

È in corso una collaborazione scientifica tra il nostro gruppo di ricerca, presso l'Istituto Superiore di Sanità, e l'Istituto Regina Elena-IFO al fine di raccogliere campioni di diverso istotipo e analizzarli con un approccio citogenetico-molecolare e molecolare.

Qui di seguito una revisione della letteratura sui dati più rilevanti inerenti i tumori delle ghiandole salivari.

Le tabelle I e II si riferiscono a risultati di studi di Comparative Genomic Hybridization (su metafase) e di genetica molecolare, in differenti istotipi, riportati in letteratura.

Carcinomi mucoepidermoidi

I carcinomi mucoepidermoidi (MEC) costituiscono le neoplasie maligne più comuni nelle ghiandole salivari maggiori e minori.

Studi di citogenetica classica hanno rilevato una specifica traslocazione cromosomica, t(11;19)(q21;p13), nel 70% di questi tumori e tale anomalia a volte è l'unico riarrangiamento ritrovato.

La t(11;19)(q21;p13), comporta la fusione tra il gene *MECT1*, in 11q21, e il gene *MAML2* in 19p13 con la formazione di una nuova proteina di fusione espressa in tutti i differenti tipi cellulari del tumore.

Tale alterazione interrompe il pathway del segnale di *Notch* ed è un marker prognostico utile; pazienti che presentano fusione *MECT1-MAML2* hanno significativamente meno recidive locali, meno metastasi e meno morti dovute al tumore rispetto ai pazienti che non presentano fusione. Inoltre la sopravvivenza

media dei pazienti con la fusione eccede i dieci anni, a differenza degli altri pazienti in cui la sopravvivenza media è solo di 1.6 anni⁵.

Tab. I: Risultati delle analisi di Comparative Genomic Hybridization su metafase, riportati in letteratura, in tumori di ghiandole salivari di diverso istotipo. Le amplificazioni e le delezioni riportate in grassetto sono state riscontrate in più di un caso.

Istotipo	Amplificazioni	Delezioni	N. casi	Ref.
ACC	16p; 16q; 20p; 20q; 22q12.3-q13.1	No	1	14
	1q32; 3p21; 3q29; 4q35; 5p15.3; 5q35; 6p25; 6q21-q24; 6q27; 7q11.2; 7q21; 7q31; 10q11.2; 11p14; 11p12-q12; 11q14; 11q23; 12p13; 12q13; 12q14; 12q24.3; 13q24; 15q21; 16p13.3-p13.2; 16q24; 18p11.3; 18q23; 19q13.4; 21q22; Xq28	8p22	6	16
	1q31-q32; 2p23-pter; 4q12-q13; 6p; 6p21; 6p24-pter; 7p15-pter; 7q1-q34; 8; 8p; 8q; 9p23-pter; 9q34; 11q; 11q12-q13; 12q24; 13q32-qter; 14q32; 16; 16p; 16q23; 17p12; 17q; 17q11-q21; 17q24-qter; 18; 18p; 18p11.2; 20q; 20q13; 22; 22q13;	1p; 3p; 3p12-p14; 3q12-q13; 3q13; 4p15; 4q26-qter; 5q13-q14; 6p; 6q; 6q22; 6q23-q24; 6q23-qter; 6q24; 8p23; 9p; 9p21-pter; 11p; 12q12; 12q12-q13; 13q21; 13q21-q22; 14q24-qter; 17q11-q21; 18q21-q22; 21; Xq21-q22;	27	15
	1p11-p34; 1p22-qter; 1q11-q32; 3q13.3-q23; 7; 7q; 8; 9p; 11q12-q13; 15; 16; 17; 19; 22;	1p33-pter; 1p35-pter; 1q41-qter; 5; 5q12-q21; 6q11-q23; 6q22.3-q23; 6q23-qter; 7p13-p21.2; 8q11-q13; 9p; 9p21-pter; 9q; 9q31-qter; 11p; 11q21-q23; 12q12-q15; 12q12-q21.2; 12q12-q13; 12q12-q14; 12q15-q21; 12q21.3-qter; 13; 13q14-q31; 13q13-q31; 13q14-q22; 13q21-qter; 14; 16q; X; Xp21-pter;	24	13
PA	20p12.1	5q12.4-q14.1; 9q12-q21.11; 9q12-q21.13; 16q11.2	2	14
CAP	1p36.3; 8q24.3; 11p15; 11q12-q13; 12q13; 14q32; 16q12.1-q12.2; 17q25; 19p13.3; 19q13.2; 20q13.3; 22q1.3; Xq28	No	10	16
	1p; 1q11-q32; 1q31; 2p; 2p25-p21; 3p; 3p22; 3p25-p22; 3q; 4p; 4p16-p15; 4q; 4q31.1-q35; 5q11.1-q23; 5q11.1-q14; 5q24-q27; 6q; 6q11-q16; 6q24-q27; 6q25; 8p11.1-p12; 8q; 7p; 7p22-p21; 7q; 7q36; 8p23-p21; 9p23-p24; 10p11.1-p15; 10p14; 10q; 11p; 11p15; 11q11-q14; 11q21-q25; 11q23-q25; 12p; 12q; 13p; 13q11-q22; 13q; 14p; 14q; 15p; 15p13; 15q; 15q11.1-q15; 15q11-q21; 16p; 16p12; 16q; 16q21; 16q24; 17q; 17q24-q25; 18p; 18p11; 19p; 19p13; 19q; 20q13; 21p; 21p11; 21p13; 21p; 21q; 21q21-q22; 22q; 22q11; 22q12; Xp; Xp21-p22.3; Xp22; Xq	1p; 1q; 2p; 3p11-p21; 3q11-q26; 5q; 5q11.1-q23; 6q24-q27; 8p; 8q; 9q; 10q21; 10q21-q24; 11q; 12q; 12p; 13q; 15p; 16p; 16p12-p22; 16q; 19p; 20q; 22p; 22q; 22q11.1-q13;	7	31
AdC	1p31-q21; 1q25-q32; 2q22-q33; 3p26; 3p12-q13.3; 3q25-q26.1; 4p14-q33; 5p12-q12; 5q14-q23; 6p12-q25; 7p22; 7q11.2; 7q31; 8q11.2-q12; 8q21.2-q23; 8q24.3; 9p21-p23; 9q13-q21; 10p11.2-q21; 11p15; 11p13-q12; 12p11.2-q21; 13p12; 13q14-q32; 14q11.2-q22; 15q11.2-q12; 16p13.3; 16q12.1-q13; 18p11.3; 18p11.1-q12; 18q23; 19p13.3; 20p11.2; 20p13; 21q11.1-q21; 21q21; Xp22.3; Xp22.1-q26	1p35-p36.3; 5q35; 8p22-p23; 14q32; 16p12-p13.1; 16q24; 22q11.2-q13	3	16
BCA	9p21.1-pter; 18q21.1-q22.3; 22q11.23-q13.31	2q24.2; 4q25-q27	1	14
MEC	1; 8; 12q14-q15	2; 6; 7	1	28
	1q31; 3pter-p24; 3q1-qter; 5p; 6p22-q24; 7pter-q11.2; 7pter-p15; 8q21.3-qter; 11p13-qter; 13q21-qter; 15q25-qter; 20	3p21-p13; 4p16; 4q23-qter; 5q32-qter; 8pter-8p12; 9p; 20p	2 linee cellulari	6

Legenda: ACC: Carcinoma adenoido cistico; PA: Adenoma pleomorfo; AdC: Adenocarcinoma (N.A.S.); CAP: Carcinoma pleomorfo ex adenoma pleomorfo; BCA: Adenocarcinoma a cellule basali; MEC: Carcinoma mucoepidermoide; Ref: Referenza

Studi di citogenetica molecolare mediante CGH su due linee cellulari hanno mostrato amplificazioni in 1q, 3p e 3q, 5p, 6p e, 6q, 7p, 7q, 8q, 11p, 11q, 13q, 15q, 20p e 20q e nella X; delezioni sono state rilevate in 1p, 3p, 4p, 5q, 8p e 19p. Inoltre, nel medesimo studio, l'analisi mediante SKY ha rilevato, in entrambe le linee cellulari analizzate, la presenza di traslocazioni reciproche che coinvolgono le bande 1q32, 5p15, 7q22 e 15q22⁶.

Studi di array-CGH mostrano che i MEC a basso grado hanno poche o nessuna variazione nel numero di amplificazioni e delezioni, mentre tumori ad alto grado mostrano un grande numero di amplificazioni e delezioni; inoltre le alterazioni genomiche differiscono nei MEC low-grade e in quelli high-grade^{7, 8}.

Tab. II: Risultati delle analisi di perdita di eterozigosità e dello stato di metilazione, riportati in letteratura, sui geni *RB1*, *p14*, *p16*, *p21*, *p27*, *PTEN*, *O-MGMT*, *DAPK*, *RARβ2*, *RASSF1*, *CDH1*, *p53*, *FHIT*, *RFPL14*, *PLAGL1*, *LATS1*, *ST8*, *RB1CC1*

Gene	Locus		ACC	MEC	CAP	SCC	AcCC	AdC	SDC	BCA	PA	WT	Ref.
<i>RB1</i>	13q14.2	Met	5/17	5/7	2/2	1/3	0/3	1/2	1/1	0/1	-	-	22
		LOH	2/17	1/8	1/2	2/6	0/4	1/2	0/1	0/1	2/14	0/5	22, 34
<i>p14(ARF)</i>	9p21.3	Met	3/17	1/7	2/2	1/3	0/2	0/2	1/1	0/1	-	-	22
		LOH	4/17	3/7	0/2	1/3	0/3	1/2	0/1	1/1	-	-	22
<i>p16(INK4a)</i>	9p21.3	Met	33/81	0/7	2/3	0/3	0/3	0/2	1/1	0/1	4/28	-	21, 22, 23
		LOH	5/27	4/15	0/2	1/3	0/7	1/2	7/10	1/1	-	-	10, 22
<i>p21(waf1)</i>	6p21.2	Met	0/17	0/7	0/2	0/3	0/3	0/2	0/1	0/1	-	-	22
		LOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p27(kip1)</i>	12p13-p12	Met	2/17	1/7	0/2	0/3	0/3	0/2	0/1	0/1	-	-	22
		LOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>PTEN</i>	10q23.3	Met	0/17	0/7	0/2	0/3	0/3	0/2	0/1	0/1	-	-	22
		LOH	-	0/1	-	0/3	1/1	-	-	-	3/14	1/5	34
<i>O-MGMT</i>	10q26	Met	5/103	5/24	0/2	0/3	0/17	0/2	0/21	0/1	1/12	3/9	9, 22, 23
		LOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>DAPK</i>	9q34.1	Met	18/66	0/18	-	-	0/14	-	2/21	-	0/12	4/9	9, 23
		LOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>RARβ2</i>	3p24	Met	1/26	3/18	-	-	0/14	-	6/21	-	0/12	0/9	9
		LOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>RASSF1</i>	3p21.3	Met	29/66	1/18	-	-	6/14	-	10/21	-	2/12	0/9	9, 23
		LOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>CDH1</i>	16q22.1	Met	34/60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24
		LOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>p53</i>	17p13.1	Met	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		LOH	-	0/1	-	0/3	0/1	-	-	-	0/14	0/5	34
<i>FHIT</i>	3p14.2	Met	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		LOH	-	0/1	-	0/3	0/1	-	-	-	0/14	0/4	34
<i>RFPL14</i>	3p21.3	Met	-	-	-	1/3	1/1	-	-	-	5/13	2/4	34
		LOH	-	1/1	-	1/3	0/1	-	-	-	1/13	0/5	34
<i>PLAGL1</i>	6q24.2	Met	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		LOH	-	0/1	-	1/3	0/1	-	-	-	1/13	0/5	34
<i>LATS1</i>	6q25.1	Met	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		LOH	-	0/1	-	2/3	-	-	-	-	3/14	0/4	34
<i>ST8</i>	8q12.1	Met	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		LOH	-	0/1	-	2/3	0/1	-	-	-	3/13	0/5	34
<i>RB1CC1</i>	8q12.1	Met	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		LOH	-	0/1	-	2/3	0/1	-	-	-	3/13	0/5	34
-	12q12-q13	Met	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		LOH	8/24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	6q23-q25	Met	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		LOH	19/25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: Met: metilazione del promotore; LOH: perdita di eterozigosità; ACC: Carcinoma adenoido cistico; MEC: Carcinoma mucoepidermoide; CAP: Carcinoma pleomorfo ex adenoma pleomorfo; SSC: Carcinoma a cellule squamose; AcCC: Carcinoma a cellule aciniche; AdC: Adenocarcinoma (N.A.S.); SDC: Carcinoma dei dotti salivari; BCA: Adenocarcinoma a cellule basali; PA: adenoma pleomorfo; WT: tumore di Warthin; “-“ analisi non eseguita; Ref: Referenza

Analisi molecolari hanno rilevato metilazione di *RAR- 2* in carcinomi mucoepidermoidi di alto grado ed in carcinomi dei dotti salivari supportando il ruolo della metilazione in questo gene nello sviluppo di un fenotipo tumorale aggressivo. Inoltre, nello stesso studio, è stata ritrovata metilazione del gene *O-MGMT* in 3/17 casi di MEC e in un subset di casi di tumore di Warthin; tali dati suggeriscono una associazione comune subcellulare nello sviluppo di questi due tumori⁹.

Lo studio molecolare della regione cromosomica contenente il gene *p16^{INK4A}* non ha rilevato LOH in sette pazienti su otto, escludendo, quindi, questo gene da un possibile ruolo nello sviluppo tumorale di questo istotipo¹⁰.

Una analisi di espressione nei MEC ha mostrato una aumentata espressione di geni della proliferazione e della adesione cellulare quali *IL-6*, *SFN*, *SEMA3F* e

COL6A3, ed una ipo-espressione in geni correlati alla modificazione del DNA, quali, *NHTL1* e *RBBP4*¹¹.

Carcinomi adenoido cistici

Il carcinoma adenoido cistico (ACC) è uno dei tumori epiteliali maligni più comuni delle ghiandole salivari. Studi di citogenetica riportano riarrangiamenti ricorrenti in 12q12-13 e 9p22, delezioni in 6q23-25 e in 17p12-13 e una traslocazione ricorrente tra il cromosoma 6 ed il cromosoma 9 t(6;9) (q23-q25; p21-p22)¹².

Indagini di citogenetica molecolare, mediante analisi di Comparative Genomic Hybridization su metafasi, hanno rilevato eterogeneità nel numero di anomalie riscontrate e nelle regioni coinvolte, con una frequenza di amplificazioni maggiore a quella delle delezioni. Sono state inoltre rilevate anomalie ricorrenti, indipendentemente dal tipo istologico del tumore, quali l'amplificazione del braccio lungo del cromosoma 22 e di 22q13 e la delezione in 12q12-q13¹³⁻¹¹.

Un lavoro recente riporta una analisi citogenetica molecolare ad alta risoluzione, eseguita mediante array CGH, su diciotto casi di ACC; i risultati mostrano un numero medio per caso di undici anomalie e le amplificazioni sono sempre maggiori rispetto alle delezioni. Le amplificazioni più frequenti, ritrovate in più del 60% dei casi, erano osservate nelle regioni 9q33.3-q34.3, 11q13.3, 11q23.3, 19p13.11-p13.3, 21q22.3 e 22q13.33; in tali regioni vi sono localizzati numerosi geni per fattori di crescita e per recettori di fattori di crescita¹⁷.

Gli autori fanno, inoltre, una correlazione tra i risultati e i dati clinico-patologici: pazienti con più di 17 anomalie cromosomiche avevano una prognosi meno favorevole e amplificazioni nelle regioni 4p16.3, 16p13.3, 16q24.1-q24.2 e 17p13.1 risultavano associate a comportamento biologico aggressivo/metastatizzazione di questi tumori¹⁷.

Analisi di perdita di eterozigotità hanno confermato la presenza di frequenti delezioni in 12q e in 6q^{18, 19, 20}. Le delezioni in 12q non erano associate ad aggressività del tumore a differenza di delezioni in 6q associate a parametri clinici ed istologici^{18, 20}. Inoltre, lo studio di espressione mediante RT-PCR di *PLAGL1* e di *LATS1*, localizzati rispettivamente in 6q24.2 e in 6q25 ha escluso il coinvolgimento di tali geni candidati nella tumorigenesi degli ACC¹⁹.

Uno studio molecolare ha rilevato mutazioni in *H-RAS* in due casi e mutazioni in *TP53* in tre casi²¹.

Metilazione del promotore dei geni *p16^{INK4A}*, *RASSF1*, *DAPK* e *O-MGMT*, coinvolti nella regolazione della crescita cellulare, nell'apoptosi e nella riparazione del DNA, è stata rilevata rispettivamente nel 41% (33/81), 34% (29/86), 21% (18/86) e 5% (5/103) dei casi analizzati in quattro studi differenti^{9,21,22,23}.

Lo studio della metilazione della caderina, glicoproteina transmembrana espressa nelle cellule epiteliali e responsabile dell'adesione cellula-cellula calcio dipendente, ha mostrato inattivazione del promotore di questo gene in circa il 60% dei 34 casi analizzati; inoltre lo stato di metilazione del promotore della caderina è correlato con un più alto grado istologico e con l'invasione perineurale degli ACC²⁴.

Analisi di espressione mediante microarray hanno mostrato un profilo di espressione specifico degli ACC quando comparati con altri carcinomi rari; geni specifici overespressi includono parecchi fattori di trascrizione quali SOX4, AP-2a, AP-2g, componenti della matrice extracellulare e membri del pathway Wnt/b-catenina²⁵.

È stato identificato un network di quattordici geni correlati al cancro tra i quali *CCND2* (ciclina D2), *PTTG1* (pituitary tumor-transforming gene), *TIAMI* (T-cell lymphoma invasion and metastasis 1) mediante analisi di espressione in un paziente ACC; tali geni risultavano iper-espressi in regioni cromosomiche, quali 3p21, 3q29, 4q35, 5p13.3, 5q35, 6q27, 7q21, 11p14, 11q14, 11q23, 12p13, 12q24.3, 15q21, 16q24 e 21q22, amplificate con ricorrenza in una precedente analisi CGH su sei casi di ACC¹⁶.

In un altro studio mediante microarray è stato ritrovato che i geni overespressi negli ACC erano associati alla morfogenesi, alla neurogenesi, all'apoptosi ed alla regolazione del ciclo cellulare, suggerendo che gli ACC derivino da tessuto delle ghiandole salivari che è andato incontro a dedifferenziazione in risposta ad eventi oncogenetici²⁶.

ADENOCARCINOMI

Carcinoma a cellule aciniche

Il carcinoma a cellule aciniche costituisce il terzo tumore epiteliale maligno più comune delle ghiandole salivari.

Studi molecolari hanno ritrovato metilazione di *RASSF1* in tumori di questo istotipo di alto grado e con metastatizzazione; *RASSF1* è responsabile della riparazione del DNA indotta da agenti mutageni⁹.

L'analisi della regione contenente il gene *PTEN* non ha mostrato perdita di eterozigotà in quattro casi studiati¹⁰.

Adenocarcinoma pleomorfo a basso grado

Studi citogenetici eseguiti su casi di adenocarcinoma pleomorfo a basso grado hanno ritrovato anomalie cromosomiche nel braccio lungo del cromosoma 12 simili a quelle riscontrate in carcinomi adenoido cistici; questi dati hanno suggerito che entrambi i tipi di tumore condividessero una istogenesi comune¹².

In uno studio molecolare non è stata ritrovata perdita di eterozigosità nella regione associata al gene *PTEN* in quattro casi analizzati¹⁰.

Adenocarcinoma (N.A.S.)

Studi di Comparative Genomic Hybridization hanno rilevato un numero maggiore di amplificazioni rispetto alle delezioni e nessuna alterazione ricorrente nei tre pazienti analizzati¹⁶. Studi molecolari hanno identificato, in uno dei due casi analizzati, metilazione e perdita di eterozigosità di *RB1* insieme a perdita di eterozigosità di *p14^{ARF}* e *p16^{INK4A}* (22).

ADENOCARCINOMI RARI

Adenocarcinoma a cellule basali

Uno studio di comparative genomic hybridization su un caso rilevava quattro amplificazioni in 9p21-pter, 18q21-22.3, 22q11.23-13.31 e perdite in 2q24.2, 4q25-27; le regioni 22q13.1 e 18q21.1-q22.3 contengono rispettivamente l'oncogene *c-sis* e il protooncogene *BCL2*, noto per essere coinvolto nella regolazione dell'apoptosi¹⁴.

Un'altra recente analisi di CGH ha evidenziato, in un caso, la perdita dei cromosomi 2, 6 e 7, e l'amplificazione dei cromosomi 1, 8 e di 12q con un picco di amplificazione in 12q14-q15, regione in cui sono localizzati i geni *MDM2*, *CDK4* e *HMGIC* coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare. L'amplificazione del gene *MDM2*, in particolare, è stata già descritta nei tumori misti delle ghiandole salivari e nell'adenocarcinoma a cellule basali²⁸.

Uno studio di citogenetica classica nella lesione metastatica mandibolare di un paziente rilevava una inversione pericentrica del cromosoma 17 in un quarto delle cellule esaminate; l'analisi mediante FISH della lesione primaria della parotide mostrava una trisomia del cromosoma 4 in un quinto delle cellule. Tuttavia non è possibile trarre alcuna conclusione a riguardo in quanto tali dati sono relativi ad un unico paziente²⁷.

L'analisi di perdita di eterozigosità condotta su un caso ha mostrato LOH per il marcatore D9S1748, localizzato all'interno del gene *CDKN2A* nella regione 9p21 (22).

Carcinoma dei dotti salivari

Studi di silenziamento genico hanno rilevato nei carcinomi dei dotti salivari alterazione del pattern di metilazione e perdita di eterozigosità a livello di alcuni geni. In particolare, è stato rilevato silenziamento di *p16^{INK4A}* sia per perdita di eterozigosità o delezione omozigote (7/10 casi) che per rimetilazione del promotore (1 caso analizzato)^{10,22}. È stato quindi ipotizzato che il gene oncosoppressore *p16^{INK4A}* possa essere importante nella patogenesi dei tumori di questo istotipo¹⁰.

Metilazione del promotore è stata rilevata in un unico caso analizzato per i geni *RBI* e *p14^{ARF}* (22).

Silenziamento per metilazione del promotore è stato riscontrato anche nel gene *RASSF1* e nel gene *RARB2* rispettivamente nel 48% e nel 29% dei casi analizzati da Williams e coautori⁹. La proteina RASSF1 eterodimerizza con altri membri della famiglia per indurre l'attivazione del gene *RAS* e la tumorigenesi. Uno studio di espressione di carcinomi dei dotti salivari ha rilevato, su 5000 geni, un aumento dell'espressione in diciotto geni tra cui, in modo significativo *VHL*, gene coinvolto in differenti tumori e *MCT1*, oncogene coinvolto nel ciclo cellulare²⁹.

TUMORI MALIGNI MISTI

Carcinoma ex adenoma pleomorfo

Studi di citogenetica in carcinomi ex adenoma pleomorfo (CAP) hanno rilevato anomalie sovrapponibili a quelle degli adenomi pleomorfi quali riarrangiamenti ricorrenti in 8q12 e in 12q13-15 ed alterazioni consistenti nel braccio corto del cromosoma 17; inoltre anche in questi tumori sembra determinante il coinvolgimento del gene *PLAG1*³⁰.

Analisi di Comparative Genomic Hybridization hanno rilevato un numero di anomalie maggiore nella parte maligna rispetto a quella benigna; inoltre in cinque su sette casi (71%) le stesse regioni cromosomiche, quali 4p, 6q, 12p, 13q, 15q11-21, 19p e 21p, erano coinvolte in cambiamenti genetici sia nella componente adenomatosa che carcinomatosa della stessa lesione, suggerendo che un accumulo o un numero aumentato di anomalie potesse essere associato con lo sviluppo della componente carcinomatosa dei CAP³¹.

In una analisi molecolare è stata ritrovata una mutazione nel gene *HRAS1* nell'unico caso analizzato e metilazione del promotore del gene *p16^{INK4A}* in due casi su tre^{21,22}.

Studi di perdita di eterozigotità hanno rilevato nella componente benigna un numero minore di delezioni che tuttavia vengono conservate in quella maligna, suggerendo un'origine clonale comune per entrambe le componenti di questo tumore^{32,33}.

CARCINOMI RARI

Carcinoma primario delle cellule squamose

Analisi di LOH in questo istotipo ha rilevato perdita di eterozigotità per numerosi marcatori localizzati in regioni in cui mappano geni oncosoppressori noti.

LOH è stata rilevata nel 66% dei casi analizzati (2/3) per i geni *ST8*, *RB1CC1* e *LATS1*, nel 33% (1/3) per i geni *PLAGL1*, *p14^{ARF}* e *p16^{INK4A}*, e nel 30% (2/6) per i geni *RBI*.

Silenziamento genico per il gene *RBI* e *p14^{ARF}* è stato rilevato per metilazione del promotore nel 33% (1/3) dei casi^{22,34}.

In uno studio *in vitro*, eseguito confrontando quattro linee cellulari con elevata e ridotta capacità invasiva, è stato riscontrato aumento di espressione del gene *CCND2* (ciclina 2) di otto volte superiore nelle 2 linee cellulari caratterizzate da elevata capacità invasiva rispetto alle altre due. Questi risultati indicano che l'aumento di espressione del gene *CCND2* nelle linee cellulari di carcinoma delle cellule squamose modula la proliferazione cellulare, ed è associata alla capacità invasiva delle cellule³⁵.

TUMORI BENIGNI

Adenomi pleomorfi

L'analisi citogenetica degli adenomi pleomorfi (PA) ha mostrato una frequenza di anomalie cromosomiche alta, ovvero in circa il 70% dei casi. Circa il 40% dei PA presenta un riarrangiamento del cromosoma 8 nella regione 8q12.1 in cui è localizzato il gene *PLAG1*; approssimativamente l'8% ha un riarrangiamento in 12q14, una piccola percentuale ha altre anomalie mentre il 30% presenta un cariotipo normale (5; 36).

Anomalie citogenetiche ricorrenti, quali la t(3;8)(p21;q12) e la t(5;8)(p13;q12), sono traslocazioni che coinvolgono la regione 5' non codificante di *PLAG1*, gene localizzato su 8q12 codificante per una piccola proteina zinc-finger. I geni coinvolti nella fusione con *PLAG1* sono *CTNNB1* (Beta catenina) e *SII* (fattore di allungamento *SII*) in 3p21 e *LIFR* (leukemia inhibitor factor receptor gene) in 5p13; la fusione genica risulta in un'espressione alterata di *PLAG1* in seguito allo scambio del promotore. Overespressione di *PLAG1* può essere dovuta anche a riarrangiamenti criptici intracromosomici in 8q che danno origine a prodotti di fusione quali *CHCHD7-PLAG1* e *TCEA1-PLAG1*.

Anomalie citogenetiche in 12q14 coinvolgono il gene *HMGA2* e sono state ritrovate in altri tumori solidi benigni; tali alterazioni comprendono la t(3;12)(p14.2;q14.5) in cui il gene partner di *HMGA* è *FHIT* e la ins(9;12)(p23;q12q15) in cui il gene partner è *FHIT*⁵.

Sono state descritte anche altre anomalie quali t(10;12), ins(13;12) e una inversione paracentrica di 12q e, recentemente, una t(1;4;8), una ins(9;8) e una delezione del braccio corto del cromosoma 12³⁶.

Studi di comparative genomic hybridization nei PA hanno rilevato in due casi analizzati delezioni in 9q12-q21.11 e in 16q11.2¹⁴.

In uno studio molecolare sono stati analizzati i geni *TP53*, *p16^{INK4A}*, *H-RAS* e *K-RAS* su 28 casi. Metilazione di *p16^{INK4A}*, mutazioni di *TP53*, di *H-RAS* e di *K-RAS* erano ritrovate solamente nella componente epiteliale rispettivamente nel

7%, nel 28%, nel 39% e nel 14% dei casi; l'evidenza che la componente mesenchimale e transizionale non presentassero alcuna mutazione suggerisce che il carcinoma origini dalla componente adenomatosa²¹.

Inoltre il ritrovamento di metilazione di *p16^{INK4A}* e di mutazioni in *TP53* in quattro carcinomi adenoido cistici ed un carcinoma ex adenoma pleomorfo suggerisce che tali geni abbiano un ruolo nella progressione maligna dell'adenoma pleomorfo²¹.

Un'altra analisi molecolare ha messo in evidenza perdita di eterozigotità in 3p nel 57% dei 14 casi analizzati; tale risultato ha fatto ipotizzare agli autori che in tale regione vi fossero localizzati geni che abbiano un ruolo negli stadi iniziali della tumorigenesi³⁴.

È stata inoltre ritrovata perdita di eterozigotità di *PTEN*, di *RFLP14*, e di *LATS1-SHPR* rispettivamente nel 21%, 38% e 21% dei casi analizzati³⁴.

Una analisi di espressione di 425 geni associati a tumori ha rilevato aumento di espressione in undici geni e diminuzione in due. In particolare sono risultati iperespressi i geni *COL11A2*, *HXB* e *TGFB2*, *KRT14* e ipoespressi i geni *KRT18* e *LYZ*³⁷.

L'espressione del gene *TGFB2* e *KRT14* sembra essere molto interessante in quanto differente nei diversi sottotipi istologici del tumore.

Un aumento di espressione di *TGFB2* è infatti stato rilevato nel sottotipo classico e mixoide, mentre diminuzione è presente nel sottotipo cellulato. *TGFB2* ha una funzione autocrina aumentando la crescita cellulare e/o riducendo l'immunosorveglianza dello sviluppo del tumore.

Questi dati suggeriscono che il potenziale proliferativo del sottotipo cellulare è più basso rispetto agli altri due e, quindi, iper-espressione di *TGFB2* nei tipi mixoidi potrebbe essere correlata all'alta ricorrenza di questi sottotipi³⁷.

Il gene *KRT14*, inoltre, è iperespresso nel sottotipo classico e cellulare, mentre risulta iporegolato nel sottotipo mixoide. *KRT14* è normalmente espresso nelle cellule basali dell'epidermide e la differente espressione nei sottotipi di adenoma pleomorfo potrebbe riflettere la differente composizione cellulare. *TGFB2* e *KRT14*, sembrano quindi essere importanti al fine di sottoclassificare l'adenoma pleomorfo³⁷.

Tumore di Warthin

Il tumore di Warthin (WT) è il secondo tumore benigno più comune delle ghiandole salivari.

Studi di citogenetica classica riportano come anomalie ricorrenti riarrangiamenti strutturali nel braccio corto del cromosoma 6 e una traslocazione t(11:19)(q21;p12)³⁸.

Metilato del gene *O-MGMT* è stata ritrovata nel 33% dei casi analizzati (3/9) insieme ad un sottogruppo di MEC⁹.

Analisi molecolari hanno rilevato perdita di eterozigosità in 3p in 3/5 casi analizzati suggerendo che in tale regione siano localizzati geni responsabili del processo iniziale di tumorigenesi in tumori benigni quali il Tumore di Warthin e l'adenoma pleomorfo³⁴.

Uno studio di espressione di 425 geni associati a tumori ha mostrato aumento di espressione di cinque geni tra cui *HBX*, *AREG*, *WEE1*, *E2F3*; diminuzione di espressione è stata rilevata in sei geni, tra cui *ANG* e *TGFBR3*. I geni *AREG*, *WEE1*, *E2F3* e *TGFBR3*, coinvolti nel ciclo cellulare e *ANG*, coinvolto nella neo-vascularizzazione, sarebbero correlati alla proliferazione tumorale del WT³⁷.

Conclusioni

I tumori delle ghiandole salivari sono caratterizzati da una grossa complessità istopatologica e da eterogeneità genetica; è probabile, quindi, che meccanismi diversi siano alla base della cancerogenesi nei diversi tipi di tumore.

Traslocazioni specifiche ricorrenti sono state identificate negli adenomi pleomorfi, nei carcinomi mucopidermoidi e nei tumori di Warthin; amplificazioni in alcune regioni cromosomiche sono state recentemente associate ad aggressività e capacità di metastatizzazione in tumori adenoido-cistici.

È importante estendere e approfondire le analisi genetiche dei diversi istotipi di questi tumori per una migliore comprensione dei meccanismi eziopatogenetici e per l'identificazione di markers utili per la diagnosi e la prognosi.

Bibliografia

- 1 Albertson DG, Collins C, McCormick F, W Gray. *Nat Gen.* 2003; 34: 368-76.
- 2 Freinberg AP, Ohisson R, Henikoff S. *Nat Rev Gen.* 2006; 7: 21-33.
- 3 Volgestein B and Kinzler KW. *Nat Med.* 2004;10:789-99.
- 4 Nevus JR and Potti A, *Nat Rev Gen.* 2007; 8: 601 – 609.
- 5 Cheuk W and Chan J.K.C. *Hystopathogy.* 2007; 51:1-20; Review.
- 6 Tonon G, Gelhaus KS, Yonescu R, Kaye FJ, Kirsch. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004; 152: 15-22.
- 7 Jee K, Heikinheimo K, Knuutila S, Leivo I. *Eur J Hum Gen.* 2007; 15 (Suppl.1):170.
- 8 Leivo I. *Acta Oncologica* 2006; 45: 662-668. Review.
- 9 Williams MD, Chakravarti N, Kies MS, Maruya S, Myers JN, Haviland JC, Weber RS, Lotan R, El-Naggar AK. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 7353-8.
- 10 Cerilli LA, Swartzbaugh JR, Saadut R, Marshall CE, Rumpel CA, Moskaluk CA, Frierson HF. *Jr Hum Pathol.* 1999; 30:1242-6.
- 11 Leivo I, Jee KJ, Heikinheimo K, Laine M, Ollila J, Nagy B, Knuutila S. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005;156: 104-13.
- 12 Martins C, Fonseca I, Roque L, Ribeiro C, Soares J. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001; 128:130-6.
- 13 El-Rifai W, Rutherford S, Knuutila S, Frierson HF, Moskaluk CA. *Neoplasia.* 2001; 3:173-8.
- 14 Toida M, Balázs M, Mori T, Ishimaru JI, Ichihara H, Fujitsuka H, Hyodo I, Yokoyama K, Tatematsu N, Adány R. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001; 127:34-7.
- 15 Freier K, Flechtenmacher C, Walch A, Ohl S, Devens F, Burke B, Hassfeld S, Lichter P, Joos S, Hofele C. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005; 159: 89-95 .
- 16 Kasamatsu A, Endo Y, Uzawa K, Nakashima D, Koike H, Hashitani S, Numata T, Urade M, Tanzawa H. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005; 37:1869-80.
- 17 Vékony H, Ylstra B, Wilting SM, Meijer GA, van de Wiel MA, Leemans CR, van der Waal I, Bloemena E. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 3133-9.
- 18 Rutherford S, Hampton G.M., Frierson H.F, Moskaluk CA. *Lab Inv.* 2005; 85: 1076-85.
- 19 Rutherford S, Yu Y, Rumpel CA, Frierson HF Jr, Moskaluk CA. *Cancer Lett.* 2006; 236: 309-17.
- 20 Stallmach I, Zenklusen P, Komminoth P, Schmid S, Perren A, Roos M, Jianming Z, Heitz PU, Pfaltz M. *Virchows Arch.* 2002; 440: 77-84.
- 21 Augello C, Gregorio V, Bazan V, Cammareri P, Agnese V, Cascio S, Corsale S, Calò V, Gullo A, Passantino R, Gargano G, Bruno L, Rinaldi G, Morello V, Gerbino A, Tomasino RM, Macaluso M, Surmacz E, Russo A. *J Cell Physiol.* 2006; 207:654-9.
- 22 Kishi M, Nakamura M, Nishimine M, Ikuta M, Kirita T, Konishi N. *Oral Oncol.* 2005; 41: 161-9.
- 23 Li J, El-Naggar A, Mao L. *Cancer.* 2005; 104:771-6.
- 24 Zhang CY, Mao L, Li L, Tian Z, Zhou XJ, Zhang ZY, Li J. *Cancer* 2007; 110:87-95.
- 25 Frierson HF, El-Naggar AK, Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI, Cheng J, Saku T, Moskaluk CA., Hampton G. *Am J Path.* 2002; 161: 1315-1323.
- 26 Patel KJ, Pambuccian SE, Ondrey FG, Adams GL, Gaffney PM. *Oral Onc.* 2006; 42: 994-1004.
- 27 Manor E, Sion-Vardy N, Bodner L. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006; 166: 186-8.
- 28 Scholz N, Krugmann J, Scholtz A, Höllrigl A, Verdorfer I. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007; 172:87-9.
- 29 Maruya S, Kim HW, Weber RS, Lee JJ, Kies M, Luna MA, Batsakis JG, El-Naggar AK. *J Mol Diagn.* 2004; 6: 180-90.
- 30 Martins C, Fonseca I, Roque L, Pereira T, Ribeiro C, Bullerdiel J, Soares J. *Mod Pathol.* 2005; 18:1048-55.

- 31 Morio T, Morimitsu Y, Hisaoka M, Makishima K, Hashimoto H. *Pathol Int.* 2002; 52:501-7
- 32 Fowler MH, Fowler J, Ducatman B, Barnes L, Hunt JL. *Mod Pathol.* 2006; 19:350-5.
- 33 El-Naggar AK, Callender D, Coombes MM, Hurr K, Luna MA, Batsakis JG. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000; 27:162-8.
- 34 Honjo N, Gunduz M, Fukushima K, Cengiz B, Beder LB, Gunduz E, Nagatsuka H, Xiao J, Shimizu K, Nishizaki K. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007; 137:119-25.
- 35 Liu SC, Bassi DE, Zhang SY, Holoran D, Conti CJ, Klein-Szanto AJ. *Mol Carcinog.* 2002; 34:131-9.
- 36 Kandasamy J, Smith A, Diaz S, Rose B, O'Brien C. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007; 177:1-5.
- 37 Kainuma K, Katsuno S, Hashimoto S, Suzuki N, Oguchi T, Asamura K, Nakajima K, Usami S. *Auris Nasus Larynx.* 2004; 31: 261-8.
- 38 Martins C, Fonseca I, Roque L, Soares J. *Oral Oncol.* 1997; 33:344-7.