

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

**SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E
FARMACEUTICHE**

CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA



**Medulloblastoma dalla morfologia alla clinica:
integrazione tra sottotipo istologico, gruppo
molecolare e microambiente immunitario tumorale**

Relatore:

Chiar.mo. Prof. Valerio Gaetano Vellone

Correlatore:

Egr. Dott. Gabriele Gaggero

Candidata:

Alice Bianco

Anno accademico 2025-2026

ABSTRACT ITALIANO

Introduzione: Il medulloblastoma è una neoplasia pediatrica dalla grande eterogeneità morfologica, molecolare e immunologica. Obiettivo dello studio è caratterizzare il fenotipo clinico-biologico del medulloblastoma integrando classificazione WHO, proliferazione e microambiente tumorale, e in seguito valutarne le associazioni cliniche.

Materiali e metodi: È stato condotto uno studio osservazionale retrospettivo monocentrico su 54 pazienti operati presso l'IRCCS Gaslini tra il 2000 e il 2025, i casi sono stati revisionati e riclassificati da due patologi. I dati anatomopatologici e clinici sono stati integrati dai rispettivi gestionali. L'immunoistochimica, eseguita su piattaforma Ventana/Roche BenchMark TX comprendeva un pannello di 6 marcatori: Ki67, p53, β -catenina, NKG2A, p62 e CD163. Sono effettuate analisi statistiche utilizzando test non parametrici e correzione FDR.

Risultati: Il 63,0% dei tumori è risultato essere classico; il 35,2% appartiene al gruppo SHH. Istotipo e gruppo molecolare erano associati ($q \approx 0,01$). La variante a grandi cellule/anaplastica mostrava una proliferazione superiore rispetto al classico. Il marcatore dell'autofagia p62 correlava con CD163 intratumorale ($p=0,53$) e perivascolare ($p=0,44$). Progressione/recidiva interessava 17/53 pazienti. Radicalità chirurgica e metastasi presentavano associazioni nominali non confermate dopo FDR. Uno score esplorativo NKG2A-p62-CD163 distingueva frequenze di progressione o recidiva del 9,5% e 46,9% in due gruppi di pazienti (p nominale=0,0062. Il test di permutazione ha prodotto $p \approx 0,11$, evidenziando la natura esplorativa dello score.

Conclusioni: L'integrazione dei vari parametri identifica profili fenotipici distinti, i risultati relativi i gruppi molecolari e gli istotipi sono in linea con la classificazione WHO. Lo score esplorativo fornisce suggestive informazioni prognostiche ma necessita di una validazione indipendente.

ABSTRACT INGLESE

Introduction: Medulloblastoma is a paediatric neoplasm characterised by marked morphological, molecular and immunological heterogeneity. The aim of this study was to characterise the clinico-biological phenotype of medulloblastoma by integrating WHO classification, proliferation and the tumour microenvironment, and subsequently to evaluate their clinical associations.

Materials and methods: We conducted a retrospective, observational, single-centre study of 54 patients who underwent surgery at IRCCS Istituto Giannina Gaslini between 2000 and 2025. All cases were reviewed and reclassified by two pathologists. Pathological and clinical data were integrated from the respective institutional databases. Immunohistochemistry, performed on the Ventana/Roche BenchMark TX platform, included a panel of six markers: Ki67, p53, β -catenin, NKG2A, p62 and CD163. Statistical analyses were performed using non-parametric tests with false discovery rate (FDR) correction.

Results: Classic histology accounted for 63.0% of tumours, and 35.2% belonged to the SHH group. Histotype and molecular group were significantly associated ($q \approx 0.01$). The large cell/anaplastic variant showed higher proliferation than the classic type. The autophagy marker p62 correlated with intraparenchymal ($\rho = 0.53$) and perivascular ($\rho = 0.44$) CD163. Progression/recurrence occurred in 17/53 patients. Extent of surgical resection and metastatic status showed nominal associations that were not confirmed after FDR correction. An exploratory NKG2A–p62–CD163 score distinguished two groups of patients with progression/recurrence rates of 9.5% and 46.9%, respectively (nominal $p = 0.0062$. The permutation test yielded $p \approx 0.11$, underscoring the exploratory nature of the score).

Conclusions: Integration of these parameters identifies distinct phenotypic profiles, and the findings on molecular groups and histotypes are consistent with the WHO classification. The exploratory score provides suggestive prognostic information but requires independent validation.

SOMMARIO

ABSTRACT ITALIANO	2
ABSTRACT INGLESE	3
INDICE DELLE TABELLE	6
INDICE DEI GRAFICI.....	7
INDICE DELLE FIGURE	8
1. PREMESSA GENERALE	9
1.1 IL MEDULLOBLASTOMA	9
1.1.1 <i>Epidemiologia e caratteri generali</i>	9
1.1.2 <i>Patogenesi e caratteristiche genomiche</i>	10
1.1.2.1 Eterogeneità molecolare ed evoluzione classificativa.....	11
1.1.2.2 Correlazioni tra pattern istologici e gruppi molecolari	12
1.1.3 <i>Clinica e diagnosi del medulloblastoma</i>	13
1.1.3.1 Quadro clinico	13
1.1.3.2 Iter diagnostico	14
1.1.3.3 Diagnosi istologica e caratterizzazione molecolare	15
1.1.4 <i>Trattamento e prognosi del medulloblastoma</i>	17
1.1.4.1 Gestione dell'idrocefalo	17
1.1.4.2 Chirurgia	18
1.1.4.3 Radioterapia e stratificazione del rischio.....	18
1.1.4.4 Chemioterapia	20
1.1.4.5 Terapia a bersaglio molecolare e immunoterapia	20
1.1.4.6 Prognosi generale del medulloblastoma	21
1.2 CLASSIFICAZIONE MOLECOLARE WHO CNS5 2021	23
1.2.1 <i>Generalità</i>	23
1.2.2 <i>Grado WHO del medulloblastoma</i>	24
1.2.3 <i>Medulloblastoma WNT-attivato</i>	26
1.2.4 <i>Medulloblastoma SHH-attivato TP53-wildtype</i>	30
1.2.5 <i>Medulloblastoma SHH-attivato TP53-mutato</i>	36
1.2.6 <i>Medulloblastoma non-WNT/non-SHH</i>	42
1.3 MEDULLOBLASTOMA ISTOLOGICAMENTE DEFINITO	48
1.3.1 <i>Medulloblastoma classico</i>	53
1.3.2 <i>Medulloblastoma desmoplastico/nodulare</i>	54
1.3.3 <i>Medulloblastoma ad estensiva nodularità (MBEN)</i>	55
1.3.4 <i>Medulloblastoma a grandi cellule/anaplastico (LC/A)</i>	56
1.4 IL MICROAMBIENTE TUMORALE	60
1.4.1 <i>Generalità sul microambiente tumorale</i>	60
1.4.2 <i>Cellule NK e TME</i>	64
1.4.3 <i>Macrofagi e TME</i>	71
1.4.4 <i>Autofagia e TME</i>	82
1.4.4.1Autofagia e medulloblastoma.....	85
2. OBIETTIVI DELLO STUDIO	88
2.1 CULTURAL GAP E RAZIONALE DELLO STUDIO	88
2.2 OBIETTIVI DELLO STUDIO	91
3. MATERIALI E METODI	92

4. RISULTATI.....	103
4.1 CARATTERISTICHE DELLA POPOLAZIONE IN STUDIO	103
4.2 CORRELAZIONI SECONDO ISTOTIPO.....	106
4.3. CORRELAZIONI SECONDO GRUPPO MOLECOLARE	110
4.4 CORRELAZIONI CON IL DECORSO CLINICO	112
4.4.1 Score prognostico sperimentale.....	114
5. DISCUSSIONE.....	116
6. CONCLUSIONI	124
BIBLIOGRAFIA.....	126

INDICE DELLE TABELLE

TABELLA 1. CLASSIFICAZIONE MOLECOLARE WHO CNS52021, GRUPPI WNT-ATTIVATO E SHH-ATTIVATO	25
TABELLA 2. CLASSIFICAZIONE MOLECOLARE WHO CNS52021, GRUPPO NON-WNT /NON-SHH-ATTIVATO	25
TABELLA 3. GRUPPO SHH-ATTIVATO E SOTTOGRUPPI	41
TABELLA 4. GRUPPO NON-WNT/NON-SHH E RELATIVI SOTTOGRUPPI	47
TABELLA 5. PRINCIPALI VIE METABOLICHE DEI MACROFAGI M1 E M2.....	72
TABELLA 6. PRINCIPALI METABOLITI COINVOLTI NELL'ATTIVAZIONE DEI MACROFAGI M2.....	79
TABELLA 7. MARCATORI IMMUNOISTOCHIMICI E LORO CARATTERISTICHE PRINCIPALI	94
TABELLA 8. BRACCI DELLO STUDIO	99
TABELLA 9. CARATTERISTICHE DEMOGRAFICHE	103
TABELLA 10. CARATTERISTICHE CLINICO-TERAPEUTICHE.....	103
TABELLA 11. DISTRIBUZIONE PER ISTOTIPO	104
TABELLA 12. DISTRIBUZIONE PER GRUPPO MOLECOLARE	104
TABELLA 13. PARAMETRI PROLIFERATIVI.....	104
TABELLA 14. MEDIANE DEI MARCATORI QUANTITATIVI DEL MICROAMBIENTE PER 10 HPF	105
TABELLA 15. MARCATORI QUALITATIVI	105
TABELLA 16. DISTRIBUZIONE DELLE VARIABILI QUANTITATIVE PER ISTOTIPO	106
TABELLA 17. CONFRONTI POST-HOC DELLE VARIABILI QUANTITATIVE	106
TABELLA 18. DISTRIBUZIONE DELLE VARIABILI CATEGORICHE PER ISTOTIPO	107
TABELLA 19. TEST GLOBALI PER ISTOTIPO E CORREZIONE BENJAMINI-HOCHBERG	108
TABELLA 20. VARIABILI QUANTITATIVE PER GRUPPO MOLECOLARE: MEDIANE (IQR), P E Q.....	110
TABELLA 21. DISTRIBUZIONE DELLE VARIABILI CATEGORICHE PER GRUPPO MOLECOLARE, P E Q.....	111
TABELLA 22. CONFRONTI UNIVARIATI CON PROGRESSIONE E RECIDIVA, P NOMINALE E Q FDR.....	113
TABELLA 23. PUNTI E CUT-OFF PER PARAMETRO	114
TABELLA 24. DISTRIBUZIONE PER CATEGORIA DELLO SCORE SPERIMENTALE	114

INDICE DEI GRAFICI

GRAFICO 1. DISTRIBUZIONE PER ISTOTIPO.....	103
GRAFICO 2. DISTRIBUZIONE PER GRUPPO MOLECOLARE.....	104
GRAFICO 3. MARCATORI QUANTITATIVI DEL MICROAMBIENTE PER 10HPF	105
GRAFICO 4. MEDIANE DI Ki67 E INDICE MITOTICO PER ISTOTIPO.....	106
GRAFICO 5. DISTRIBUZIONE CONGIUNTA DEGLI ISTOTIPI E DEI GRUPPI MOLECOLARI	110
GRAFICO 6. PROGRESSIONE/RECIDIVA SECONDO RADICALITÀ CHIRURGICA.....	112
GRAFICO 7. PROGRESSIONE/RECIDIVA PER CATEGORIA DELLO SCORE SPERIMENTALE	114

INDICE DELLE FIGURE

FIGURA 1. MEDULLOBLASTOMA ISTOTIPO CLASSICO	53
FIGURA 2. MEDULLOBLASTOMA ISTOTIPO DESMOPLASTICO NODULARE.....	55
FIGURA 3. MEDULLOBLASTOMA ISTOTIPO AD ESTENSIVA NODULARITÀ.....	55
FIGURA 4. MEDULLOBLASTOMA ISTOTIPO A GRANDI CELLULE/ANAPLASTICO	56
FIGURA 5. BETA CATENINA POSITIVITÀ CITOPLASMATICA	97
FIGURA 6. CD163, POSITIVITÀ DI MEMBRANA, DISPOSIZIONE PERIVASCOLARE	97
FIGURA 7. CD 163, POSITIVITÀ DI MEMBRANA, DISPOSIZIONE INTRATUMORALE	97
FIGURA 8. Ki67, POSITIVITÀ NUCLEARE	98
FIGURA 9. p62, POSITIVITÀ CITOPLASMATICA	98
FIGURA 10. ALGORITMO RICLASSIFICATIVO SURROGATO	99

1. PREMESSA GENERALE

1.1 Il medulloblastoma

1.1.1 Epidemiologia e caratteri generali

Il medulloblastoma è la seconda neoplasia più frequente dell'età pediatrica. Nonostante possa insorgere a tutte le età, si riscontra con frequenza significativamente maggiore nell'età pediatrica, dove rappresenta circa il 20% di tutte le neoplasie intracraniche¹. È inoltre il tumore embrionale del SNC più comune, rappresentando circa il 63%–65% di tutti i tumori embrionali diagnosticati in questa fascia d'età¹.

L'incidenza annuale complessiva è di 0,15 casi ogni 100.000 abitanti, mentre nell'età pediatrica sale a circa 0,49 casi per 100.000 bambini².

L'età mediana alla diagnosi è di 9 anni. La maggioranza dei casi viene diagnosticata prima dei 15 anni, con un picco di incidenza tra i 3 e i 7 anni; si registra inoltre una predominanza nel sesso maschile con un rapporto maschi:femmine di circa 1,7:1. Come per gli altri tumori cerebrali ad alto grado, l'incidenza del medulloblastoma differisce tra i vari gruppi etnici. Negli Stati Uniti, infatti, l'incidenza annuale è maggiore tra la popolazione bianca non ispanica, seguita dalla popolazione ispanica e da quella afroamericana¹.

Tutte le varianti istologiche e i sottogruppi molecolari di medulloblastoma rientrano nella categoria delle neoplasie embrionali del sistema nervoso centrale WHO grado 4; ciononostante, lo spettro prognostico appare ampiamente eterogeneo: specifici sottogruppi molecolari, in primis quello WNT-attivato, sono caratterizzati da un decorso clinico nettamente più favorevole e da un'eccellente risposta ai trattamenti chemio-radioterapici¹.

Sotto l'aspetto topografico, la sede di insorgenza del medulloblastoma è circoscritta alle strutture neuroassiali della fossa cranica posteriore; in particolare a livello del quarto ventricolo o del parenchima cerebellare. Diverse evidenze

scientifiche correlano inoltre la precisa sede anatomica di insorgenza al gruppo molecolare³, in particolare:

- A livello del verme cerebellare e del tetto del IV Ventricolo (sede mediale) insorge prevalentemente il gruppo molecolare non-WNT/non-SHH;
- Negli emisferi cerebellari (sede laterale) il sottogruppo maggiormente coinvolto è SHH-attivato;
- Dalle cellule del tronco encefalico dorsale e a livello del forame di Luschka (angolo ponto-cerebellare) prendono origine medulloblastomi della classe WNT-attivato.

Il profilo istopatologico del medulloblastoma è caratterizzato da piccole cellule scarsamente differenziate, con alto rapporto nucleo:citoplasma, elevata attività mitotica e marcata apoptosi¹. La ricca variabilità architetturale e citologica si può manifestare come formazione di noduli, differenziazione neurocitica o ganglionare, o ancora differenziazione miogenica e/o melanotica. Tali svariate caratteristiche morfologiche possono essere riscontrate in tutti i gruppi molecolari di medulloblastoma¹.

1.1.2 Patogenesi e caratteristiche genomiche

Le cause del medulloblastoma sono in gran parte poco chiare e si ritiene che la maggior parte dei casi (95%) insorga sporadicamente. Assume fondamentale rilevanza la componente genetico-costituzionale: la presenza di mutazioni germinali e sindromi di predisposizione ereditaria definisce una precisa quota di pazienti (5-6%), all'interno della quale il medulloblastoma si manifesta in associazione a rari quadri sindromici complessi⁴. Le principali associazioni si verificano in seguito a mutazioni germline nei geni ELP1, SUFU e PTCH1 (Sindrome di Gorlin); TP53 (Sindrome di Li-Fraumeni), APC (Poliposi Adenomatosa Familiare), CREBBP (Sindrome di Rubinstein-Taybi), NBN (Sindrome da rottura di Nijmegen), PALB2, BRCA2¹.

L'osservazione delle rare forme sindromiche ereditarie e lo studio delle mutazioni caratterizzanti le stesse è stata di fondamentale importanza per la

comprensione dei meccanismi patogenetici del medulloblastoma. In particolare, l'identificazione delle mutazioni germinali nei geni PTCH1 e APC — responsabili rispettivamente della sindrome di Gorlin e della Poliposi Adenomatosa Familiare— ha consentito di svelare il ruolo causale primario delle vie di segnalazione Sonic Hedgehog (SHH) e WNT. Le successive indagini genomiche ed epigenomiche hanno dimostrato come i medesimi pathway siano deregolati nella stragrande maggioranza dei casi sporadici attraverso mutazioni somatiche acquisite o riorganizzazioni cromosomiche strutturali^{5,6}.

Recenti evidenze scientifiche hanno descritto il dettagliato panorama genomico del medulloblastoma: alcuni geni driver correlati ad uno specifico gruppo molecolare- PTCH1 e il gruppo SHH-attivato, CTNNB1 e il gruppo WNT-attivato, e MYC e il gruppo non-WNT/non-SHH attivato - presentano una frequenza di alterazione relativamente elevata quando osservati in ampie coorti di pazienti. Inoltre, sebbene altre alterazioni genetiche siano state riscontrate con una minor frequenza, esse convergono comunque su vie biologiche chiave come i meccanismi di modificazione istonica¹.

Tali fondamentali scoperte hanno definitivamente sancito il superamento della sola caratterizzazione morfologica, dimostrando che i quattro sottogruppi molecolari di consenso rappresentano in realtà entità patogenetiche biologicamente e geneticamente distinte⁵.

1.1.2.1 Eterogeneità molecolare ed evoluzione classificativa

Negli ultimi anni, l'utilizzo della profilazione trascrizionale mediante microarray su ampie coorti di medulloblastomi primari ha svelato l'esistenza di distinti gruppi molecolari, i quali differiscono per profilo epigenetico e metilazione genomica⁵. La quinta edizione della classificazione dei tumori del sistema nervoso centrale (WHO CNS5) ha dunque ridefinito il medulloblastoma al fine di recepire tali nuove acquisizioni sulla eterogeneità clinica e biologica che lo caratterizza⁷.

Inizialmente, il consenso scientifico raggiunto sulla base di molteplici dati ha identificato quattro gruppi molecolari principali: WNT-attivato, SHH-attivato, gruppo 3 e gruppo 4. (le neoplasie facenti parte dei gruppi WNT e SHH evidenziano l'attivazione di tali rispettive vie di trasduzione del segnale). I medulloblastomi

WNT e SHH sono stati recepiti nella classificazione WHO dei tumori del sistema nervoso centrale del 2016, all'interno della quale il gruppo SHH è stato ulteriormente diviso sulla base dello stato di TP53, dal momento che i tumori TP53 mutati e TP53-wildtype presentano caratteristiche cliniche, istopatologiche e biologiche molto differenti. I medulloblastomi non WNT/non SHH comprendono invece il gruppo 3 e 4¹.

Questi gruppi molecolari sono rappresentati anche nell'attuale classificazione (WHO CNS5), ma a un livello di analisi più dettagliato sono emersi ulteriori sottogruppi: in particolare 4 sottogruppi di medulloblastoma SHH-attivato e 8 sottogruppi di medulloblastoma non WNT/non SHH mutato¹. In continuità con la suddivisione molecolare di primo livello, questi sottogruppi presentano peculiari caratteristiche istopatologiche e genetiche, da cui derivano rilevanti implicazioni diagnostiche, prognostiche e terapeutiche¹.

1.1.2.2 Correlazioni tra pattern istologici e gruppi molecolari

La classificazione istopatologica dei medulloblastomi integrata nella IV edizione della classificazione WHO dei tumori del SNC 2016 comprendeva quattro entità morfologiche distinte: classico, desmoplastico/nodulare, ad estensiva nodularità e a grandi cellule/anaplastico. Nella V edizione, in seguito, questa è stata riorganizzata in un'unica sezione che descrive l'ampia variabilità morfologica come pattern di un singolo tipo tumorale: il medulloblastoma istologicamente definito¹.

I pattern morfologici presentano specifiche correlazioni cliniche, e i medulloblastomi definiti su base molecolare a loro volta mostrano precise associazioni con le diverse varianti morfologiche¹. In particolare:

- Le varianti morfologiche desmoplastico/nodulare e ad estensiva nodularità sono associate al gruppo molecolare SHH, con maggior incidenza nei gruppi SHH1 e SHH2;
- Tutti i tumori del gruppo molecolare WNT-attivato presentano pattern morfologico classico;
- La maggior parte dei medulloblastomi con pattern morfologico anaplastico/a grandi cellule appartengono al gruppo SHH

sottogruppo 3 o al gruppo non WNT/non SHH attivato (gruppi 3 e 4) sottogruppo 2.

1.1.3 Clinica e diagnosi del medulloblastoma

1.1.3.1 Quadro clinico

I pazienti affetti da medulloblastoma possono presentare un quadro clinico eterogeneo. I sintomi legati all'insorgenza della neoplasia si manifestano in media entro due mesi dall'insorgenza della neoplasia, ma l'intervallo di comparsa può variare da pochi giorni fino a diversi anni⁸. Le manifestazioni cliniche sono in genere aspecifiche e sono riconducibili a una lesione occupante spazio a rapida crescita a livello della fossa cranica posteriore⁹. Data la contiguità di tale sede anatomica con il quarto ventricolo, la crescita della neoplasia può determinare ostruzione al passaggio del liquor, determinando idrocefalo ostruttivo o non comunicante⁸

La sintomatologia del medulloblastoma può variare in funzione di diversi fattori, tra cui l'età del paziente, le dimensioni e la localizzazione anatomica della neoplasia. La modalità di esordio più frequente è legata alla sindrome da ipertensione endocranica caratterizzata da cefalea, vomito a getto, letargia e papilledema (quest'ultimo nel 90% dei pazienti)⁹. Nel paziente pediatrico non verbale il quadro prevalente è dominato da alterazioni comportamentali, astenia, irritabilità, regressione delle tappe dello sviluppo neuromotorio già acquisite⁸ e vomito a getto. Nei bambini più grandi e negli adulti, il sintomo principale è la cefalea mattutina al risveglio. Il vomito a getto, non accompagnato da nausea, è anch'esso più comune nelle prime ore del mattino, in quanto il clinostatismo mantenuto nelle ore notturne incrementa la pressione endocranica poiché si riduce il drenaggio venoso e il riassorbimento liquorale⁹. Tale sintomo conduce spesso ad un lungo iter di accertamenti gastroenterologici che ritardano la diagnosi⁹.

Non di minore importanza sono i sintomi e segni dati da compressione del IV e del VI nervo cranico, a cui conseguono rispettivamente paresi o paralisi dello sguardo e diplopia. L'alterazione del quarto nervo cranico, in particolare, è data dalla compressione per estensione diretta del tumore nell'acquedotto cerebrale e

causa una disfunzione dei movimenti oculari più marcata nelle direzioni mediali e verso il basso⁹.

Tra le modalità di esordio sintomatologico del medulloblastoma è da annoverare inoltre la sindrome cerebellare, che differisce a seconda della localizzazione anatomica della neoplasia. Si distinguono infatti una sindrome vermiana - caratterizzata da atassia del tronco e della marcia e incapacità di mantenere la stazione eretta con segno di Romberg positivo; e una sindrome emisferica, in cui si manifestano atassia appendicolare omolaterale, dismetria (prova indice-naso alterata) e nistagmo⁹.

In caso di disseminazione del medulloblastoma al midollo spinale, la sintomatologia descritta può essere accompagnata da lombalgia o dorsalgia, incontinenza sfinterica, disturbi della deambulazione e grave ipostenia secondaria alla compressione tumorale del midollo spinale o delle radici nervose, con conseguente radicolopatia⁹.

1.1.3.2 Iter diagnostico

L'articolato percorso diagnostico del medulloblastoma richiede un approccio multidisciplinare che integri le valutazioni cliniche, radiologiche, istologiche e molecolari. La diagnosi e la conseguente classificazione del medulloblastoma rivestono infatti un ruolo fondamentale nella definizione delle strategie terapeutiche più appropriate e nella formulazione della prognosi⁹.

La valutazione clinica del paziente con sospetto medulloblastoma è il punto di partenza cruciale per stabilire le successive indagini strumentali. L'esordio clinico è generalmente aspecifico e sovrapponibile a quello di altre condizioni patologiche a livello della fossa cranica posteriore; tuttavia, l'insorgenza dei sintomi descritti induce comunemente alla consultazione medica, costituita da un'accurata anamnesi ed esame obiettivo. Segue poi la diagnostica per immagini, in cui rivestono un ruolo fondamentale la tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica (RM). Tali metodiche consentono non solo di localizzare la lesione, ma forniscono anche informazioni essenziali relative alle sue dimensioni, all'estensione dell'invasione locale e al coinvolgimento di strutture anatomiche critiche⁹.

A causa dell'intrinseca eterogeneità del medulloblastoma, i reperti RM risultano ampiamente eterogenei, infatti la neoplasia può mostrare un'intensità di segnale variabile nelle sequenze T1 e T2 e differenti pattern di impregnazione del mezzo di contrasto (enhancement). Possono essere inoltre presenti aree emorragiche, calcificazioni e formazioni cistiche⁹.

Le caratteristiche rilevate mediante RM e la sede di insorgenza tumorale possono predire i gruppi molecolari di medulloblastoma. La spettroscopia mediante risonanza magnetica (MRS) e lo studio della diffusione (DWI) con mappe del coefficiente di diffusione apparente (ADC) offrono nuove prospettive di correlazione tra reperti neuroradiologici e sottotipi molecolari. I valori di ADC più bassi e più elevati, ad esempio sono rispettivamente stati osservati nei medulloblastomi classici e in quelli a grandi cellule/anaplastici⁹.

La diagnosi di disseminazione leptomeningea è di fondamentale importanza: la mancata individuazione di tale disseminazione costituisce infatti una delle principali cause di fallimento terapeutico. Per documentare il coinvolgimento leptomeningeo è necessario eseguire una RM neuroassiale completa con mezzo di contrasto (generalmente eseguita nella fase preoperatoria) e/o l'esame citologico del liquor cerebrospinale⁹.

1.1.3.3 Diagnosi istologica e caratterizzazione molecolare

L'analisi istologica, condotta mediante l'esame sul campione tissutale, rimane il caposaldo per la diagnosi definitiva di medulloblastoma. La valutazione microscopica delle sezioni istologiche consente di identificare i tratti cellulari distintivi della neoplasia. La conferma istopatologica è indispensabile per l'impostazione di protocolli terapeutici mirati allo specifico sottotipo tumorale⁹.

Al fine di ottenere precise informazioni prognostiche e predittive, l'interpretazione morfologica deve essere affiancata dall'analisi molecolare. Infatti, l'integrazione delle informazioni sulle alterazioni genetiche migliora ulteriormente il livello di precisione diagnostica, ad esempio consentendo di suddividere i medulloblastomi SHH-attivati in tumori TP53 wild-type e TP53 mutato. Altre alterazioni genetiche attualmente utilizzate nella stratificazione del rischio del medulloblastoma ma non

incluse nella classificazione, come l'amplificazione di MYC, potrebbero anch'esse essere inserite in una diagnosi integrata per aumentarne la precisione⁹.

La caratterizzazione molecolare primaria del medulloblastoma si fonda sull'integrazione di piattaforme ad alto rendimento per l'analisi epigenomica e genomica¹⁰. Il gold standard è rappresentato dalla profilazione dello stato di metilazione del DNA tramite array ad alta densità (Illumina MethylationEPIC), attraverso cui l'impronta epigenetica del tessuto viene confrontata mediante algoritmi di random forest con le banche dati di riferimento per l'allocatione nei rispettivi gruppi epigenetici. Tale indagine è affiancata dal sequenziamento di nuova generazione (NGS) - mirato all'identificazione di mutazioni driver somatiche quali CTNNB1, PTCH1, SMO e TP53 - e dalla valutazione delle variazioni del numero di copie (CNV) per il rilievo di marcatori citogenetici patognomonic, tra cui la monosomia 6, l'isocromosoma 17q e le amplificazioni focali dei protooncogeni MYC e MYCN¹¹.

In quanto indagine diagnostica ancillare, l'immunoistochimica (IHC) continua a rivestire un ruolo fondamentale nei laboratori di anatomia patologica, conservando la propria centralità anche nel contesto della moderna patologia molecolare¹². Numerose evidenze hanno ampiamente dimostrato come l'IHC costituisca un valido surrogato delle tradizionali tecniche citogenetiche e di ibridazione in situ, sia dei profili di espressione genica impiegati nella caratterizzazione molecolare dei tumori solidi. Rispetto alle metodiche genomiche complesse, l'analisi immunoistochimica offre il vantaggio di una significativa riduzione dei costi e di tempi di refertazione notevolmente più rapidi¹².

Nello specifico del medulloblastoma, l'impiego di un pannello selezionato di biomarcatori su tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE) si è dimostrato un approccio efficace per approssimare con elevata accuratezza i diversi sottogruppi molecolari. Tale pannello sfrutta marcatori surrogati specifici, quali l'accumulo nucleare della β -catenina (indicativo dell'attivazione della via WNT), l'espressione di GAB1 (selettivo per la via SHH), l'espressione di YAP1 (presente sia nei sottogruppi WNT che SHH) e l'iperespressione o perdita di p53 (per la caratterizzazione dei tumori SHH con mutazione di *TP53*). La solidità scientifica di

questi anticorpi come marcatori surrogati per la sottotipizzazione molecolare del medulloblastoma è stata ampiamente confermata in letteratura avvalorando l'IHC come un'alternativa diagnostica concreta, accessibile e di elevata accuratezza nella pratica clinica quotidiana¹².

1.1.4 Trattamento e prognosi del medulloblastoma

Il trattamento del medulloblastoma richiede un'assistenza coordinata che coinvolge il neurochirurgo, il neuro-oncologo, il radioterapista oncologo, il neuroradiologo e il neuropatologo. L'attuale *standard of care* prevede la resezione chirurgica radicale seguita da radioterapia craniospinale dopo un'attenta valutazione del rischio e chemioterapia adiuvante. L'entità della resezione chirurgica richiesta è stata ampiamente studiata, e il riscontro di un residuo tumorale superiore a 1,5cm² è stato associato ad una peggiore sopravvivenza globale e sopravvivenza libera da progressione⁹.

1.1.4.1 Gestione dell'idrocefalo

L'idrocefalo rappresenta un reperto di esordio pressoché ubiquitario nei bambini affetti da medulloblastoma. Si tratta di una complicanza comune, con un'incidenza compresa tra il 71% e il 90% nei pazienti pediatrici con neoplasie della fossa cranica posteriore. L'idrocefalo post-operatorio si verifica invece nel 10-36% dei casi, con una media globale del 30%. Talvolta, tale condizione può richiedere un intervento di emergenza mediante posizionamento di un drenaggio ventricolare esterno (DVE)⁹.

Più frequentemente, i pazienti presentano una sintomatologia manifesta ma non in condizioni di estrema gravità, in questi casi, la gestione preoperatoria prevede un ciclo breve di desametasone ad alto dosaggio per trattare l'edema peritumorale, unito all'inserimento di una derivazione ventricolare esterna (DVE) al momento della resezione chirurgica del tumore. Sebbene molti pazienti necessitino di una deviazione del flusso liquorale contestualmente all'atto operatorio, il confezionamento di una derivazione ventricolo-peritoneale (DVP) o l'esecuzione di una terzoventricolocisternostomia endoscopica (ETV) prima della resezione tumorale non sono raccomandati, poiché solo il 25% circa dei pazienti sviluppa la necessità di una deviazione permanente del CSF⁹.

Nei bambini con medulloblastoma, il rischio di sviluppare un idrocefalo che richieda una deviazione permanente del CSF risulta più elevato nei pazienti di età più giovane, in presenza di masse tumorali di maggiori dimensioni, nei casi con malattia metastatica o con idrocefalo grave o di lunga data. Per contro, i pazienti con tumori appartenenti al sottogruppo WNT presentano un rischio inferiore di dover ricorrere a una deviazione permanente del flusso liquorale⁹.

1.1.4.2 Chirurgia

La resezione chirurgica rappresenta il caposaldo della gestione iniziale del medulloblastoma. L'intervento chirurgico consente di confermare la diagnosi istologica e di decomprimere la fossa cranica posteriore: in particolare il tronco encefalico, favorendo nella maggior parte dei casi la risoluzione dell'idrocefalo (prevalentemente di tipo non comunicante) presente al momento della diagnosi¹³.

Il consenso chirurgico attuale risiede nel perseguire la massima resezione radicale in sicurezza. La maggior parte dei trial clinici e della letteratura suddivide l'entità della resezione in:

- resezione totale (gross total resection, GTR): definita dall'assenza di residuo tumorale visibile alla RM post-operatoria eseguita di norma entro 72 ore dall'intervento;
- resezione quasi totale (near-total resection, NTR): in presenza di un residuo visibile alla RM inferiore a 1,5 cm² nella sua estensione massima;
- resezione subtotale (subtotal resection, STR): qualora il residuo tumorale presenti un'area superiore a 1,5 cm²¹³.

1.1.4.3 Radioterapia e stratificazione del rischio

Nei pazienti di età superiore ai 3 anni, la radioterapia post-operatoria costituisce lo standard terapeutico: questa riveste un ruolo fondamentale sia per ritardare o prevenire le recidive, sia per controllare la malattia metastatica. Attualmente, i protocolli radioterapici sono personalizzati in base all'età del paziente e alla classe di rischio¹³.

Storicamente, la stratificazione della classe di rischio dei pazienti di età superiore ai 3 anni si è basata su parametri clinico-chirurgici: la presenza di un residuo tumorale post-operatorio inferiore a 1,5cm² e l'assenza di metastasi definivano la classe a rischio medio, mentre un residuo superiore a 1,5cm² o la variante istologica anaplastica/a grandi cellule inserivano il paziente nella classe ad alto rischio⁹. Successivamente, l'integrazione dei sottogruppi molecolari nella classificazione ha radicalmente ridefinito le classi di rischio, introducendo quattro classi di rischio a rilevanza prognostica e terapeutica.

I protocolli di somministrazione posologica della radioterapia variano in base alla classe di rischio:

- Pazienti a rischio medio/standard: è prevista una dose di 23,4 Gy somministrata sull'intero asse craniospinale (CSI), combinata con un *boost* focalizzato sulla loggia chirurgica/fossa posteriore fino a un totale di 55,8 Gy. Il trattamento viene avviato entro 30 giorni dall'intervento chirurgico, solitamente in concomitanza con farmaci citostatici ad azione radiosensibilizzante.
- Pazienti ad alto rischio e alto alto: ricevono una dose di CSI pari a 36 Gy, seguita da un boost fino a 54 Gy erogato sul letto tumorale e sulle eventuali sedi secondarie di metastasi leptomeningea⁹.

Nei lattanti e nei bambini di età inferiore ai 3 anni, invece, la spiccata neurotossicità dell'irradiazione su un sistema nervoso in fase di sviluppo preclude l'impiego della radioterapia convenzionale. In questa fascia d'età, per evitare deficit neurocognitivi e neuroendocrini permanenti, i protocolli pediatrici adottano strategie diverse volte a omettere, ritardare o circoscrivere la radioterapia alla sola sede focale. Poiché i tentativi di riduzione precoce della dose radiante hanno mostrato tassi di recidiva inaccettabili, l'approccio standard prevede l'impiego di una chemioterapia primaria ad alte dosi, posticipando la radioterapia al raggiungimento del terzo anno di vita o all'eventuale comparsa di recidiva di malattia⁹.

Di recente è stato inoltre esplorato il ruolo della protonterapia nel trattamento del medulloblastoma. Con la radioterapia a fascio di protoni, l'area bersaglio del

trattamento può essere focalizzata con maggiore precisione, consentendo così di somministrare la stessa dose radiante con un minore impatto sui tessuti circostanti⁹.

1.1.4.4 Chemioterapia

I regimi polichemioterapici si sono evoluti come terapia adiuvante la chirurgia e la radioterapia a partire dal 1970. Gli attuali schemi terapeutici previsti sono adattati al rischio del paziente con strategie differenti a seconda della classe a cui appartiene. Gli agenti chemioterapici comunemente impiegati sono il cisplatino, la vincristina, la ciclofosfamide e la lomustina⁹. In particolare:

- Pazienti a rischio medio: resezione chirurgica seguita da radioterapia e successivamente chemioterapia in 4-9 cicli di vincristina, cisplatino e lomustina (CCNU) o ciclofosfamide;
- Pazienti ad alto rischio: il trattamento è meno standardizzato, ma generalmente consiste nell'esecuzione di radioterapia craniospinale (CSI) con boost sul letto tumorale o sulla fossa posteriore, combinata a 4-9 cicli di chemioterapia (CCNU).

Esistono dati discordanti nei trial che mettono a confronto la chemioterapia pre-radioterapia rispetto a quella post-radioterapia⁹. Utilizzando un regime chemioterapico costituito da tre cicli di cisplatino ed etoposide seguiti da sette cicli di vincristina e ciclofosfamide, Tarbell e collaboratori hanno valutato se gli esiti differissero nei pazienti ad alto rischio a seconda che venissero sottoposti a tale schema prima o dopo la radioterapia, non riscontrando alcuna differenza statisticamente significativa nella sopravvivenza globale (Overall Survival a 5 anni rispettivamente del 73,1% e del 76,1%). Anche il methotrexato somministrato per via intraventricolare è stato valutato come adiuvante della radioterapia e della chemioterapia citotossica per i pazienti ad alto rischio, registrando una OS a 5 anni del 74% nei pazienti di età pari o superiore a 4 anni con malattia metastatica⁹.

1.1.4.5 Terapia a bersaglio molecolare e immunoterapia

I progressi nella comprensione delle vie molecolari alla base della patogenesi del medulloblastoma e lo sviluppo di agenti in grado di bloccare tali pathway stanno aprendo la strada verso la terapia target mirata⁹.

Gli inibitori della via di segnalazione SHH, come vismodegib o sonidegib, i quali hanno come bersaglio la proteina smoothened (SMO), sono stati studiati nei tumori del sottogruppo SHH. Tuttavia, a causa dell'importanza della segnalazione SHH nello sviluppo scheletrico, l'inibizione di SHH è limitata ai soli pazienti con maturità scheletrica completata, vista l'importanza della via SHH nello sviluppo scheletrico. Inoltre, la specifica alterazione molecolare che determina l'attivazione della via SHH risulta fondamentale, poiché i pazienti che presentano alterazioni a valle di smoothened (come la mutazione di SUFU o l'amplificazione di GLI2) hanno scarse probabilità di rispondere a questa terapia⁹.

Altre terapie a bersaglio molecolare hanno mostrato risultati promettenti nei trial preclinici, con alcuni trattamenti — come gli inibitori della via della fosfoinositide 3-chinasi/bersaglio della rapamicina nei mammiferi (PI3K/mTOR) — già avanzati alla fase di sperimentazione clinica⁹.

Diverse forme di immunoterapia si sono dimostrate efficaci nei modelli preclinici e sono attualmente in corso trial clinici di fase precoce. Alcuni studi hanno evidenziato che il trattamento simultaneo con vaccinazione con cellule dendritiche associata trasferimento autologo di linfociti e chemioterapia ha migliorato l'attività dei linfociti T antigene-specifici. Uno degli approcci di maggiore successo nel trattamento di svariate tipologie tumorali è rappresentato dalla terapia con cellule T con recettore chimerico per l'antigene (CAR-T) anti-HER2; è noto, infatti, che il recettore HER2 risulta sovraespresso anche nel medulloblastoma⁹.

1.1.4.6 Prognosi generale del medulloblastoma

La mortalità a 10 anni del medulloblastoma nei bambini è intorno al 34,6%. I tassi di sopravvivenza globale sono da distinguersi in base alle classi di rischio e alla fascia d'età del paziente, in particolare:

- Pazienti di età ≥ 3 anni (rischio standard): con i protocolli attuali, il tasso di sopravvivenza globale a 5 anni supera il 70%;

- Pazienti di età ≥ 3 anni (alto rischio / metastatici): se sottoposti a trattamenti chemioterapici intensificati, mostrano un tasso di sopravvivenza libera da eventi (Event-Free Survival, EFS) a 5 anni di circa il 70%;
- Lattanti e bambini piccoli (< 3 anni): Il tasso di sopravvivenza libera da progressione (Progression-Free Survival, PFS) a 5 anni oscilla tra il 30% e il 90%, con un'ampia variabilità strettamente dipendente dal sottotipo istologico e molecolare.

I principali fattori determinanti l'esito clinico e la prognosi del medulloblastoma sono l'istologia e il profilo molecolare. I dettagli prognostici sono trattati nelle sezioni successive, nella classificazione molecolare e istologica del medulloblastoma.

1.2 Classificazione molecolare WHO CNS5 2021

1.2.1 Generalità

Già nella precedente edizione WHO dei tumori del SNC, del 2016 (WHO CNS4), la classificazione del medulloblastoma è stata ristrutturata per consentire l'integrazione dei dati più recenti riguardanti la biologia, la genomica e il comportamento clinico del medulloblastoma¹⁴. Per la prima volta, i medulloblastomi sono stati classificati quindi sia in base alle caratteristiche molecolari (categorie "geneticamente definite"), sia in base alle caratteristiche istologiche (categorie "istologicamente definite")¹⁴.

L'aspettativa che a ciascun tumore venisse assegnata una diagnosi da entrambe le categorie ha generato la necessità di una diversa tipologia di diagnosi strutturata — una diagnosi "stratificata" o integrata — in grado di includere sia i classificatori molecolari sia quelli istologici all'interno di un unico referto diagnostico. Elemento chiave di questo stile di diagnosi integrata è l'incorporazione della categoria genetico-molecolare direttamente nella diagnosi principale¹⁴.

La successiva edizione della classificazione WHO dei tumori del SNC (WHO 2021 CNS5), oggi in vigore, ha affinato la classificazione del 2016 aggiungendo maggiore precisione:

- Mantiene i gruppi WNT e SHH quest'ultimo diviso per stato di TP53;
- Divide formalmente e definitivamente il gruppo non-WNT/non-SHH nei due sottogruppi Gruppo 3 e Gruppo 4;
- Introduce sottotipi molecolari definiti mediante il profilo di metilazione del DNA (quattro per il gruppo SHH- SHH-1, SHH-2, SHH-3, SHH-4 -e otto sottogruppi non-WNT/non-SHH-sottogruppi 1-8 del gruppo 3/4).

Inoltre, viene stabilita per ogni entità tumorale un insieme di criteri diagnostici "essenziali" e "desiderabili". Per la diagnosi di medulloblastoma definito geneticamente sono essenziali l'evidenza dell'attivazione della via di segnalazione (ossia WNT o SHH) oppure un profilo di metilazione del DNA idoneo¹⁴. Non sono stati invece delineati criteri diagnostici desiderabili per i

sottogruppi di medulloblastoma. Se un tumore non può essere sottoclassificato a causa di un campionamento insufficiente o di artefatti tissutali, è appropriata la diagnosi di medulloblastoma non altrimenti specificato (NOS)¹⁴.

1.2.2 Grado WHO del medulloblastoma

Tutti i medulloblastomi vengono classificati con un grado WHO 4 in base all'esito clinico atteso in assenza di trattamento. Tuttavia, se questo sia l'approccio corretto alla luce dei moderni protocolli terapeutici e se sia giustificato per tutti i sottogruppi di medulloblastoma rimane oggetto di dibattito. Ad esempio, con i regimi di trattamento attuali, la sopravvivenza dei pazienti con medulloblastoma del sottogruppo WNT supera il 90%, suggerendo che un grado WHO 4 potrebbe non essere del tutto accurato¹⁴.

Nelle Tabelle 1 e 2, vengono sintetizzate le caratteristiche principali di ciascun gruppo molecolare, trattate poi esaustivamente nei paragrafi seguenti.

CLASSIFICAZIONE MOLECOLARE WHO2021			
	WNT-attivato	SHH-attivato TP53-wildtype	SHH-attivato TP53-mutato
Sottogruppi	-	Da SHH-1 a SHH-4	SHH-3
Frequenza relativa	10%	20%	10%
Fascia d'età predominante	Infanzia	Prima infanzia/Età adulta	Infanzia
Rapporto M:F	1:2	1:1	3:1
Morfologia predominante	Classico	Desmoplastico/nodulare	A grandi cellule / anaplastico
Alterazioni frequenti del numero di copie	Monosomia 6	Delezione PTCH1; perdita 10q	Amplificazione MYCN; amplificazione GLI2; perdita 17p
Alterazioni genetiche frequenti	Mutazione CTNNB1, DDX3X	PTCH1, SMO, SUFU, ELP1, DDX3X, KMT2D, mutazione U1 snRNA	TP53, DDX3X, U1 snRNA, mutazione TERT
Geni con mutazione germinale	APC	PTCH1, SUFU, ELP1	TP53

Tabella 1. Classificazione molecolare WHO CNS52021, gruppi WNT-attivato e SHH-attivato

Tabella 2. Classificazione molecolare WHO CNS52021, gruppo non-WNT /non-SHH-attivato

CLASSIFICAZIONE MOLECOLARE WHO2021		
	Non-WNT/non-SHH GRUPPO 3	Non-WNT/non-SHH GRUPPO 4
Sottogruppi	Gruppi 3/4 da 1 a 8	
Frequenza relativa	25%	35%
Fascia d'età predominante	Prima infanzia/Infanzia	Tutte le fasce d'età
Rapporto M:F	2:1	3:1
Morfologia predominante	Classico	Classico

Alterazioni frequenti del numero di copie	Amplificazione MYC, MYCN; guadagno 1q, 7; perdita 10q, 16q; isodicentrico 17q	Amplificazione MYCN, OTX2; amplificazione CDK6; guadagno 7; perdita 8, 11; isodicentrico 17q
Alterazioni genetiche frequenti	Attivazione GFI1, GFI1B; SMARCA4, KBTBD4, CTDNEP1, KMT2D mutazione	Attivazione GFI1, GFI1B; attivazione PRDM6; KDM6A, ZMYM3, KMT2C, KMT2D, mutazione KBTBD4
Geni con mutazione germinale	Raro BRCA2, PALB2	Raro BRCA2, PALB2

1.2.3 Medulloblastoma WNT-attivato

Il medulloblastoma WNT-attivato è un tumore embrionale che origina dal tronco encefalico dorsale ed è caratterizzato dall'attivazione della via di trasduzione del segnale WNT¹.

Localizzazione

I medulloblastomi WNT-attivati sono localizzati attorno al forame di Luschka; possono originare dal tronco encefalico, dal peduncolo cerebellare o ancora dalla linea mediana cerebellare. In un numero clinicamente significativo di casi si nota un'estensione direzionata verso l'angolo ponto-cerebellare o verso il peduncolo cerebellare¹.

Caratteristiche cliniche

La maggior parte dei pazienti si presenta con sintomi e segni di aumentata pressione intracranica da idrocefalo non comunicante a causa dell'occlusione del quarto ventricolo da parte del tumore primario¹.

Diagnostica per immagini

Il neuroimaging dei medulloblastomi WNT-attivati mostra tumori localizzati nella linea mediana cerebellare o nell'angolo ponto-cerebellare, molti dei quali a stretto contatto con il tronco encefalico. I medulloblastomi WNT-attivati hanno una barriera ematoencefalica relativamente permeabile rispetto ad altri tipi

di medulloblastoma e pertanto mostrano un impregnamento del mezzo di contrasto molto intenso¹.

Diffusione

È raro che un paziente con medulloblastoma WNT-attivato si presenti con metastasi leptomeningee¹.

Epidemiologia

I tumori WNT-attivati rappresentano circa il 10% di tutti i medulloblastomi. Si verificano in genere nei bambini di età compresa tra 7 e 14 anni e rappresentano anche il 15–20% dei medulloblastomi dell'adulto. Questo tipo di medulloblastoma colpisce un numero maggiore di pazienti di sesso femminile rispetto a quelli di sesso maschile. I medulloblastomi WNT-attivati non si verificano quasi mai nei lattanti¹.

Eziologia

La stragrande maggioranza dei medulloblastomi WNT-attivati è sporadica, e poco si sa sulla loro eziologia. Un raro sottogruppo di medulloblastomi WNT-attivati viene diagnosticato nel contesto della sindrome costituzionale da deficit di riparazione dei mismatch e in individui con mutazioni germinali di APC e conseguente predisposizione al cancro del colon¹.

Patogenesi

I medulloblastomi WNT-attivati assomigliano sotto il profilo trascrizionale a cellule progenitrici normali della linea dei neuroni a fibre muscolari derivate dal labbro rombico inferiore, coerentemente con un'origine extracerebellare (tronco encefalico dorsale). Il profilo di metilazione del DNA e le firme trascrizionali di questi tumori, che potrebbero costituire la migliore evidenza per la cellula d'origine nei tessuti umani, indicano che il medulloblastoma WNT-attivato ha un profilo distinto da quello dei tumori di altri gruppi molecolari di medulloblastoma¹.

Profilo genetico

Ampi studi di sequenziamento di nuova generazione (NGS) hanno confermato che l'86–89% dei medulloblastomi WNT-attivati presenta mutazioni somatiche nell'esone 3 di CTNNB1. Tra i medulloblastomi WNT-attivati privi di mutazioni somatiche di CTNNB1, la maggior parte insorge in bambini portatori di mutazioni patogenetiche germinali di APC. Altri geni con mutazioni somatiche nei medulloblastomi WNT-attivati includono quelli che codificano le subunità del complesso di Rimodellamento del Nucleosoma SWI/SNF (SMARCA4, ARID1A, ARID2; nel 33% dei casi), DDX3X (nel 36%), CSNK2B (nel 14%), TP53 (nel 14%), KMT2D (nel 14%) e PIK3CA (nell'11%). Citogeneticamente, la monosomia 6 che si verifica nel contesto di un genoma altrimenti diploide è una caratteristica genetica dei medulloblastomi WNT-attivati ed è osservata in circa l'83% dei casi¹.

Aspetto macroscopico

I medulloblastomi appaiono come masse rosa friabili. Durante l'intervento chirurgico, l'emorragia intratumorale è particolarmente associata ai medulloblastomi WNT-attivati¹.

Aspetto microscopico

Quasi tutti i medulloblastomi WNT-attivati hanno una morfologia classica. Sono stati riportati medulloblastomi WNT-attivati anaplastici, ma sono rari. I medulloblastomi desmoplastici/nodulari non si osservano in questo gruppo¹.

Immunofenotipo

L'attivazione della via di WNT può essere dimostrata dall'immunoreattività diffusa o a chiazze per la β -catenina nei nuclei delle cellule tumorali. I medulloblastomi di altri gruppi molecolari mostrano un'espressione citoplasmatica della β -catenina¹.

Citologia

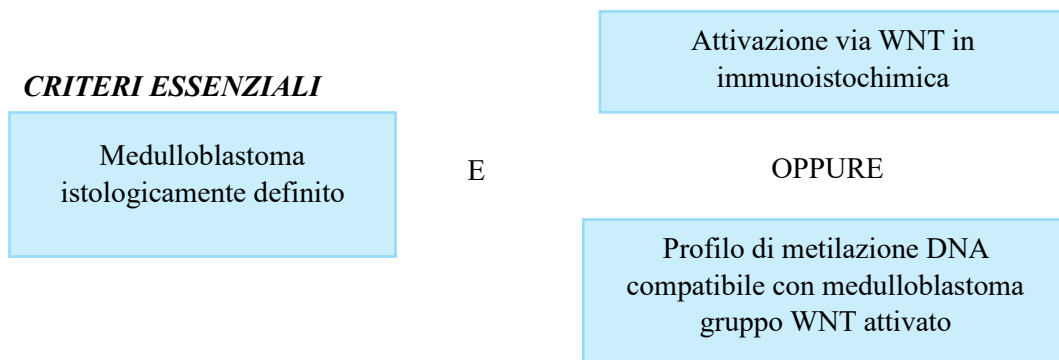
La valutazione della presenza di cellule tumorali nel liquido cerebrospinale è richiesta per la stadiazione¹.

Patologia molecolare diagnostica

Le mutazioni dell'esone 3 di CTNNB1 e la monosomia 6 nel contesto di un genoma diploide sono presenti in oltre 80% dei medulloblastomi WNT-attivati¹. Queste alterazioni sono state utilizzate per identificare i medulloblastomi WNT-attivati, ma la profilazione della metilazione del DNA è considerata il metodo standard per determinare lo stato del gruppo o del sottogruppo di medulloblastoma. L'analisi dell'espressione dell'RNA basata su microarray e sul sequenziamento, l'analisi NanoString e i saggi di classificazione della metilazione minima sono stati tutti utilizzati per l'assegnazione del gruppo molecolare. In aggiunta, l'immunoistochimica può essere utilizzata per discriminare tra medulloblastomi WNT, Sonic Hedgehog (SHH) e non-WNT/non-SHH¹.

Sono stati suggeriti due sottogruppi molecolari di medulloblastoma WNT-attivato: WNT- α e WNT- β . I tumori WNT- α mostrano la monosomia 6 e insorgono nei bambini. I tumori WNT- β sono comunemente diploidi per il cromosoma 6 e insorgono in bambini più grandi e giovani adulti¹.

Criteri diagnostici essenziali e desiderabili



Staging

Le procedure di stadiazione clinica includono esami di Risonanza Magnetica (RMN) del SNC con mezzo di contrasto. Questi sono completati da puntura lombare e citologia del liquido cerebrospinale post-operatoria¹. Il sistema di stadiazione post-operatorio sviluppato da Chang e colleghi nel 1969, che definisce i seguenti gradi di diffusione metastatica, è ancora in uso:

- **M0:** Nessuna evidenza di metastasi subaracnoidee o ematogene.

- **M1:** Cellule tumorali microscopiche riscontrate nel liquido cerebrospinale.
- **M2:** Disseminazione nodulare macroscopica dimostrata nello spazio subaracnoideo cerebellare/cerebrale o nel terzo o nei ventricoli laterali.
- **M3:** Disseminazione nodulare macroscopica nello spazio subaracnoideo spinale.
- **M4:** Metastasi all'esterno dell'asse cerebrospinale¹.

Prognosi

La prognosi dei bambini con medulloblastoma WNT-attivato è eccellente nonostante il grado CNS WHO 4; con gli attuali approcci chirurgici e regimi terapeutici adiuvanti, il tasso di sopravvivenza globale è vicino al 100%¹. L'esito eccellente è previsto sia per i tumori con mutazioni germinali di APC, sia per quelli con mutazioni di CTNNB1¹. I pazienti adulti con medulloblastoma WNT-attivato non hanno un esito così favorevole. A differenza delle mutazioni di TP53 nei medulloblastomi SHH-attivati, le mutazioni di TP53 nei medulloblastomi WNT-attivati, che sono tutte somatiche e più comunemente eterozigoti, non conferiscono una prognosi infausta¹.

1.2.4 Medulloblastoma SHH-attivato TP53-wildtype

Il medulloblastoma SHH-attivato e TP53-wildtype, è un tumore embrionale del cervelletto che dimostra l'attivazione della via di segnalazione di Sonic Hedgehog (SHH) in combinazione con un gene TP53 *wild-type* (grado CNS WHO 4)¹.

Sottotipi

I medulloblastomi attivati da SHH comprendono quattro sottogruppi molecolari provvisori (SHH-1, SHH-2, SHH-3, SHH-4), che possono essere dimostrati mediante profilazione della metilazione del DNA o del trascrittoma¹.

Localizzazione

I medulloblastomi SHH-attivati insorgono nell'emisfero cerebellare o nel verme e talvolta possono coinvolgere entrambe le strutture. Va però osservato come, la localizzazione di questo tipo di tumore sia correlata all'età. I tumori nei lattanti

coinvolgono frequentemente il verme, mentre i tumori emisferici sono relativamente infrequenti in questa fascia di età. Nei bambini più grandi e nei giovani adulti, i medulloblastomi SHH-attivati insorgono principalmente negli emisferi cerebellari¹.

Caratteristiche cliniche

Vedi paragrafo relativo nella sezione Medulloblastoma WNT-attivato

Diagnostica per immagini

Il neuroimaging mostra i medulloblastomi SHH-attivati come masse solide con intenso impregnamento del mezzo di contrasto. Di particolare rilievo è la presenza di edema perilesionale, risultato relativamente comune in una serie radiologica che includeva 12 medulloblastomi desmoplastici/nodulari e 9 medulloblastomi con nodularità estesa (MBEN). Un pattern "a grappolo d'uva" alla risonanza magnetica caratterizza generalmente gli MBEN. Raramente, i medulloblastomi che coinvolgono il cervelletto laterale si presentano invece come masse extra-assiali che assomigliano a meningiomi o a schwannomi del nervo acustico¹.

Diffusione

I medulloblastomi hanno il potenziale di invadere localmente, metastatizzare alle leptomeningi o (raramente) diffondersi all'esterno del sistema nervoso centrale. La maggior parte delle metastasi si trova sulla superficie del SNC, aderente alla pia madre. I meccanismi di metastatizzazione per il medulloblastoma attivato da SHH non sono chiari, con diffusione alle leptomeningi attraverso il liquido cerebrospinale (LCS) o attraverso una via ematogena con ritorno alle leptomeningi. È stato dimostrato che i gruppi molecolari di medulloblastoma, compresi i tumori SHH-attivati, rimangono stabili nel confronto tra le lesioni primarie e metastatiche. Mentre i medulloblastomi non-WNT/non-SHH presentano metastasi quasi esclusivamente con lesioni a distanza nel SNC al momento della recidiva, un'ampia proporzione di medulloblastomi SHH mostra recidive isolate nel letto tumorale¹.

Epidemiologia

I medulloblastomi SHH-attivati in generale mostrano una distribuzione per età bimodale: sono infatti più comuni nei lattanti e nei giovani adulti, con un rapporto maschi: femmine (M:F) di circa 1,5:1¹.

Eziologia

Esistono diverse sindromi tumorali ereditarie che predispongono allo sviluppo del medulloblastoma SHH-attivato. La sindrome ereditaria canonica associata a tale gruppo molecolare con TP53 *wild-type* è la sindrome del carcinoma basocellulare nevoide (sindrome di Gorlin). I medulloblastomi nel contesto della sindrome del carcinoma basocellulare nevoide sono sempre classificati nel gruppo molecolare SHH; la maggior parte è dovuta a mutazioni germinali inattivanti in PTCH1, il gene che codifica il recettore per la proteina SHH. La sindrome del carcinoma basocellulare nevoide dovuta ad altre mutazioni, come SUFU o PTCH2, è rara. Le mutazioni germinali di SUFU sono prevalentemente limitate ai lattanti, i quali mostrano anomalie dello sviluppo e predisposizione ad ulteriori patologie maligne. Mutazioni germinali in ELP1, che si trova vicino a PTCH1 sul cromosoma 9q, sono state segnalate anche nel medulloblastoma SHH-attivato. Le mutazioni germinali eterozigoti in GPR161 sono esclusivamente associate al medulloblastoma attivato da SHH e sono alla base di circa il 5% dei tumori di sottotipo SHH1. La frequenza delle mutazioni germinali nei pazienti con medulloblastoma attivato da SHH è stimata essere < 40%¹.

Patogenesi

Cellula d'origine

Si ritiene che i medulloblastomi attivati da SHH derivino da una cellula positiva ad ATOH1 della linea delle cellule dello strato granulare esterno del cervelletto. Queste cellule sono insolite tra i neuroni in quanto continuano a dividersi dopo la nascita. Il mitogeno che guida principalmente l'espansione dello strato di cellule della granulosa esterna è la proteina SHH, e molti degli eventi mutazionali in questo tipo di medulloblastoma portano all'attivazione costitutiva di SHH¹.

Profilo genetico

Le mutazioni germinali o somatiche nei geni della via di segnalazione di SHH sono caratteristiche della maggior parte dei medulloblastomi SHH-attivati e causano l'attivazione della via di SHH. Esse includono mutazioni in PTCH1 (~40% dei tumori) e SMO (~10%), i cui prodotti proteici formano il recettore per la proteina SHH, e in SUFU (~10%), un mediatore citoplasmatico dei fattori di trascrizione GLI. Sono state riscontrate anche amplificazioni di GLI1 o GLI2 (~10%) e di altri geni bersaglio a valle di SHH (MYCN, MYCL e YAP1; <10%)¹.

Altri geni comunemente mutati nel medulloblastoma attivato da SHH, ma non direttamente coinvolti nella via di segnalazione di SHH, includono DDX3X (~20%), KMT2D (10–15%) e CREBBP (~10%). Le alterazioni somatiche non codificanti del promotore di TERT, che influenzano il mantenimento dei telomeri, sono frequenti tra i medulloblastomi SHH non lattanti. La maggior parte dei tumori negli adulti (>80%) presenta mutazioni del promotore di TERT, rispetto a circa il 15% e il 20% dei tumori nei lattanti e nei bambini. Nei medulloblastomi SHH-attivati dell'infanzia privi di mutazione del promotore di TERT si osserva, nella maggior parte dei casi, un'ipermetilazione dello stesso promotore. Sia i tumori con TERT mutato sia quelli con TERT *wild-type* risultano comunque associati a un'elevata espressione di TERT. Mutazioni nel piccolo RNA nucleare (snRNA) spliceosomiale U1 si trovano in circa il 15% dei medulloblastomi attivati da SHH. Come le alterazioni di TERT, le mutazioni di U1 si riscontrano in quasi tutti i medulloblastomi SHH negli adulti e in un sottogruppo di medulloblastomi SHH negli adolescenti, ma raramente nei bambini o nei lattanti. Le variazioni comuni del numero di copie nel medulloblastoma attivato da SHH includono perdite del cromosoma 9q e 10q, che ospitano rispettivamente i loci dei geni soppressori del tumore PTCH1 (9q22) e SUFU (10q24)¹.

Sottogruppi molecolari

Quattro sottogruppi molecolari provvisori di medulloblastoma SHH-attivato possono essere dimostrati mediante profilazione della metilazione del DNA o del trascrittoma. Due si verificano principalmente nei lattanti: SHH-1 è caratterizzato da mutazioni somatiche e germinali di SUFU e guadagno del cromosoma 2, SHH-2 è caratterizzato invece dalla perdita del cromosoma 9q ed

estesa morfologia nodulare. Gli altri due sottogruppi insorgono in pazienti più anziani: SHH-3 è associato a mutazioni di TP53 ed ELP1, SHH-4 si verifica invece principalmente negli adulti ed è associato a mutazioni di U1 e TERT quasi universali e frequenti alterazioni somatiche di PTCH1 o SMO. Per i sottogruppi SHH non è ancora stato raggiunto, mediante metanalisi internazionale, il consenso su nomenclatura e caratteristiche definitorie che è stato invece ottenuto per i medulloblastomi non-WNT/non-SHH¹.

Aspetto macroscopico

I medulloblastomi attivati da SHH e con TP53 wild-type tendono ad essere compatti e ben circoscritti, in relazione all'elevata desmoplasia intratumorale¹.

Aspetto microscopico

La maggior parte dei medulloblastomi SHH-attivati TP53 wild-type ha una morfologia desmoplastica nodulare o ad estesa nodularità (MBEN). Più raramente possono essere classici o a grandi cellule/anaplastici. Tuttavia, la recidiva di tumori SHH-attivati e con TP53 wild-type desmoplastici nodulari può essere associata a trasformazione verso una morfologia anaplastica focale¹.

Immunofenotipo

Un pannello di marcatori immunoistochimici può essere utilizzato per identificare i tumori attivati da SHH tra i medulloblastomi (ma non altri tumori embrionali). I tumori attivati da SHH esprimono GAB1. Sia i medulloblastomi SHH-attivati che quelli WNT-attivati esprimono YAP1, ma i medulloblastomi SHH non mostrano positività nucleare per la β -catenina. In genere, un'immunoreattività nucleare da debole a moderata per p53 è presente in poche cellule tumorali sparse nel caso del medulloblastoma SHH-attivato TP53 wild type¹.

Citologia

Vedi paragrafo relativo nella sezione Medulloblastoma WNT-attivato, (pagina 26).

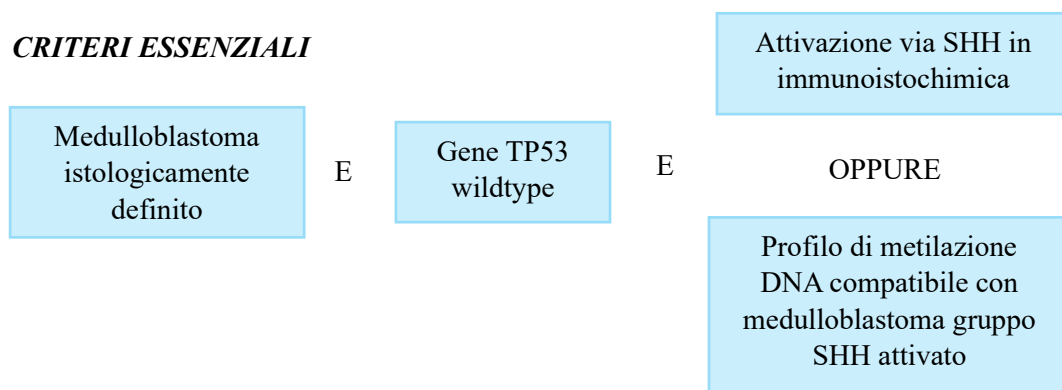
Patologia molecolare diagnostica

La profilazione della metilazione del DNA è considerata il metodo gold-standard per determinare il gruppo e/o il sottogruppo di medulloblastoma. Per

l'assegnazione del gruppo molecolare sono state utilizzate l'analisi della metilazione del DNA basata su array, l'analisi dell'espressione dell'RNA basata su array e sequenziamento, l'analisi NanoString e i saggi di classificazione della metilazione minima. In aggiunta, l'immunoistochimica può essere utilizzata per discriminare tra medulloblastomi WNT-attivati, SHH-attivati e non-WNT/non-SHH.¹

Il sequenziamento di TP53 consente di classificare i medulloblastomi attivati da SHH come wild-type o mutati, e l'analisi dei geni della via di SHH (PTCH1, SMO, SUFU) fornisce ulteriori informazioni diagnostiche. La mutazione di TP53 e l'amplificazione di MYCN (e la morfologia a grandi cellule / anaplastica) sono importanti per la stratificazione terapeutica, poiché questi marcatori sono associati a una prognosi maggiormente infausta tra i medulloblastomi attivati da SHH. Data l'elevata incidenza di predisposizione germinale tra i pazienti con medulloblastoma SHH-attivato, è raccomandata l'analisi germinale di PTCH1, SUFU, TP53, ELP1 e GPR161¹. ***Criteri diagnostici essenziali e desiderabili***

CRITERI ESSENZIALI



Prognosi

La prognosi per tutti i medulloblastomi SHH-attivati è intermedia, compresa tra quella dei medulloblastomi WNT-attivati e quella del gruppo 3. Tuttavia, la prognosi è altamente variabile tra i pazienti con tumori SHH ed è associata alle specifiche caratteristiche istopatologiche e molecolari¹.

Nei lattanti, i tumori desmoplastici/nodulari e gli MBEN sono solitamente SHH-attivati e con TP53 wild-type. Tali tumori sono associati a un esito favorevole, nonostante al momento della presentazione vengano utilizzati protocolli di

trattamento che risparmino le radiazioni. In uno studio clinico condotto su lattanti con medulloblastoma SHH-attivato, i tumori SHH-1 sono risultati associati a una sopravvivenza libera da progressione peggiore rispetto ai tumori SHH-2, che sono arricchiti per l'istotipo MBEN; tuttavia, i risultati di altri studi differiscono o sono equivoci, riflettendo probabilmente differenze nella composizione della coorte e nelle strategie terapeutiche (es. diversi schemi di metotrexato intratecale)¹.

La malattia metastatica e l'amplificazione di MYCN sono indipendentemente associate a una prognosi infausta nei bambini non lattanti e negli adolescenti. In assenza di queste caratteristiche ad alto rischio, i pazienti in questa fascia di età hanno esiti migliori (tasso di sopravvivenza a 5 anni > 80%). I medulloblastomi attivati da SHH dell'adulto hanno una prognosi relativamente favorevole, sebbene le coorti di studi clinici molecularmente definite e controllate in questo gruppo di pazienti siano rare¹.

1.2.5 Medulloblastoma SHH-attivato TP53-mutato

Il medulloblastoma SHH-attivato e TP53-mutato, è un tumore embrionale del cervelletto che mostra l'attivazione della via di segnalazione di Sonic Hedgehog (SHH) in combinazione con la mutazione del gene TP53¹.

Sottotipi

Vedi paragrafo relativo nella sezione Medulloblastoma SHH-attivato TP53 wild type.

Localizzazione

Esistono dati insufficienti per trarre conclusioni certe sulla localizzazione dei medulloblastomi, SHH-attivati TP53-mutati. Tuttavia, i tumori TP53-mutati tendono a verificarsi in bambini di età compresa tra 5 e 14 anni, e la maggior parte dei medulloblastomi che insorgono in questa fascia di età si trova negli emisferi cerebellari¹.

Caratteristiche cliniche

Vedi paragrafo relativo nella sezione medulloblastoma WNT-attivato (pagina 26).

Diagnostica per immagini

Alla TC e alla RMN, i medulloblastomi appaiono come masse solide con intenso impregnamento del mezzo di contrasto. I medulloblastomi attivati da SHH si identificano più spesso negli emisferi cerebellari, ma possono coinvolgere anche le strutture della linea mediana. I tumori TP53-mutati hanno invece maggiori probabilità di insorgere sulla linea mediana¹.

Diffusione

I medulloblastomi attivati da SHH sono meno frequentemente metastatici all'esordio rispetto ai tumori del gruppo molecolare 3, ma la diffusione leptomeningea è spesso una caratteristica di presentazione dei medulloblastomi SHH-attivati e TP53-mutati¹.

Epidemiologia

I medulloblastomi attivati da SHH in generale mostrano una distribuzione per età bimodale, essendo più comuni nei lattanti e nei giovani adulti, con un rapporto M:F di circa 1,5:1. Al contrario, i tumori SHH-attivati e TP53-mutati si riscontrano generalmente nei bambini di età compresa tra 4 e 17 anni. In uno studio che includeva 133 medulloblastomi attivati da SHH, 28 pazienti (21%) presentavano una mutazione di TP53, e l'età media di questi pazienti alla presentazione era di circa 15 anni¹.

Eziologia

Esistono diverse sindromi tumorali ereditarie che predispongono allo sviluppo del medulloblastoma SHH-attivato. Le mutazioni puntiformi germinali di TP53 (sindrome di Li-Fraumeni) predispongono al medulloblastoma, e questi tumori appartengono al gruppo attivato da SHH. Più della metà di tutti i medulloblastomi SHH-attivati e TP53-mutati presentano alterazioni germinali anziché somatiche di TP53. Le mutazioni in TP53 si riscontrano più comunemente nelle regioni di legame al DNA codificate dagli esoni da 4 a 8. Sebbene alcuni medulloblastomi WNT-attivati presentino mutazioni in TP53, queste finora sempre somatiche e le mutazioni di TP53 non lasciano presagire una prognosi infausta nel medulloblastoma WNT-attivato¹.

Patogenesi

Le mutazioni di TP53 sono riportate nel 10–15% dei medulloblastomi SHH-attivati e più della metà di queste sono germinali. L'amplificazione di MYCN si osserva nel 5–10% dei medulloblastomi attivati da SHH. Le mutazioni di TP53 e le amplificazioni di MYCN si associano frequentemente tra loro e con l'amplificazione di GLI2 e al riarrangiamento cromosomico. Anche la delezione isolata del braccio corto del cromosoma 17 e la perdita di eterozigosi presso il locus di TP53 mutato sono caratteristiche dei tumori SHH-attivati e TP53-mutati¹.

I medulloblastomi del sottogruppo SHH-3 caratterizzati da mutazione di TP53, amplificazione di MYCN e/o morfologia a grandi cellule / anaplastica non mostrano mutazioni di ELP1. I tumori TP53-mutati non emergono come sottogruppo molecolare distinto nelle analisi di *class discovery* basate sull'espressione dell'intero genoma e sulla metilazione del DNA¹.

Vedi anche medulloblastoma, SHH-attivato e TP53-wildtype.

Aspetto macroscopico

In generale, i medulloblastomi appaiono come masse rosa friabili. Non esistono dati tali da suggerire che i tumori di questo tipo specifico abbiano caratteristiche macroscopiche peculiari¹.

Aspetto microscopico

Un'anaplasia diffusa accompagnata da un sostanziale fenotipo a grandi cellule si verifica in circa il 70% dei medulloblastomi SHH-attivati e TP53-mutati. Gli altri tumori sono generalmente desmoplastici/nodulari con anaplasia focale¹.

Immunofenotipo

Un pannello di marcatori immunoistochimici può essere utilizzato per identificare i tumori SHH-attivati tra i medulloblastomi (ma non in altri tumori embrionali). I tumori SHH-attivati esprimono GAB1. Sia i medulloblastomi SHH-attivati che quelli WNT-attivati esprimono YAP1, ma i medulloblastomi SHH-attivati non mostrano immunoreattività nucleare per la β -catenina. La presenza di una mutazione di TP53 è invece suggerita da un'ampia e forte immunoreattività per la proteina p53 nei nuclei delle cellule tumorali¹.

Citologia

Vedi paragrafo relativo nella sezione medulloblastoma WNT-attivato.

Patologia molecolare diagnostica

Vedi anche sezione relativa nel paragrafo 1.2.4.

I gruppi e i sottogruppi di medulloblastoma possono essere identificati utilizzando la profilazione della metilazione del DNA o la profilazione dell'espressione genica e i relativi saggi di classificazione minima, oltre all'immunoistochimica¹.

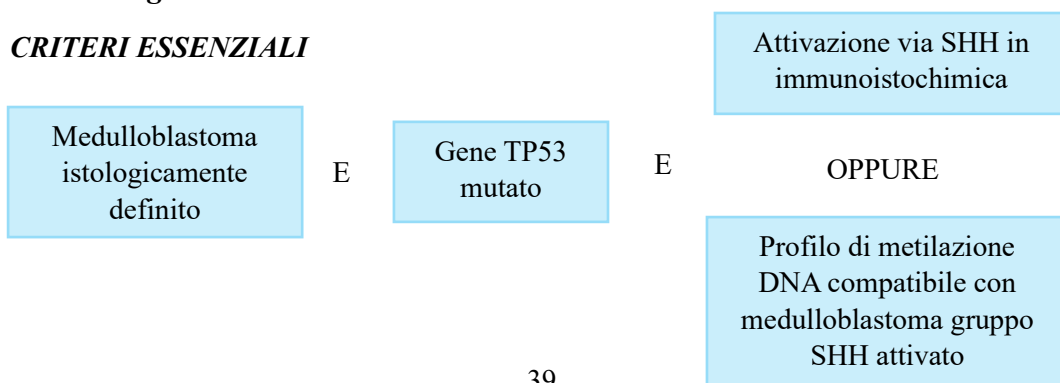
L'analisi mutazionale dei geni della via di SHH mutati (PTCH1, SUFU, SMO) fornisce ulteriori marcatori diagnostici per i tumori SHH-attivati¹.

Per l'identificazione di un medulloblastoma SHH-attivato TP53-mutato e/o con amplificazione di MYCN, la valutazione dello stato mutazionale di TP53 e dell'amplificazione di MYCN è essenziale. La morfologia a grandi cellule/anaplastica e i riarrangiamenti cromosomici forniscono anch'essi utili valutazioni supplementari. Data l'associazione del medulloblastoma SHH-attivato TP53-mutato con la sindrome di Li-Fraumeni e l'elevata incidenza complessiva di predisposizione germinale all'interno del medulloblastoma SHH-attivato, sono raccomandate per tutti i pazienti con medulloblastoma SHH-attivato l'analisi mutazionale su campioni di tumore e di sangue per PTCH1, SUFU, TP53, ELP1 e GPR161 nonché la consulenza genetica¹.

L'amplificazione di MYCN è associata anche al medulloblastoma del gruppo 4 non-WNT/non-SHH, e la mutazione di TP53 al medulloblastoma WNT-attivato. Tuttavia, nessuna delle due alterazioni è associata a una prognosi infausta quando insorge in questi specifici contesti¹.

Criteri diagnostici essenziali e desiderabili

CRITERI ESSENZIALI



Stadiazione

Vedi paragrafo relativo nella sezione medulloblastoma WNT-attivato (pagina 26).

Prognosi

Nei bambini non lattanti e negli adolescenti con medulloblastoma SHH-attivato, la mutazione di TP53 e l'amplificazione di MYCN sono associate tra loro e a un esito molto infausto. Tra i tumori del gruppo SHH, entrambe le alterazioni sono coerentemente associate a esiti sfavorevoli nelle analisi di sopravvivenza univariata e sono predittori indipendenti di prognosi infausta quando considerate insieme nelle analisi multivariate¹.

Tabella 3. Gruppo SHH-attivato e sottogruppi

GRUPPO SHH-ATTIVATO					
1 2 3 4					
TP53-wildtype TP53-mutato					
Frequenza	15-20%	15-20%	20-25%	10-15%	30-35%
Età	Lattante / Prima infanzia	Lattante / Prima infanzia	Infanzia / Bambini	Infanzia / Bambini	Adulto
M:F	1:1	02:03	01:01	04:01	04:03
Istologia	Desmoplastico nodulare > classico	Desmoplastica/MBEN > Classico	Classico>LCA	LCA> Classico	Desmoplastico nodulare>Classico
Prognosi	Prognosi eterogenea	Buona prognosi	Buona prognosi	Prognosi infuusta	Prognosi intermedia
Citogenetica	Guadagno del cromosoma 2 (2+)	Perdita dei bracci lunghi del cromosoma 9 e 10 (9q-, 10q-)	Guadagno 9p (9p+) e perdita 9q (9q-)	Perdita di 17p, 3p, 10q, 14q e guadagno di 3q (17p-, 3p-, 10q-, 14q-, 3q+)	Guadagno di 3q (3q+) e perdita di 9q, 10q, 14q (9q-, 10q-, 14q-)
Mutazioni	Mutazione/delezione di PTCH1, SUFU; mutazione di SMO, KMT2D	Mutazione/delezione di PTCH1, SUFU; mutazione di SMO	Mutazione di PTCH1, ELP1, DDX3X, KMT2D; amplificazione di PPM1D	Mutazione di TP53, DDX3X, U1 snRNA, TERT; amplificazione di MYCN, GLI2	Mutazione di U1 snRNA, TERT, PTCH1, DDX3X, SMO, CREBBP, GSE1, FBXW7

1.2.6 Medulloblastoma non-WNT/non-SHH

Il medulloblastoma non-WNT/non-SHH, è un tumore embrionale del cervelletto privo di una firma molecolare associata all'attivazione della via di segnalazione di WNT o Sonic Hedgehog (SHH). I medulloblastomi non-WNT/non-SHH sono classificati come tumori del gruppo 3 o del gruppo 4 e comprendono otto sottogruppi molecolari, dimostrati mediante profilazione della metilazione del DNA¹.

Sottotipi

I medulloblastomi non-WNT/non-SHH comprendono otto sottogruppi molecolari (sottogruppi 1–8 del gruppo 3/4), identificabili mediante l'analisi della profilazione della metilazione del DNA¹.

Localizzazione

I medulloblastomi non-WNT/non-SHH insorgono esclusivamente nel cervelletto, solitamente nella linea mediana, quasi sempre nella sua porzione inferiore¹.

Caratteristiche cliniche

Vedi paragrafo relativo sezione medulloblastoma WNT-attivato (pagina 26).

Diffusione

Alla recidiva, i medulloblastomi non-WNT/non-SHH mostrano quasi costantemente metastasi a distanza nel SNC. La malattia metastatica è presente alla diagnosi in circa il 40% dei tumori del gruppo 3 nei lattanti e colpisce oltre il 50% dei pazienti con medulloblastoma non-WNT/non-SHH (gruppo 3/4) dei sottogruppi 2–5. Una recidiva locale isolata di un medulloblastoma del gruppo 3 o del gruppo 4 dovrebbe essere considerata una neoplasia indotta da radiazioni fino a prova contraria mediante biopsia¹.

Epidemiologia

I tumori del gruppo 3 rappresentano circa il 25% di tutti i medulloblastomi e una percentuale più elevata di casi (35-40%) nei lattanti. I medulloblastomi del gruppo 3 sono estremamente rari negli adulti. I medulloblastomi del gruppo 4 costituiscono il gruppo molecolare più numeroso, rappresentando circa il 40% di

tutti i medulloblastomi. Il picco di incidenza si verifica in pazienti di età compresa tra 5 e 15 anni, con un'incidenza inferiore nei lattanti e negli adulti¹.

Eziologia

Le conoscenze attuali sull'eziologia molecolare dei medulloblastomi del gruppo 3 e del gruppo 4 sono limitate; in genere non sono associati a sindromi tumorali ereditarie note. Rari casi di medulloblastoma del gruppo 3 o del gruppo 4 sono stati segnalati in individui con una mutazione germinale di CREBBP (sindrome di Rubinstein-Taybi). Mutazioni germinali dei geni di riparazione del DNA PALB2 e BRCA2 sono state identificate anche nel medulloblastoma non-WNT/non-SHH¹.

Patogenesi

Studi trascrittomici su singola cellula tra specie diverse hanno individuato le presunte origini cellulari del medulloblastoma del gruppo 4, inclusi i neuroni glutammatergici derivati dal labbro rombico superiore provenienti dai nuclei cerebellari e le cellule a spazzola unipolari. La patogenesi dei tumori del gruppo 3 rimane meno chiara. Cellule staminali cerebellari primitive nestina-positive o cellule progenitrici sono implicate da dati trascrittomici su singola cellula, e varie popolazioni di cellule staminali o progenitrici neurali dimostrano vulnerabilità alla trasformazione in studi di modellazione tumorale nei topi¹.

Genetica

La sovraespressione di MYC è una caratteristica comune dei medulloblastomi del gruppo 3, e l'amplificazione di MYC, spesso accompagnata dalla fusione PVT1:MYC, si verifica nel 17% dei tumori del gruppo 3. Altri geni ricorrentemente mutati o focalmente amplificati includono SMARCA4 (mutato nel 9% dei casi), CTDNEP1 (mutato nel 5%), KMT2D (mutato nel 5%), MYCN (amplificato nel 5%) e OTX2 (amplificato nel 3%). Nei gruppi 3 e 4 due oncogeni rilevanti sono gli omologhi GFI1 e GFI1B, sovraespressi in modo aberrante attraverso un meccanismo di *enhancer hijacking* (sequestro dell'enhancer) nel 15% e 12% dei tumori del gruppo 3 e del gruppo 4, rispettivamente. Le alterazioni citogenetiche più comuni nel medulloblastoma (che si verificano nel 55–58% dei tumori del gruppo 3 e nell'80–85% dei tumori del gruppo 4) coinvolgono alterazioni

del numero di copie del cromosoma 17: delezione di 17p, guadagno di 17q o una combinazione di questi sotto forma di un 17q isodentrico¹.

I geni più frequentemente mutati o focalmente amplificati nei tumori del gruppo 3 e 4 sono KDM6A (mutato nel 7% dei casi), OTX2 (amplificato nel 6%), ZMYM3 (mutato nel 6%), KMT2C (mutato nel 6%), KBTBD4 (mutato nel 6%), MYCN (amplificato nel 6%), ZIC1 (mutato nel 4%), CDK6 (amplificato nel 4%), KMT2D (mutato nel 3%) e TBR1 (mutato nel 3%). Il sequestro dell'enhancer del locus genico SNCAIP che porta all'espressione aberrante di PRDM6 è specifico per il medulloblastoma del gruppo 4 e si osserva in circa il 17% dei tumori. Mutazioni germinali eterozigoti deleterie in BRCA2 e PALB2 sono presenti nell'1–2% dei pazienti; il loro ruolo è corroborato dalla presenza di firme mutazionali tipiche del deficit di riparazione per ricombinazione omologa. I medulloblastomi sia del gruppo 3 che del gruppo 4 mostrano eventi genetici somatici ricorrenti che convergono sulle modificazioni post-traduzionali degli istoni, in particolare H3 p.K28 (K27) e H3 p.K5 (K4) secondo la nuova e la vecchia nomenclatura¹.

Aspetto macroscopico

I medulloblastomi appaiono come masse rosa friabili, occasionalmente con focolai macroscopici di necrosi. All'intervento chirurgico, i medulloblastomi non-WNT/non-SHH mostrano un'invasione del tronco encefalico più spesso rispetto ad altri tipi di medulloblastoma. I tumori del gruppo 3 hanno maggiori probabilità di contenere macrocisti e sono solitamente più piccoli alla presentazione rispetto ai tumori del gruppo 4¹.

Aspetto microscopico

La maggior parte dei medulloblastomi non-WNT/non-SHH presenta una morfologia classica. Tali tumori mostrano occasionalmente aree di formazione a rosetta di Homer Wright (neuroblastica), o un pattern a palizzata dei nuclei delle cellule tumorali o persino la formazione di noduli, in assenza di desmoplasia, quadro definito morfologia classica bifasica"). Tumori a grandi cellule / anaplastici possono appartenere sia al gruppo 3 che al gruppo 4. Tuttavia, sono presenti a una frequenza più elevata nel gruppo 3 e sono relativamente arricchiti nei tumori del

sottogruppo 2 del gruppo 3/4. Molto raramente, medulloblastomi desmoplastici/nodulari sono stati assegnati al gruppo non-WNT/non-SHH¹.

Immunofenotipo

Per identificare i tumori non-WNT/non-SHH tra i medulloblastomi può essere utilizzato un pannello di marcatori immunoistochimici. A differenza dei tumori WNT e SHH, i medulloblastomi non-WNT/non-SHH non esprimono YAP1. Non esprimono GAB1 e non mostrano immunoreattività nucleare per la β -catenina¹.

Citologia

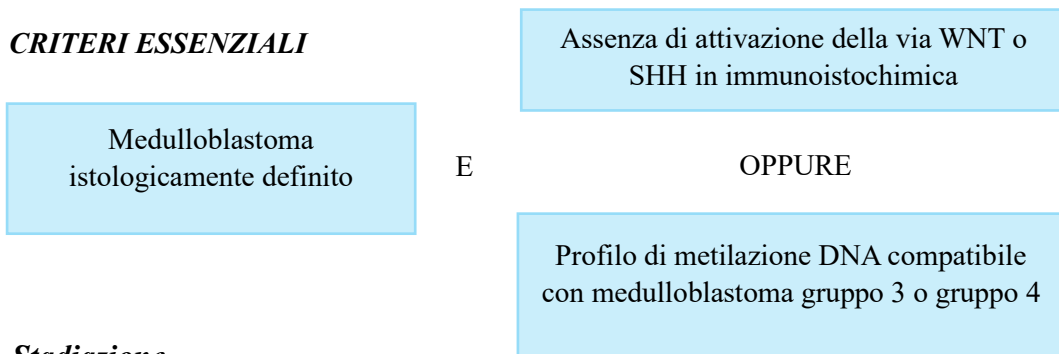
Vedi paragrafo relativo nella sezione medulloblastoma WNT-attivato (pagina 26).

Patologia molecolare diagnostica

L'analisi dei profili di metilazione del DNA, da sola o in combinazione con i dati trascrittomici, ha identificato sottogruppi molecularmente eterogenei tra i medulloblastomi del gruppo 3 e del gruppo 4 con distinte associazioni cliniche e genetiche. Una grande metanalisi di 1501 medulloblastomi studiati mediante profilazione della metilazione del DNA supporta l'esistenza di otto robusti sottogruppi del gruppo 3 o del gruppo 4, designati come sottogruppi 1–8 del gruppo 3/4. (vedi tabella 4). I sottogruppi 2, 3 e 4 consistono esclusivamente di medulloblastomi del gruppo 3, mentre i sottogruppi 6, 7 e 8 comprendono prevalentemente medulloblastomi del gruppo 4. I sottogruppi 1 e 5 sono sottogruppi intermedi, che mostrano attributi molecolari e cellulari caratteristici sia del gruppo 3 che del gruppo 4. La maggior parte dei medulloblastomi non-WNT/non-SHH presenta una morfologia classica, ma i tumori a grandi cellule / anaplastici sono più frequenti nel sottogruppo 2. La malattia metastatica alla presentazione è relativamente frequente nei sottogruppi 2–5. Un esito relativamente infausto è associato ai tumori dei sottogruppi 2 e 3¹.

Criteri diagnostici essenziali e desiderabili

CRITERI ESSENZIALI



Stadiazione

Vedi paragrafo relativo nella sezione medulloblastoma WNT-attivato (pagina 26).

Prognosi

L'amplificazione di MYC è da tempo consolidata come un'alterazione genetica associata a un esito infausto nei pazienti con medulloblastoma. Questa osservazione si riflette negli esiti relativamente infausti attribuiti ai medulloblastomi del gruppo 3 nel loro complesso, ma l'amplificazione di MYC, il 17q isodentrico e la malattia metastatica alla diagnosi hanno tutti un significato prognostico tra i tumori del gruppo 3. La malattia metastatica al momento della presentazione, che è associata a un esito infausto, è attualmente il marcatore prognostico più solido tra i tumori del gruppo 4. Modelli di metilazione del DNA ad alto rischio sono anche associati a una prognosi infausta. Al contrario, il guadagno dei cromosomi 7 e 17 e la perdita dei cromosomi 8 e 11 sono stati implicati come marcatori di esito favorevole tra i medulloblastomi del gruppo 4 in studi clinici retrospettivi¹.

I sottogruppi di metilazione del DNA dei tumori non-WNT/non-SHH mostrano esiti disparati, con i sottogruppi 2 e 3 che mostrano esiti particolarmente infausti. Aberrazioni citogenetiche a rischio favorevole (ossia guadagno del cromosoma 7, perdita del cromosoma 8 e perdita del cromosoma 11) sono associate ai sottogruppi 6 e 7, mentre tumori a prognosi infausta con isocromosoma 17q e genomi altrimenti silenti sono comunemente associati al sottogruppo 8¹. Nella tabella 4 sono riassunte le caratteristiche del gruppo non-WNT/non-SHH.

Tabella 4. Gruppo non-WNT/non-SHH e relativi sottogruppi

Gruppo	Gruppo 3							Gruppo 4		
	Sottogruppo	1	2	3	4	5	6		7	8
Dati demografici		Frequenza	3-5%	10-15%	10-15%	8-10%	8-10%	8-10%	15-20%	25-28%
Dati clinici		Istologia	Classica	LCA, classica	Classica > LCA	Classica	Classica	Classica > LCA	Classica	Classica
		OS a 5 anni	~75%	~50%	~40%	~85%	~60%	~80%	~85%	~75%
		Citogenetica	Bilanciata	8+, 1q+	7+, i17q, 10q-, 16q-	7+, 8-, 10-, 11-, i17q	7+, i17q	7+, 8-, i17q	7+, 8-, i17q	i17q
Dati molecolari		Mutazioni driver	Attivazione GFI1/1B Amplificazione OTX2	Amplificazione MYC Attivazione GFI1/1B Mutazioni KBTBD4, SMARCA4, CTDNEP1, KMT2D	Amplificazione MYC	Sconosciuti	Amplificazione MYC, MYCN	Attivazione PRDM6 Amplificazione MYCN	Mutazione KBTBD4	Attivazione PRDM6 Mutazioni KDM6A, ZMYM3, KMT2C

1.3 Medulloblastoma istologicamente definito

Per quanto concerne la trattazione delle caratteristiche cliniche, della diagnostica molecolare e della stadiazione del medulloblastoma istologicamente definito, rifarsi alle relative sezioni di cui sopra. Come detto, l'aspetto molecolare e quello morfologico costituiscono due elementi in dialogo tra loro e caratterizzanti la medesima entità clinica.

Sottotipi

Medulloblastoma classico; medulloblastoma desmoplastico/nodulare; medulloblastoma con nodularità estesa; medulloblastoma a grandi cellule / anaplastico¹.

Localizzazione

- I medulloblastomi classici sono tipicamente localizzati nella linea mediana cerebellare, coinvolgendo la cavità del quarto ventricolo, con o senza stretto contatto con il tronco encefalico. Alcuni medulloblastomi classici (WNT-attivati o SHH-attivati) sono localizzati lateralmente, coinvolgendo il peduncolo cerebellare e l'emisfero;
- I medulloblastomi desmoplastici/nodulari (D/N) possono insorgere sia nell'emisfero cerebellare che nel verme. La maggior parte dei medulloblastomi che si verificano negli emisferi cerebellari è di tipo D/N, specialmente negli adulti;
- I medulloblastomi con nodularità estesa (MBEN) sono localizzati nel verme, con coinvolgimento di entrambi gli emisferi. Questa localizzazione contrasta con quella del medulloblastoma D/N, che coinvolge più frequentemente gli emisferi cerebellari;
- I medulloblastomi a grandi cellule/anaplastici (LC/A) sono tipicamente localizzati nella linea mediana cerebellare e coinvolgono la cavità del quarto ventricolo, il tronco encefalico adiacente e le strutture cerebellari. I medulloblastomi LC/A con

attivazione di SHH possono mostrare una localizzazione laterale con estensione extracerebellare¹.

Diagnostica per immagini

- I medulloblastomi classici appaiono alla RM generalmente come masse iperintense, omogenee e con impregnamento del mezzo di contrasto, con localizzazione sulla linea mediana. Alcuni medulloblastomi (frequentemente medulloblastomi del gruppo 4 non-WNT/non-SHH) mostrano un impregnamento disomogeneo del mezzo di contrasto. I medulloblastomi WNT-attivati sono tipicamente localizzati nella linea mediana cerebellare / angolo ponto-cerebellare, molti dei quali a stretto contatto con il tronco encefalico¹:
- I medulloblastomi D/N appaiono come masse solide, frequentemente con impregnamento del mezzo di contrasto. I tumori che si originano perifericamente in un emisfero cerebellare negli adulti si presentano occasionalmente come lesioni extra-assiali. I lattanti si presentano frequentemente con una lesione molto superficiale dell'emisfero cerebellare laterale, che mostra un denso impregnamento del mezzo di contrasto ed è quasi patognomonica per il medulloblastoma attivato da SHH¹;
- I MBEN appaiono come lesioni multinodulari molto grandi con una struttura a "grappolo d'uva" che impregna il contrasto, coinvolgente il verme e talvolta gli emisferi cerebellari adiacenti. Rari casi hanno un peculiare aspetto giriforme, in cui le folie cerebellari sono ben delineate e ingrandite, con impregnamento del mezzo di contrasto. Si possono osservare l'erniazione verso il basso delle tonsille cerebellari e la cancellazione degli spazi cisternali della fossa posteriore¹.
- I medulloblastomi LC/A appaiono come masse disomogenee con impregnamento del mezzo di contrasto, con focolai suggestivi di necrosi ed edema peritumorale¹.

Diffusione

Alla diagnosi, il medulloblastoma classico è risultato disseminato al compartimento leptomeningeo del SNC nel 40% dei casi. Metastasi leptomeningee si riscontrano nel 20% dei medulloblastomi D/N alla diagnosi. La maggior parte delle recidive del medulloblastoma D/N si riscontra localmente nel letto tumorale, nella fossa posteriore, mentre la diffusione metastatica alle leptomeningi o per via sistemica è meno comune tra i pazienti con questi tumori. I MBEN possono recidivare localmente o (raramente) metastatizzare attraverso le vie del liquido cerebrospinale (LCS). Tuttavia, tali casi sembrano rispondere bene al successivo trattamento e hanno una prognosi favorevole¹.

La malattia metastatica si riscontra in ben il 60–70% dei pazienti con medulloblastoma LC/A già al momento della diagnosi. I tumori recidivano frequentemente e metastatizzano attraverso le vie del liquido cerebrospinale (LCS)¹.

Epidemiologia

- I medulloblastomi classici rappresentano il 70–80% di tutti i medulloblastomi. Possono insorgere a qualsiasi età, dall'infanzia all'età adulta, ma si verificano prevalentemente nell'infanzia (60–70% dei casi) e si riscontrano in tutti e quattro i tipi di medulloblastoma definiti geneticamente, ma prevalentemente nei medulloblastomi WNT-attivati e non-WNT/non-SHH¹;
- Si stima che i medulloblastomi D/N rappresentino il 20% di tutti i medulloblastomi. Nei bambini di età < 3 anni, i medulloblastomi D/N rappresentano il 40–60% di tutti i casi. Nei pazienti adulti, i medulloblastomi D/N costituiscono il 20–40% di tutti i sottotipi istologici¹;
- In un numero ampio di casistiche, i MBEN rappresentano complessivamente il 3,2–4,2% di tutti i sottotipi di medulloblastoma, ma nei bambini di età < 3 anni (in cui i medulloblastomi D/N rappresentano fino al 50% dei casi), è stato

riportato che i MBEN costituiscono il 20% di tutti i casi. Sia il medulloblastoma D/N che il MBEN appartengono al tipo molecolare di medulloblastoma SHH-attivato¹;

- I medulloblastomi LC/A possono insorgere in pazienti di qualsiasi età e rappresentano circa il 10% di tutti i tumori. Considerati separatamente, i medulloblastomi anaplastici sono circa 10 volte più prevalenti rispetto ai medulloblastomi a grandi cellule. Sono più frequenti tra i medulloblastomi dei gruppi non-WNT/non-SHH (gruppo 3) e SHH-attivati *TP53*-mutati, ma molto rari nel gruppo WNT-attivato¹.

Eziologia

I medulloblastomi che insorgono nel contesto della sindrome del carcinoma basocellulare nevoide sono principalmente sottotipi desmoplastici (medulloblastoma D/N o MBEN). Questa sindrome viene diagnosticata nel 5,8% di tutti i pazienti con medulloblastoma, a fronte del 22,7% dei pazienti con medulloblastoma D/N e del 41% dei pazienti con MBEN. Viceversa, il rischio di medulloblastoma è di circa il 2% nelle forme correlate a *PTCH1* e risulta 20 volte più elevato in quelle correlate a *SUFU*. Alterazioni germinali ricorrenti in *ELP1* o *GPR161* predispongono anch'esse ai medulloblastomi in questo gruppo (SHH-attivato). A causa della frequenza di mutazioni germinali predisponenti in questa popolazione di pazienti, la consulenza genetica è indicata per i bambini e le loro famiglie a cui viene diagnosticato un medulloblastoma D/N o MBEN¹.

In alcuni casi rari, i medulloblastomi classici vengono diagnosticati nel contesto della sindrome costituzionale da deficit di riparazione dei mismatch o della sindrome di Rubinstein-Taybi, oppure in individui con mutazioni germinali di *APC*, *BRCA2* o *PALB2*¹.

La stragrande maggioranza dei medulloblastomi LC/A è sporadica, e poco si sa sulla loro eziologia. I medulloblastomi SHH-attivati e *TP53*-mutati vengono spesso diagnosticati nel contesto della sindrome di Li-Fraumeni¹.

Patogenesi

Vedi anche le sezioni sulla Classificazione molecolare del medulloblastoma (pagina 23).

I medulloblastomi D/N derivano da cellule progenitrici dei granuli che formano lo strato granulare esterno durante lo sviluppo cerebellare. Queste cellule progenitrici hanno come mitogeno la proteina SHH, prodotta dalle cellule di Purkinje. Recentemente, il sequenziamento dell'RNA su singola cellula ha rivelato che questi tumori contengono cellule che assomigliano a diversi stadi dello sviluppo dei precursori dei granuli (cellule simil-progenitrici dei granuli). I medulloblastomi D/N negli adulti contengono una percentuale maggiore di cellule similtipo progenitrici dei granuli indifferenziate rispetto ai tumori nei lattanti¹.

Come i medulloblastomi D/N, si ritiene che i MBEN derivino da cellule precursore cerebellari della linea dei granuli¹.

I medulloblastomi LC/A del gruppo 3 non-WNT/non-SHH nascono probabilmente da una popolazione cellulare similtipo staminale nelle prime fasi dello sviluppo del cervelletto¹.

Aspetto macroscopico

- I medulloblastomi classici appaiono come masse rosa friabili, occasionalmente con focolai macroscopici di necrosi;
- I medulloblastomi D/N tendono ad essere compatti e ben circoscritti, riflettendo la desmoplasia intratumorale;
- I MBEN tendono ad essere compatti, a struttura a grappolo d'uva e ben circoscritti;
- I medulloblastomi LC/A appaiono come masse friabili grigio-rosa, occasionalmente con focolai macroscopici di necrosi. All'intervento chirurgico, i medulloblastomi LC/A mostrano spesso un'invasione cerebellare e del tronco encefalico¹.

Aspetto microscopico

Esistono quattro sottotipi morfologici consolidati di medulloblastoma. Ciascuno di questi sottotipi definiti istologicamente presenta particolari associazioni cliniche e molecolari. La diversità architetturale e citologica può manifestarsi non solo come formazione di noduli, ma anche come differenziazione neurocitica o ganglionare. Raramente, qualsiasi sottotipo istologico di medulloblastoma può mostrare una differenziazione miogenica e/o melanotica; i termini "medullomioblastoma" e "medulloblastoma melanotico", sono stati usati per descrivere questi pattern¹.

1.3.1 Medulloblastoma classico

I medulloblastomi classici sono l'archetipo del tumore cerebrale a piccole cellule blu rotonde del SNC. Sono costituiti da cellule embrionali fittamente stipate, scarsamente differenziate, con nuclei ipercromici di varie forme. L'attività mitotica è aumentata e si possono riscontrare corpi apoptotici. La desmoplasia intratumorale è assente, ma una reazione desmoplastica può essere indotta laddove le cellule tumorali invadono le leptomeningi. Le rosette di Homer Wright si riscontrano in alcuni medulloblastomi classici. Occasionalmente, noduli di differenziazione neurocitica e ridotta proliferazione cellulare sono presenti localmente nei tumori classici, ma questi non sono mai associati alla desmoplasia internodulare o collagene perinodulare quando esaminato in un preparato di reticolina. Tali medulloblastomi nodulari non desmoplastici corrispondono a tumori non-WNT/non-SHH, a differenza dei tipici medulloblastomi D/N, che appartengono al tipo SHH-attivato. I medulloblastomi classici WNT-attivati mostrano spesso un'intensa vascolarizzazione e un'alterazione della barriera ematoencefalica¹.

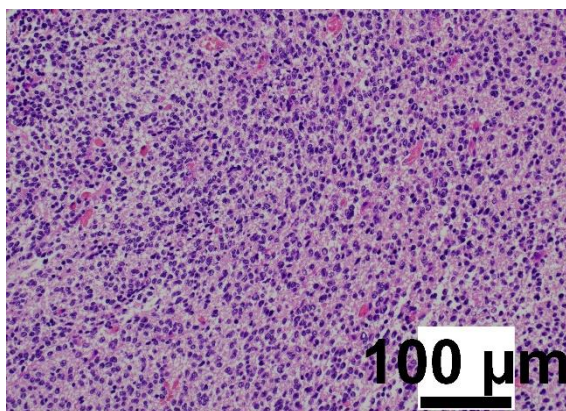


Figura 1. Medulloblastoma istotipo classico

1.3.2 Medulloblastoma desmoplastico/nodulare

Il medulloblastoma D/N è caratterizzato da una disposizione bicompartimentale di zone nodulari, prive di reticolina (isole pallide) circondate da cellule fittamente stipate, scarsamente differenziate, altamente proliferanti con nuclei ipercromici e moderatamente pleomorfi, che producono un'estesa rete di fibre di reticolina intercellulari. In rari casi, questo pattern definitorio non è presente nell'intero campione, con alcune aree che presentano invece una disposizione più sinciziale di cellule embrionali non desmoplastiche. I noduli contengono cellule tumorali con caratteristiche di variabile maturazione neurocitica immerse in una matrice fibrillare similtipo neuropilo. Le rosette di Homer Wright non si riscontrano generalmente nel medulloblastoma D/N. I tumori con noduli piccoli possono essere facilmente ignorati se non viene eseguita la colorazione per la reticolina. Il livello di attività mitotica e l'indice di proliferazione Ki-67 sono molto più elevati nelle aree internodulari rispetto ai noduli¹.

Una franca anaplasia focale può essere riscontrata occasionalmente all'interno delle aree internodulari, specialmente nei tumori SHH-attivati e TP53-mutati. I medulloblastomi che mostrano solo una quantità aumentata di reticolina (senza un pattern nodulare) o che mostrano un pattern nodulare focale ma senza un completo accerchiamento perinodulare da parte della reticolina non sono classificati come medulloblastoma D/N (vedi medulloblastoma classico, sopra); le due caratteristiche distintive devono presentarsi insieme per una diagnosi di medulloblastoma D/N. Tuttavia, la progressione post-trattamento associata ad anaplasia con perdita delle caratteristiche diagnostiche chiave è stata descritta nei medulloblastomi D/N, specialmente in pazienti con aberrazioni germinali di PTCH1¹.

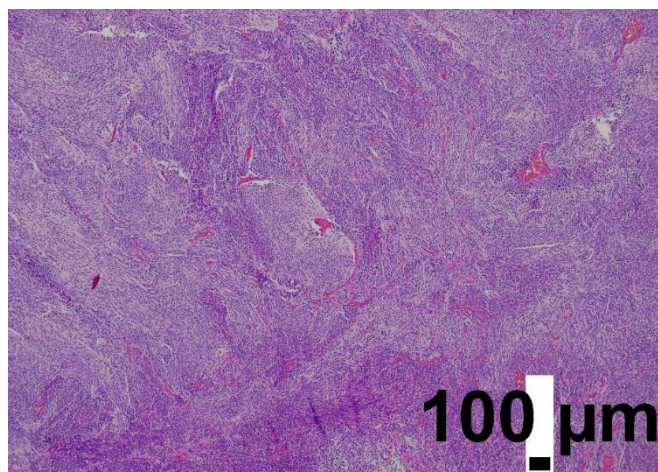


Figura 2. Medulloblastoma istotipo desmoplastico nodulare

1.3.3 Medulloblastoma ad estensiva nodularità (MBEN)

Il MBEN differisce dal sottotipo D/N in quanto presenta un'architettura lobulare espansa dovuta al fatto che le zone prive di reticolina sono sostanzialmente più grandi e più ricche di matrice similtipo neuropilo. Queste zone contengono una popolazione di piccole cellule rotonde, che mostrano vari gradi di differenziazione neurocitica e possono esibire un pattern a filamenti (*streaming pattern*). La componente internodulare può variare da un'area all'altra e andare incontro a una marcata riduzione in alcuni punti. Come nei medulloblastomi D/N, l'attività mitotica e l'indice di proliferazione Ki-67 sono bassi o assenti nelle aree neurocitiche e molto più elevati nelle aree internodulari. Dopo radioterapia e/o chemioterapia, i MBEN vanno talvolta incontro a una ulteriore maturazione in tumori dominati da cellule ganglionari¹.

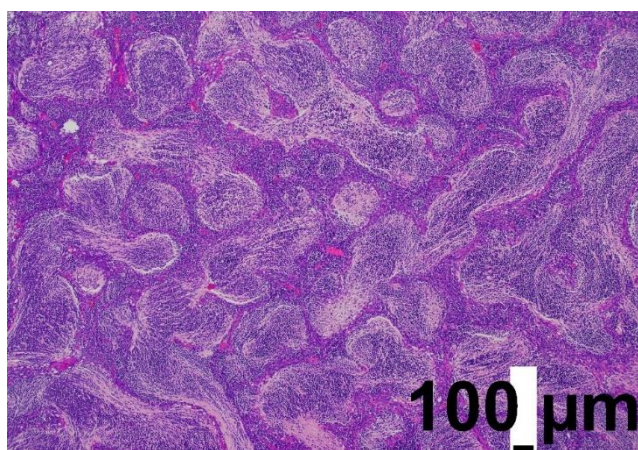


Figura 3. Medulloblastoma istotipo ad estensiva nodularità

1.3.4 Medulloblastoma a grandi cellule/anaplastico (LC/A)

La maggior parte dei medulloblastomi LC/A mostra una combinazione di caratteristiche a grandi cellule e anaplastiche. L'anaplasia come caratteristica dei tumori embrionali è stata proposta per la prima volta per i medulloblastomi con marcato pleomorfismo nucleare accompagnato da conte mitotiche e apoptotiche particolarmente elevate. Il modellamento nucleare reciproco (*moulding*), le pseudoinclusioni citoplasmatiche e l'avvolgimento cellulare (*cell wrapping*) sono caratteristiche tipiche. Il fenotipo a grandi cellule manifesta nuclei rotondi più uniformi con nucleoli prominenti, mancando della variabilità di dimensioni e forma cellulare che caratterizza il fenotipo anaplastico; le sue cellule sono relativamente grandi e monomorfe, ma mostrano l'elevato tasso di *turnover* visibile nei tumori anaplastici¹.

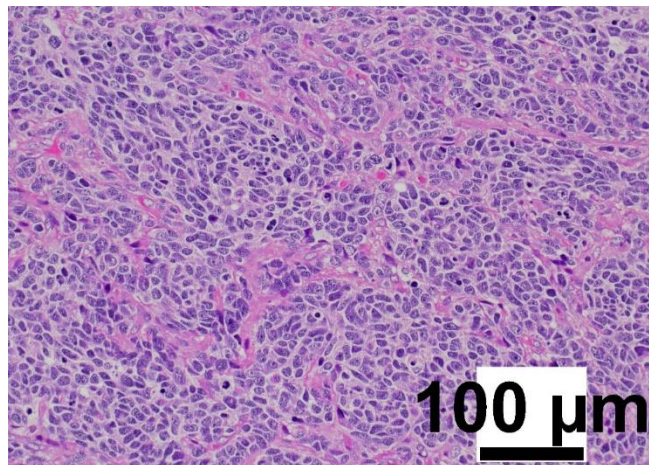


Figura 4. Medulloblastoma istotipo a grandi cellule/anaplastico

Immunofenotipo

I medulloblastomi classici esprimono vari marcatori neurali aspecifici, come CD56 (NCAM1), MAP2 e NSE. La maggior parte dei casi è immunopositiva per la sinaptofisina e NeuN, ma questi marcatori neuronali possono anche essere assenti. L'immunoreattività per i neurofilamenti è molto rara. Cellule tumorali embrionali che mostrano l'espressione di GFAP si possono osservare in rari casi. Alcuni medulloblastomi classici esprimono il fattore di trascrizione OTX2, che risulta però negativo nei medulloblastomi classici con attivazione di SHH¹.

Nei medulloblastomi D/N, l'attivazione della via di SHH può essere dedotta mediante immunoistochimica per bersagli specifici, come GAB1 e p75-NGFR. Questi marcatori sono prevalentemente espressi nelle aree internodulari. Il fattore di trascrizione OTX2 è negativo, a differenza dei medulloblastomi non-SHH. Un diffuso e forte accumulo nucleare di p53, che suggerisce una mutazione di *TP53*, può essere rilevato in rari medulloblastomi D/N, frequentemente in associazione con segni di anaplasia citologica. Questo reperto può accompagnare un'alterazione somatica o germinale di TP53 (sindrome di Li-Fraumeni). I noduli nel medulloblastoma D/N mostrano un'espressione variabile di marcatori neuronali, inclusi la sinaptofisina e NeuN. Noduli con un'espressione di NeuN molto forte, che è un indicatore di avanzata differenziazione neurocitica, sono tipici del MBEN, ma possono verificarsi anche nel medulloblastoma D/N¹.

L'espressione di GFAP può essere riscontrata frequentemente in entrambe le componenti, più spesso nelle cellule internodulari. I medulloblastomi D/N esprimono GAB1, YAP1 e il recettore del fattore di crescita nervoso a bassa affinità p75-NGFR (particolarmente nelle aree internodulari), mentre l'immunoistochimica per OTX2 è coerentemente negativa¹.

Nei MBEN, la matrice tessutale similtipo neuropilo e le cellule neurocitiche differenziate all'interno dei noduli sono fortemente immunoreattive per la sinaptofisina. Queste ultime cellule sono anche fortemente (e in modo meno variabile rispetto al medulloblastoma D/N) immunoreattive per NeuN. Come i medulloblastomi D/N, i MBEN sono negativi per OTX2 e positivi per GAB1 e p75-NGFR nelle aree internodulari¹.

Diagnosi differenziale

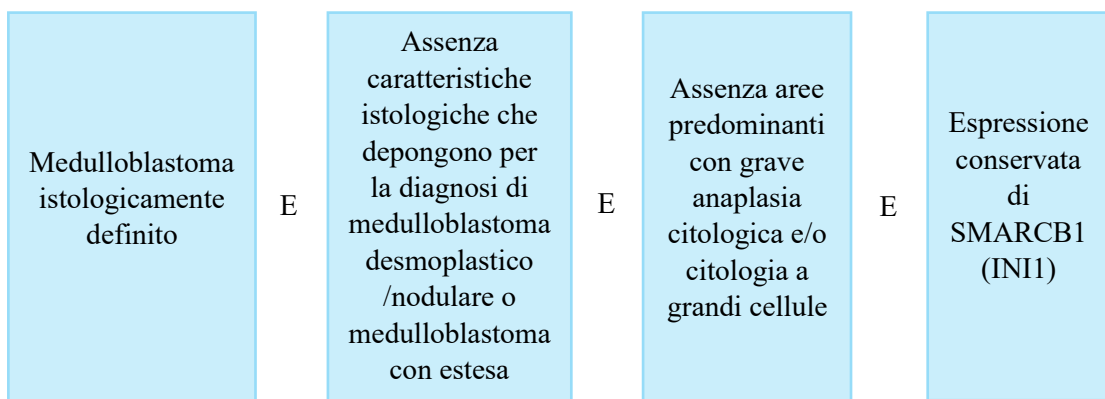
I tumori embrionali con rosette pluristratificate e i tumori teratoidi/rabdoidi atipici possono mostrare una sovrapposizione istomorfologica con i medulloblastomi. A differenza dei medulloblastomi, i tumori embrionali con rosette pluristratificate sono tipicamente LIN28A-immunoreattivi. L'espressione nucleare di SMARCB1 e SMARCA4 è conservata in tutti i tipi di medulloblastoma; la perdita di espressione di una di queste proteine del complesso SWI/SNF è diagnostica per i tumori teratoidi/rabdoidi atipici¹.

Citologia

La valutazione della citologia del liquido cerebrospinale (LCS) è richiesta per la stadiazione. Nei campioni di LCS e nei preparati per striscio per schiacciamento si possono osservare piccoli gruppi di cellule scarsamente differenziate con nuclei prevalentemente rotondi e ipercromici e citoplasma scarso. Nei campioni di medulloblastoma D/N, si può osservare una differenziazione neurocitica — caratterizzata da dimensioni cellulari minori e nuclei rotondi —, mentre i campioni di medulloblastoma LC/A possono rivelare piccoli gruppi di cellule scarsamente differenziate con nuclei grandi e atipici e scarso citoplasma; moulding (modellamento) nucleare, wrapping (avvolgimento cellulare) e nucleoli ben visibili¹.

Criteri diagnostici essenziali e desiderabili medulloblastoma classico

CRITERI ESSENZIALI



Prognosi

Vedi anche le sezioni relative nella classificazione molecolare del medulloblastoma (pagina 23).

- Nella maggior parte dei casi, il medulloblastoma D/N nella prima infanzia ha un esito eccellente con la sola chirurgia e chemioterapia. In una metanalisi di fattori prognostici nei medulloblastomi dell'infanzia, la sopravvivenza libera da progressione e la sopravvivenza globale sono risultate significativamente migliori per i sottotipi desmoplastici rispetto ad altri medulloblastomi. Tuttavia, nessuna differenza nella

sopravvivenza tra medulloblastoma D/N e medulloblastoma classico è stata riscontrata in uno studio multicentrico europeo che ha coinvolto bambini più grandi con medulloblastoma a rischio standard¹;

- I MBEN sono tipicamente associati a esiti da buoni a eccellenti, raggiungendo un tasso di sopravvivenza globale di quasi il 100% nelle serie rappresentative, sebbene alcuni casi siano stati segnalati per mostrare un decorso clinico sfavorevole. La malattia metastatica alla presentazione non ha influito favorevolmente sulla prognosi, suggerendo che una diagnosi di MBEN conferisce un esito migliore indipendentemente da caratteristiche cliniche avverse. Tuttavia, alterazioni germinali di PTCH1 o SUFU accompagnate da firme trascrittomiche associate al cancro sono state recentemente identificate come marcatori molecolari dell'evoluzione del MBEN¹;
- Al momento della prima descrizione di questi tumori, vi era un forte sospetto che i medulloblastomi LC/A si comportassero in modo più aggressivo rispetto ad altri sottotipi istologici, con malattia metastatica spesso evidente alla presentazione. In studi retrospettivi su coorti di pazienti inseriti in trial clinici, la morfologia LC/A si è dimostrata un indicatore prognostico indipendente dell'esito. Nei trial contemporanei, l'istologia LC/A è considerata un pattern ad alto rischio che richiede una terapia adiuvante intensificata. Il tasso di sopravvivenza libera da progressione a 5 anni per il medulloblastoma LC/A è del 30–40%, sebbene un comportamento più aggressivo possa essere mostrato dai tumori LC/A SHH-attivati con mutazione di TP53 e dai tumori del gruppo 3 non-WNT/non-SHH con amplificazione di MYC¹.

1.4 Il microambiente tumorale

1.4.1 Generalità sul microambiente tumorale

La genesi di un tumore rappresenta il risultato di molteplici interazioni tra le cellule tumorali stesse con altre popolazioni cellulari (immunitarie, stromali, vascolari), prodotti solubili (citochine, chemochine, metaboliti), componenti della matrice extracellulare e specifiche condizioni ambientali (es. ipossia)¹⁵. Queste componenti formano un network biologico estremamente dinamico ed eterogeneo che prende il nome di microambiente tumorale (TME)¹⁵, plasmato e educato dalle cellule tumorali per favorire lo sviluppo delle caratteristiche distintive del cancro e rispondere agli eventi stressori intrinseci ed estrinseci, avendo come scopo ultimo la sopravvivenza e la migrazione nell'organismo delle stesse¹⁶. Negli ultimi anni lo studio del TME ha permesso di identificare nove microambienti specializzati¹⁵ capaci di interagire tra di loro; le caratteristiche principali di ciascuno di questi microambienti vengono riassunte di seguito.

Microambiente immunitario

Il TME comprende, oltre alle cellule tumorali, anche cellule del sistema immunitario, sia cellule dell'immunità innata, come le cellule natural killer (NK), i macrofagi associati al tumore (TAMs), le cellule mieloidi soppressive (MDSCs), i mastociti, i granulociti, le cellule dendritiche (DCs), i neutrofili associati al tumore, sia dell'immunità acquisita, come linfociti T e B. L'insieme di queste popolazioni cellulari partecipa alla formazione e/o si trova ad agire in un ambiente prevalentemente immunosoppressivo, con mancato controllo della proliferazione delle cellule tumorali e creazione di nicchie pre-metastatiche¹⁶.

Microambiente metabolico

La riprogrammazione metabolica (cambiamenti nel metabolismo o nell'apporto di nutrienti) è uno dei capisaldi del cancro: le cellule tumorali mostrano spesso un aumentato metabolismo del glucosio, dei lipidi, degli amminoacidi, e accumulo di lattato. Le cellule tumorali presentano un'accentuata glicolisi e produzione di lattato persino in condizioni di normossia (effetto Warburg o glicolisi aerobica); il lattato, prodotto dal piruvato grazie all'enzima lattato deidrogenasi (LDH), e come risultato

dei processi che portano dalla glutammina all' α -chetoglutarato, non è più considerato un prodotto di scarto del metabolismo, ma un componente attivo nell'educare il TME per favorire la crescita tumorale¹⁶.

Nei tumori è presente anche un aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), prodotte sia dalle cellule tumorali che dalle cellule stromali, e strettamente legate alla tumorigenesi, alla disfunzione immunitaria e all'educazione del TME in senso pro-tumorale. In un ambiente arricchito in ROS le cellule tumorali diventano tolleranti alle stesse, fenomeno che prende il nome di "ROS addiction"¹⁶.

Microambiente ipossico

L'ipossia è una costante del TME, con delle variazioni regionali, a causa della crescita sproporzionata e del metabolismo accelerato delle cellule tumorali rispetto alle capacità del circolo di fornire ossigeno sufficiente; l'ipossia agisce sia sulle cellule tumorali, modificandone il metabolismo, regolandone la staminalità e la quiescenza, favorendo l'adattamento all'ambiente arricchito in ROS e l'aumento del carico mutazionale a carico di geni oncogeni e oncosoppressori (come TP53, PTEN e MYC), sia sulle cellule del TME, regolando le interazioni intercellulari, causando una disfunzione delle cellule immunitarie, e agendo come primo motore per stimolare l'angiogenesi¹⁶.

Microambiente acido

Le cellule tumorali tendono ad avere un pH intracellulare più alto, che favorisce la sopravvivenza, proliferazione, capacità di invadere e migrare di queste cellule, ma allo stesso tempo partecipano alla diminuzione del pH extracellulare. L'acidificazione del TME non può essere separata dall'ipossia e dalle alterazioni metaboliche dei suoi componenti; queste portano ad un aumento della produzione di lattato, esportato dalle cellule tumorali dal trasportatore degli acidi monocarbossilici 4 (MCT4), e responsabile dell'acidosi progressiva. Questa, oltre ad agire direttamente sulle cellule tumorali, causa una disfunzione delle cellule immunitarie, impedendo l'orchestrazione di una risposta anti-tumorale¹⁶.

Meccanico e matrice extracellulare

È costituito da componenti intracellulari (vimentina, actina e neurofilamenti), extracellulari (collagene e fibrina), cellule stromali (fibroblasti) e segnalazioni intercellulari (integrina). I fibroblasti associati al cancro (CAFs) sono una popolazione eterogenea, e quelli pro-tumorali (pCAFs)⁷ possono secernere metalloproteinasi della matrice (MMP2, MMP3 e MMP9) per favorire la degradazione e il rimodellamento della matrice extracellulare (ECM), favorendo il mantenimento della nicchia staminale tumorale e fenomeni di transizione epitelio-mesenchimale. Questo microambiente è in grado di influenzare l'espressione di geni oncogeni e oncosoppressori, la morfologia cellulare e la risposta terapeutica del cancro¹⁶.

Microambiente microbico

Il microambiente microbico nel contesto tumorale è stato sottovalutato e poco indagato per molto tempo, ma ha dimostrato di essere parte del complesso network di interazioni tra le cellule tumorali e il TME, e soprattutto di essere in grado di modulare la risposta immunitaria anti-tumorale. Tra i batteri che abitano il nostro organismo, diversi studi hanno evidenziato come l'unico ad avere un potenziale ruolo nel controllo o nello sviluppo tumorale sia quello del sistema digerente¹⁶.

Nicchia staminale

Le cellule quiescenti nascoste all'interno del tumore vengono chiamate cellule tumorali staminali (CSCs), e sono dotate della capacità di auto-rinnovamento e di intraprendere multipli percorsi differenziativi, e sono spesso considerate la causa principale di metastasi, ricorrenza e fallimento terapeutico¹⁶.

Microambiente nervoso

Il microambiente nervoso rappresenta un concetto emergente, che tenta di spiegare l'interazione tra cellule tumorali e nervi periferici (simpatici, parasimpatici o sensoriali), che terminano all'interno del tumore, o si trovano nelle immediate vicinanze. Queste interazioni si basano sul rilascio, da parte dei terminali assonici, di neurotrasmettitori o neuropeptidi, come dopamina, catecolamine e acetilcolina. Viene suddiviso in due categorie: intracranico ed extracranico^{15,16}. Ulteriori studi sono necessari per stabilirne le effettive capacità.

Come si può evincere da quanto riportato sopra, il TME comprende molteplici microambienti specializzati che si sovrappongono e comunicano in diversi modi tra di loro; il riconoscimento e la comprensione del TME come singoli compartimenti e come insieme potranno fornire informazioni utili all'identificazione di nuovi target terapeutici e allo sviluppo di nuovi farmaci in grado di potenziare la risposta immunitaria anti-tumorale e/o rallentare o inibire la crescita tumorale.

Nelle sezioni seguenti verrà approfondito il ruolo delle cellule Natural Killer e macrofagi nel TME, i loro rapporti con le cellule tumorali e altre cellule immunitarie e non immunitarie che rivestono un ruolo nella regolazione della vita della cellula tumorale.

1.4.2 Cellule NK e TME

Le cellule Natural Killer (NK) sono cellule dell'immunità innata linfoidi (ILC) caratterizzate dall'espressione in superficie di CD56 e dalla negatività per CD3 (CD56⁺ CD3⁻). Possono essere suddivise in due sottogruppi principali, sulla base dell'espressione di CD56:

- CD56^{bright}: circa il 5%-10% delle cellule NK nel sangue periferico, sono relativamente immature e si pensa abbiano una funzione immunomodulatoria mediata dalla secrezione di citochine. Si localizzano preferenzialmente negli organi linfoidi secondari, come linfonodi o tonsille, grazie all'espressione di specifici recettori per chemochine, di cui il principale è il recettore CCR7. In seguito all'esposizione a IL-2 e/o IL-15 possono differenziare in NK CD56^{dim}¹⁵.
- CD56^{dim}: costituiscono il 90%-95% delle cellule NK nel sangue periferico, sono completamente mature e hanno il ruolo di eliminare le cellule target. Si ritrovano soprattutto nel sangue periferico, nel midollo osseo e negli organi periferici come la milza e i polmoni, grazie all'espressione del recettore per chemochine CXCR1 (recettore per IL-8)¹⁵.

La funzione principale delle cellule NK, da cui deriva il loro nome, è l'eliminazione diretta di cellule identificate come tumorali, infette, o danneggiate grazie al rilascio di perforine e granzimi contenuti nei lisosomi secretori. Le perforine agiscono creando dei pori nella membrana cellulare della cellula target, permettendo il successivo ingresso dei granzimi, i quali attivano il programma di morte cellulare mediato dalle caspasi. Possono inoltre causare apoptosi delle cellule target grazie all'espressione in membrana di Fas-ligando e di TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), o ancora attraverso il recettore di superficie CD16, che media il processo di citotossicità cellulare anticorpo-dipendente (ADCC)¹⁵. Il processo col quale una cellula NK distingue "self" da "non self", e quindi con il quale si attiva il rilascio di granzimi e perforine, è mediato dall'attivazione di recettori di membrana, che si dividono in inibitori e attivatori. I primi, che comprendono i KIRs (Killer immunoglobulin-like receptors), i LIRs (Leukocyte Ig-like receptors) e CD94 (famiglia NKG2 di recettori lectinici tipo C), riconoscono

molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC-I), e mediano la tolleranza e l'inattivazione delle cellule NK verso le cellule "self"; i secondi, come NCR (natural cytotoxic receptor, famiglia di recettori di cui fanno parte NKp46, NKp44 e NKp30), DNAM-1 (DNAX accessory molecule 1) e NKG2D (natural killer group 2 member D), riconoscono invece ligandi espressi da cellule che hanno subito mutazioni o infezioni. La via finale di attivazione o tolleranza della cellula NK viene dunque mediata dal rapporto tra recettori attivatori e inibitori stimolati in un dato momento, senza richiedere la presentazione antigenica da parte di cellule specializzate come invece accade per i linfociti T¹⁵

Tra i recettori inibitori della famiglia NKG2, NKG2A riveste un ruolo di particolare rilievo in ambito oncologico. NKG2A e i KIR inibitori rappresentano infatti i principali recettori inibitori espressi dalle cellule NK¹⁷.

NKG2A appartiene alla superfamiglia dei recettori lectinici di tipo C, che comprende anche i recettori attivatori NKG2D e NKG2C; come NKG2C, forma un eterodimero con CD94 e riconosce come ligando HLA-E, ma il suo legame trasmette segnali inibitori attraverso due motivi ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif)¹⁶. Questi reclutano le fosfatasi SHP-1 e SHP-2, con conseguente defosforilazione di proteine chiave della segnalazione attivatoria quali VAV1, ZAP70 e le chinasi della famiglia Src, e inibizione della cellula NK. È stato inoltre dimostrato che il legame di HLA-E con NKG2A altera la formazione dell'actina a livello della sinapsi immunologica, compromettendo la funzione della cellula NK. Una quota compresa tra il 20% e il 50% delle cellule NK circolanti esprime NKG2A, con espressione maggiore nel sottogruppo CD56bright rispetto al CD56dim¹⁷.

HLA-E, molecola HLA non classica, è espressa costitutivamente a bassi livelli sulle cellule nucleate e la sua stabilizzazione sulla membrana richiede il legame con peptidi derivati principalmente dalle sequenze leader delle molecole HLA di classe I classiche e di HLA-G¹⁶. Nelle cellule neoplastiche la perdita di HLA-A/B/C, che consente di eludere il riconoscimento da parte dei linfociti T citotossici, comporta anche una riduzione di HLA-E di superficie e rende quindi la cellula suscettibile alle cellule NK NKG2A-positive; tuttavia, l'evasione

immunitaria può realizzarsi anche attraverso la sovraespressione di HLA-E, persino in assenza delle molecole HLA-A/B/C. L'espressione di HLA-E può inoltre essere incrementata da citochine pro-infiammatorie come l'IFN- γ , configurando un meccanismo di immune escape che si realizza proprio in un ambiente infiammatorio. La sovraespressione di HLA-E è stata documentata in numerose neoplasie solide ed ematologiche, con associazione tra elevata espressione e peggiore esito clinico in carcinoma ovarico, glioblastoma, carcinoma gastrico e mieloma multiplo. Parallelamente, un'elevata espressione di NKG2A si associa a prognosi sfavorevole in diversi tumori, tra cui il carcinoma epatico e i tumori del distretto testa-collo. L'asse NKG2A–HLA-E è pertanto oggi considerato un checkpoint immunitario a sé stante, bersaglio di strategie terapeutiche in sviluppo clinico, tra cui l'anticorpo monoclonale anti-NKG2A monalizumab.¹⁷

All'interno del TME le cellule NK comunicano con numerose popolazioni cellulari, tra cui le cellule tumorali, che rappresentano la maggior parte delle cellule costituenti il TME. La comunicazione intercellulare tra cellule NK e cellule tumorali può avvenire in più modi:

- Gap junctions: è stata dimostrata l'esistenza di una comunicazione bidirezionale cellula tumorale-cellula NK mediata da gap junctions a livello della sinapsi immunologica. Tale comunicazione avviene mediante connessine, proteine integrali transmembrana che permettono il trasferimento di piccole molecole solubili, come glucosio, glutammato, ATP o cAMP, micropeptidi (compresi antigeni) e micro-RNA. La connessina principale espressa nelle cellule del sistema immunitario è la connessina 43. Il canale idrofilico che si viene a formare tra le due cellule consente il passaggio di calcio nella cellula tumorale, il quale favorisce il processo di apoptosi mediato dai granzimi¹⁵.
- Nanotubi: strutture di comunicazione intercellulare ubiquitarie, capaci di trasportare molteplici molecole solubili per lunghe distanze. È stato dimostrato per le cellule NK come la frequenza di formazione dei nanotubi dipenda dal numero di interazione

recettori attivatori-ligandi, ma sembra che solo alcune coppie specifiche di recettore-ligando possano indurne la formazione; tuttavia, la loro presenza fa supporre che le NK siano in grado di mantenere una interazione con cellule target in movimento, oppure possano prendere di mira più target contemporaneamente¹⁵.

- Esosomi: vescicole extracellulari del diametro di 30-150 nanometri, contenenti proteine, lipidi e acidi nucleici, che agiscono come mediatori della comunicazione intercellulare in maniera autocrina, paracrina o endocrina. Nell'interazione tra cellula NK e cellula tumorale si possono distinguere due tipi di esosomi: quelli secreti dalla cellula tumorale e quelli provenienti dalla cellula NK. I primi presentano una duplice funzione: da un lato possono incrementare l'azione citotossica delle cellule NK attraverso proteine Hep, o tramite l'espressione di IL-15/IL-15R α ; dall'altro possono inibire l'attività della cellula NK tramite l'espressione di molecole inibitorie, favorendo l'evasione immunitaria. I secondi (NK-Exos) possiedono alcune caratteristiche delle cellule NK d'origine, ad esempio contengono granzimi e perforine e possono indurre attivazione della via delle caspasi nella cellula tumorale. Esprimono inoltre marcatori di membrana tipici delle cellule NK, come CD16, CD69, NKp44 e NKG2D, e possono ulteriormente influenzare la risposta anti-tumorale grazie al soppressore tumorale miRNA-186. È stato anche osservato come in condizioni di ipossia sia aumentata la produzione e la citotossicità degli NK-Exos¹⁵.

Le cellule NK hanno la capacità di riconoscere ed eliminare le cellule staminali del cancro (CSCs); in differenti tipi tumorali (es. melanoma, glioblastoma e tumore della mammella) è stato in particolare dimostrato come le CSCs siano proprio il target preferenziale delle cellule NK. I meccanismi molecolari alla base del riconoscimento ad opera delle cellule NK delle CSCs risiedono nel peculiare profilo di espressione proteica di membrana di quest'ultime, in quanto presentano bassi livelli di molecole MHC-I, e numerosi ligandi per i recettori attivatori delle

cellule NK. Nonostante ciò, le CSCs possono acquisire resistenza contro l'azione delle cellule NK, principalmente grazie alla sovraespressione delle molecole MHC-I HLA-G ed HLA-E¹⁵, quest'ultima ligando del recettore inibitorio NKG2A precedentemente descritto¹⁷.

Oltre alle cellule tumorali, nel TME le cellule NK possono interagire anche con i linfociti T che infiltrano il tumore. Sempre più evidenze mostrano come le cellule NK possano influenzare la risposta delle cellule T contro il tumore, direttamente e indirettamente. Tra i meccanismi diretti rientra la secrezione di interferone γ (IFN- γ) da parte delle cellule NK attivate da IL-2/IL-12, il quale favorisce l'induzione della polarizzazione dei linfociti T helper di tipo 1 (Th1), a significato anti-tumorale; inoltre le cellule NK possono presentare sulla superficie OX40 ligando e B7, che inducono la proliferazione delle cellule T. Nei meccanismi indiretti invece il tramite tra cellule NK e linfociti T è rappresentato dalle cellule dendritiche (DCs): cellule NK attivate secernono IFN- γ , che stimola la secrezione di IL-12 da parte delle DCs, la quale a sua volta potenzia la risposta dei linfociti T CD8+ contro le cellule tumorali. La comunicazione tuttavia è bidirezionale, e anche i linfociti T attivati, grazie al rilascio di citochine, specialmente IL-2 e IL-15, possono influenzare l'attivazione delle cellule NK¹⁵.

Mentre gli scambi bidirezionali con i linfociti T helper e citotossici sono in grado di favorire una risposta immunitaria anti-tumorale, i linfociti Treg possono inibire la risposta delle cellule NK verso i target, siano essi tumorali o patogenici. E' stato infatti dimostrato come i Treg possano inibire direttamente le cellule NK tramite l'azione del fattore di crescita trasformato (TGF)- β legato alla membrana, il quale induce una riduzione dell'espressione di NKG2D. Oltre a questo legame di membrana diretto, esistono anche vari meccanismi indiretti con cui i Treg interferiscono con la risposta anti-tumorale mediata dalle NK, tra cui la formazione di adenosina a partire dall'ATP presente nel TME, ad opera di due ectonucleotidasi espresse sulla superficie dei Treg (CD39 e CD73). L'adenosina così formata si lega al recettore 2A (A2AR) sulle cellule NK regolandone negativamente la maturazione e la citotossicità. Inoltre, i Treg possono consumare l'IL-2 presente nel TME, privando le cellule NK di questa citochina fondamentale per la loro attivazione¹⁵.

Le DCs, che costituiscono un ponte nelle interazioni tra linfociti T e cellule NK, costituiscono un gruppo relativamente piccolo delle cellule immunitarie del TME, ma giocano un ruolo fondamentale, in quanto specializzate nella presentazione dell'antigene per l'organizzazione della risposta anti-tumorale. Nel 1999 è stata dimostrata per la prima volta l'interazione tra cellule NK e DCs, e recentemente è stato visto come queste interazioni siano bidirezionali. Le cellule NK attivate possono influenzare il reclutamento, la proliferazione e la maturazione delle DCs, grazie alla secrezione di FLT3L (FMS-related tyrosine kinase 3 ligand), IFN- γ , TNF- α e XCL1, migliorando la risposta anti-tumorale. Le DCs, a loro volta, possono rilasciare numerose citochine (IL-12, IL-15, IL-18, IFN- γ) e chemochine (CXCL9, CXCL10) per favorire il reclutamento e l'attivazione delle cellule NK. Si viene così a delineare un circolo di feedback positivo nell'interazione cellula NK-DC. Le cellule tumorali non sono impassibili a questo, e possono regolare negativamente sia il rilascio di chemochine da parte delle cellule NK, mediante la produzione di prostaglandina E2 (PGE2), sia la funzione delle DCs, mediante la secrezione di IL-6 o IL-10¹⁵.

Anche altre cellule presentanti l'antigene, i macrofagi, possono interagire con le cellule NK all'interno del TME. La comunicazione tra queste due popolazioni cellulari avviene principalmente mediante il rilascio di mediatori solubili e citochine. Nel TME i macrofagi possono sia favorire la risposta immunitaria anti-tumorale, specialmente nelle fasi iniziali di crescita del tumore, mediante il rilascio di numerose citochine attivanti (IL-12, IL-15, IL-18 e TNF- α), sia agire in senso pro-tumorale, favorendo l'evasione immunitaria delle cellule tumorali, ad esempio con la secrezione di TGF- β . Sulle cellule NK il TGF- β inibisce a vario livello le funzioni effettrici: riduce l'espressione di recettori attivatori (come NKG2D e NKp30), regola l'espressione dei recettori per le chemochine (es. CX3CR1), promuove l'espressione di recettori inibitori (es. LIR2), e riduce il rilascio di citochine da parte delle cellule NK (IFN- γ e TNF- α). Le cellule NK a loro volta possono influenzare la polarizzazione macrofagica in senso M1, anti-tumorale, mediante il rilascio di IFN- γ ¹⁵.

Partecipano attivamente alla formazione del TME e alle numerose interazioni che lo regolano anche altri tipi cellulari, tra cui le cellule stromali

(fibroblasti) e le cellule staminali mesenchimali (MSCs). I fibroblasti associati al cancro (CAFs) possono derivare dalle cellule endoteliali, dai periciti, dagli adipociti, o dalle cellule staminali mesenchimali, e rappresentano la componente dominante dello stroma tumorale. I CAFs non possono essere identificati con un singolo marcatore di superficie al momento, ma sono diversi quelli descritti che li caratterizzano, tra cui α -SMA (smooth muscle actin), FSP1 (fibroblast specific protein 1), NG2 (neuron-gial antigen 2), e CD90. I CAFs possono inibire le cellule NK in diversi modi, tra cui l'espressione di mediatori solubili, la modulazione dei recettori attivatori delle cellule NK e l'interazione con altre cellule immunitarie. Ad esempio, possono produrre PGE2, che induce un fenotipo inattivo nelle cellule NK; possono secernere TGF- β e possono reclutare macrofagi polarizzati in senso pro-tumorale (M2)¹⁵. Le MSCs sono cellule staminali pluripotenti capaci di produrre multiple linee cellulari mesenchimali; recenti studi attribuiscono loro una funzione immunomodulatoria, che le rende in grado di interagire con un ampio spettro di cellule immunitarie, come linfociti T, B, DCs, e cellule NK. Le interazioni sottese tra MSCs e cellule NK sono molteplici, complesse, e principalmente di tipo inibitorio nei confronti delle cellule NK; si esplicano tramite il rilascio da parte delle MSCs di TGF- β , PGE2, IDO (indolamine 2,3-dioxygenase), esosomi e l'espressione di HLA-G. Inoltre, sono possibili contatti diretti tra MSCs e cellule NK, che conducono alla riduzione dell'espressione dei recettori attivatori sulla membrana di queste ultime, oppure alla riduzione del rilascio del contenuto dei lisosomi secretori. Non è possibile, tuttavia, non considerare alcune contraddizioni emerse dalle evidenze: a piccole concentrazioni, le MSCs sembrano promuovere l'azione anti-tumorale delle cellule NK, aumentandone la capacità di secrezione di IFN- γ , mentre ad alte concentrazioni le MSCs sembrano esercitare un'azione inibitoria, come sopra esposto¹⁵.

Recenti studi hanno inoltre mostrato come il comportamento delle cellule NK all'interno del TME sia influenzato anche da segnali meccanici, come l'adesione, la migrazione, l'infiltrazione tissutale e le funzioni citotossiche. L'infiltrazione del tessuto tumorale da parte delle cellule NK si accompagna a drastici cambiamenti nelle proprietà meccaniche dello stroma e delle cellule target; tali alterazioni meccaniche sembrano in grado di alterare la citotossicità delle

cellule NK, suggerendo una meccano-sensibilità delle stesse. Tale meccano-sensibilità sarebbe mediato da segnali meccanici dinamici actina-relati, essenziali per mantenere la funzione effettrice delle cellule NK. Gli studi effettuati evidenziano come elemento cardine per tale regolazione della citotossicità la proteina SHP-1 (SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase-1): l'attivazione dei recettori attivatori promuove un rapido flusso di actina, che impedisce a SHP-1 di legarsi alla rete di actina, e SHP-1 mantiene così una conformazione inattiva; al contrario, i recettori inibitori quando attivi, tra cui NKG2A, rallentano il flusso di actina, consentendo il legame di SHP-1, con conseguente cambio conformazionale nella forma attiva, la quale inibisce l'attivazione delle cellule NK. In maniera simile, modifiche conformazionali del citoscheletro sono attivamente coinvolte nella formazione della sinapsi immunologica tra cellula NK e cellula target¹⁵. Tale meccanismo risulta coerente con quanto descritto per NKG2A, il cui legame con HLA-E recluta SHP-1 e SHP-2 e altera la formazione dell'actina a livello della sinapsi immunologica¹⁷.

Tutti i componenti del TME dipendono dai nutrienti per la loro sopravvivenza e la loro proliferazione, ma la competizione e le interazioni tra essi formano un intrecciato meccanismo di segnalazione intercellulare basato anche sui metaboliti: le cellule NK non sono infatti escluse dall'azione dei metaboliti presenti nel TME. In condizioni normali il glucosio è una fonte di energia chiave per l'attività citotossica delle cellule NK, e alte capacità e riserva glicolitiche sono essenziali per instaurare una risposta anti-tumorale. Tuttavia, il limitato accesso al glucosio causato dalla competizione perpetrata dalle cellule tumorali riduce la glicolisi nelle cellule NK, causandone una riduzione delle funzioni effettrici. Allo stesso modo, le alte concentrazioni di lattato presenti nel TME possono impedire alle cellule NK di instaurare un'efficace risposta anti-tumorale, tramite una riduzione dell'espressione di perforine, granzimi e recettori attivatori, come NKp46¹⁵.

1.4.3 Macrofagi e TME

I macrofagi costituiscono una componente essenziale del sistema immunitario, svolgendo ruoli sia nelle risposte immunitarie innate sia in quelle adattative¹⁸. Insieme ad altre cellule fagocitiche essi costituiscono la prima linea di

difesa e agiscono attraverso il rilascio di citochine proinfiammatorie, le quali contribuiscono all'attivazione del sistema immunitario innato e alle successive risposte dei linfociti T e B. Caratteristica fondamentale dei macrofagi è la polarizzazione cui possono andare incontro, attraverso cui acquisiscono distinti profili fenotipici in risposta a molteplici stimoli. La classificazione convenzionale della polarizzazione macrofagica prevede due fenotipi principali:

- **Macrofagi M1:** anche detti macrofagi proinfiammatori, attivati classicamente; acquisiscono il fenotipo M1 indotto da lipopolisaccaride (LPS)
- **Macrofagi M2:** i macrofagi antinfiammatori acquisiscono il fenotipo M2 indotto da IL-4 o IL-13. Oltre al fenotipo M2a indotto da IL-4/IL-13, il sottogruppo di macrofagi M2 può essere ulteriormente sottoclassificato in diversi sottotipi in base alle loro funzioni specifiche:
 - **Macrofagi M2b**, noti anche come macrofagi regolatori. Essi vengono attivati da immunocomplessi e ligandi dei TLR e sono coinvolti nelle reazioni immunitarie e infiammatorie, producono a loro volta sia citochine pro-infiammatorie, sia citochine antinfiammatorie;
 - Un altro sottotipo è rappresentato dai macrofagi **M2c**, che vengono attivati da glucocorticoidi o IL-10 ed esercitano principalmente funzioni antinfiammatorie;
 - **M2d**, noti anche come TAM (macrofagi associati al tumore), sono attivati da ligandi dei TLR e da agonisti del recettore dell'adenosina A2, e svolgono ruoli cruciali nella regolazione della progressione tumorale, dell'angiogenesi e della metastatizzazione¹⁸.

Tabella 5. Principali vie metaboliche dei macrofagi M1 e M2

Via Metabolica	Macrofagi M1	Macrofagi M2
Glicolisi	Potenziata	Fondamentale per l'attivazione M2
Metabolismo degli amminoacidi	iNOS aumentata	Attività di Arginasi-1 aumentata

PPP (Via dei pentoso fosfati)	PPP aumentata; rapporto NADH/NAD ⁺ aumentato	PPP limitata
OXPHOS (Fosforilazione ossidativa)	OXPHOS inibita	OXPHOS potenziata
Metabolismo dei lipidi	Acido grasso sintasi aumentata	FAO (Ossidazione degli acidi grassi) potenziata
Ciclo di Krebs (TCA)	Ciclo di Krebs interrotto	Ciclo di Krebs elevato
Metabolismo della glutammina	No	Contribuisce all'attivazione M2

Nella Tabella 5 vengono riassunte le differenze metaboliche principali che esistono tra i macrofagi polarizzati in senso M1 e quelli polarizzati in senso M2.

Questo ultimo sottotipo di macrofagi descritti (TAM) costituisce una popolazione fondamentale all'interno del microambiente tumorale (TME). I TAMs sono infatti caratterizzati da marcata eterogeneità e plasticità fenotipica, non solo tra pazienti diversi o tra differenti tipi di tumore, ma anche all'interno dello stesso tumore in diverse fasi della progressione tumorale: questa eterogeneità riflette la capacità dei TAMs di rispondere agli stimoli ambientali, acquisendo un determinato fenotipo (polarizzazione) in un determinato contesto¹⁸.

Durante le fasi iniziali della formazione tumorale, i TAM svolgono principalmente un ruolo pro-infiammatorio sopprimendo lo sviluppo del tumore, sebbene le evidenze a riguardo siano ancora limitate¹⁷. Con la crescita della massa tumorale, poi, i macrofagi nel TME vengono "educati" e acquisiscono un fenotipo M2 attraverso l'azione dei linfociti Th2. I macrofagi citotossici si convertono così in macrofagi pro-tumoral, favorendo la progressione neoplastica. A testimonianza della vasta complessità fenotipica di tale popolazione macrofagica, specifici sottotipi di TAM sono stati associati a molteplici processi quali oncogenesi, angiogenesi, vascolarizzazione, immunosoppressione, metastatizzazione, chemioresistenza e prognosi clinica infausta. Ciononostante, i TAM possono anche esplicare funzioni tumoricide mediando la fagocitosi delle cellule neoplastiche e promuovendo l'immunità antitumorale. Importante sottolineare come la localizzazione dei TAM all'interno del TME ne influenzi finemente la funzione. In linea generale, i TAM localizzati in aree ipossiche o nelle immediate vicinanze dei vasi sanguigni esercitano effetti pro-angiogenici; al contrario, è stato riscontrato che

i TAM che infiltrano il fronte d'avanzamento tumorale svolgono un ruolo antineoplastico nello specifico caso del carcinoma del colon¹⁸.

A seguito della trasformazione maligna, l'angiogenesi intratumorale risulta fondamentale per l'ulteriore progressione della patologia. Nel 1971, Folkman et al. ipotizzarono per primi la correlazione tra crescita tumorale e angiogenesi. Inizialmente si riteneva che l'angiogenesi tumorale fosse indotta esclusivamente dalle cellule neoplastiche; tuttavia, Staton et al. hanno dimostrato che anche i TAM regolano l'angiogenesi mediante la secrezione di fattori quali il fattore inducibile dall'ipossia HIF-1 α , il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e il fattore tessutale (TF). Inoltre, è stato evidenziato che altre citochine infiammatorie secrete dai TAM promuovono la neovascolarizzazione attraverso molteplici vie di segnalazione¹⁸.

Crosstalk-metabolico tra TAM e TME

I TAM e gli altri componenti del TME partecipano alla formazione del microambiente tumorale, il che suggerisce l'esistenza di interazioni reciproche fra i vari elementi che lo costituiscono mediate da citochine, chemochine e altri fattori. Nella maggior parte dei casi, tutti gli elementi del TME consumano ossigeno e nutrienti dall'ospite per sostenere le proprie prestazioni fenotipiche e funzionali. Di conseguenza, i metaboliti si accumulano all'interno del TME e vengono riciclati da una cellula all'altra. In particolare, agendo come messaggeri per il contatto cellula-cellula, i metaboliti derivati dal TME (ovvero da cellule tumorali, linfociti T, mastociti, fibroblasti associati al cancro e adipociti, ad eccezione dei TAM) vengono assunti dai TAM alterandone il fenotipo e la funzione. A loro volta, i TAM promuovono la progressione tumorale mediante una riprogrammazione metabolica innescata dai metaboliti veicolati all'interno del TME. Di seguito vengono descritti i complessi rapporti metabolici che si instaurano tra i vari componenti del TME¹⁹.

Cellule tumorali e metaboliti

La maggior parte delle cellule presenti all'interno del TME è costituita da cellule tumorali. Le cellule neoplastiche possiedono la facoltà opportunistica di "educare" il TME al fine di instaurare condizioni favorevoli la progressione tumorale. Numerose cellule tumorali sottraggono glucosio al TME per sostenere la

propria progressione e questo porta le altre popolazioni cellulari, compresi i TAM a prediligere la fosforilazione ossidativa (OXPHOS) per generare l'energia necessaria ai processi cellulari. Tuttavia, la maggior parte delle cellule tumorali non convoglia interamente il glucosio nel ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) mitocondriale per produrre ATP (adenosina trifosfato) in modo efficiente, ma lo impiega nella glicolisi aerobica, un fenomeno noto come "effetto Warburg". Pertanto, le cellule tumorali producono grandi quantità di acido lattico attraverso la glicolisi aerobica e rilasciano l'eccesso nel microambiente extracellulare tramite il trasportatore dei monocarbossilati 4 (MCT4)¹⁹.

Diversi studi indicano che il trattamento con acido lattico sopprime la secrezione di TNF nei monociti umani attraverso l'inibizione della glicolisi. Inoltre, è stato riportato che l'acido lattico funge da messaggero tra le cellule tumorali e i TAM. L'acido lattico derivato dalle cellule tumorali induce l'espressione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e la polarizzazione M2 dei TAM, un processo mediato dal fattore inducibile dall'ipossia (HIF1 α). Inoltre, uno studio recente ha dimostrato che l'acido lattico induce l'attivazione di geni M2 nei macrofagi attraverso la lattilazione istonica. Oltre a ciò, l'acidosi extracellulare è coinvolta nella progressione tumorale mediante la stimolazione dell'autofagia e dell'immunosoppressione, ed è stato riscontrato che essa promuove la progressione neoplastica aumentando i macrofagi pro-tumorali nel carcinoma prostatico. Per quanto riguarda il meccanismo sottostante, l'acidosi tumorale viene percepita dai recettori accoppiati a proteine G (GPCR) espressi sui TAM. Questa stimolazione induce l'espressione del repressore trascrizionale ICER (inducible cyclic AMP early repressor), potenziando la polarizzazione dei macrofagi in senso pro-tumorale, specialmente nei tumori ad elevato tasso glicolitico come il melanoma. È degno di nota che, in questo studio, l'acido lattico derivato dal tumore è risultato non indispensabile per l'induzione dell'espressione di ICER nei TAM; ciò indica che altri acidi organici e ioni idrogeno, in presenza o assenza di acido lattico, concorrono nel "innescare" i TAM a sostegno della crescita tumorale¹⁹.

La limitata attività della via OXPHOS nelle cellule tumorali è accompagnata da un consumo di glutammina impiegata per alimentare il ciclo del TCA. La glutammina viene convertita in α -chetoglutarato della glutammato

deidrogenasi o dalle amminotransferasi. Un lavoro ha riportato che l' α -chetoglutarato intracellulare conduce all'attivazione M2-like dei macrofagi tramite l'ossidazione degli acidi grassi (FAO) e la riprogrammazione epigenetica Jmjd3-dipendente dei geni M2. Ciononostante, sono necessarie ulteriori ricerche per chiarire il meccanismo shuttling dell' α -chetoglutarato tra cellule tumorali e TAM. Il succinato, prodotto a valle dell' α -chetoglutarato, è un intermedio del ciclo del TCA nei mitocondri e i suoi livelli sono controllati principalmente dalla succinato deidrogenasi (SDH), considerata un oncosoppressore. Mutazioni ereditarie o somatiche e l'inibizione della SDH determinano la formazione del tumore, causando un marcato accumulo di succinato nelle cellule neoplastiche. Ciononostante, l'eccessiva assunzione di glutammina da parte delle cellule tumorali induce un'anaplerosi basata sulla glutammina, e la via dello *shunt* dell'acido γ -amminobutirrico contribuisce ugualmente ad aumentare i livelli di succinato. Il succinato di derivazione tumorale viene captato attraverso il recettore del succinato (SUCNR1) e determina la polarizzazione dei TAM verso un fenotipo pro-tumorale tramite la via di segnalazione SUCNR1/PI3K/HIF1 α , favorendo la metastatizzazione tumorale, che può essere mediata anche da succinato autocrino. Tali evidenze suggeriscono che il succinato sierico potrebbe rappresentare un potenziale biomarcatore clinico¹⁹.

L'ATP è da tempo riconosciuto come la principale molecola energetica. L'ipossia e la chemioterapia provocano un cospicuo accumulo di ATP nel TME, derivato prevalentemente dalle cellule tumorali attraverso i trasportatori ATP-binding cassette (ABC), la pannexina 1 o le connessine. L'ATP extracellulare attiva i recettori purinergici P2 (P2XR e P2YR) sulle cellule tumorali, modulandone la crescita o l'inibizione. Nella maggior parte dei casi, l'ATP è instabile nei fluidi biologici e viene rapidamente degradato ad adenosina, la quale si accumula abbondantemente nel liquido extracellulare dei tumori solidi favorendo l'immunosoppressione tumorale. Questo processo biologico è mediato dalle ectonucleotidasi CD39, che converte l'ATP in ADP/AMP, e CD73, che degrada l'AMP in adenosina. Uno studio ha evidenziato che l'adenosina induce nei TAM l'espressione di CD39 e CD73, promuovendo l'evasione immunitaria del tumore. Inoltre, è stato riscontrato che i recettori dell'adenosina (A1R, A2AR, A2BR e A3R)

percepiscono l'adenosina guidando la crescita, la sopravvivenza, la metastatizzazione e l'immunosoppressione tumorale. Report scientifici indicano che il sistema CD39/CD73 e i recettori dell'adenosina sono prevalentemente indotti e regolati da HIF1 α . Inoltre, è stato riportato che A2AR e A2BR sono espressi sui macrofagi e, se stimolati dall'adenosina, inducono la polarizzazione dei TAM in senso M2. Parallelamente, la deplezione di A2AR sulle cellule mieloidi, in particolare sui macrofagi, rallenta la crescita del melanoma e riduce le metastasi alleviando la soppressione esercitata sulle cellule T e NK. Studi recenti hanno rivelato che le ectonucleotidasi, i recettori dell'adenosina e la via adenosinergica costituiscono potenziali bersagli per potenziare l'immunità antitumorale, il che accelererà la scoperta di nuovi farmaci in questo ambito¹⁹.

La prostaglandina E2 (PGE2), un lipide prostanoide, è associata alla progressione tumorale ed è sintetizzata dalla ciclossigenasi tumorale per mediare l'evasione immunitaria. Diverse evidenze suggeriscono che la PGE2 induca la polarizzazione M2 nei macrofagi attraverso la via della proteina di legame all'elemento di risposta al cAMP (CREB). Inoltre, l'espressione di PD-L1 nei TAM può essere regolata dai livelli di PGE2. Recentemente, uno studio ha chiarito che la PGE2 modula il potenziale di membrana mitocondriale per regolare l'espressione dei geni M2 nel nucleo. Pertanto, la PGE2 di derivazione tumorale polarizza i TAM attraverso il segnalamento del cAMP e del mitocondrio¹⁹.

Gli acidi grassi risultano arricchiti nel TME e sono prevalentemente derivati dalle cellule tumorali. Gli acidi grassi a catena lunga, come l'oleato, vengono captati tramite CD36/204, facilitano la respirazione mitocondriale nei TAM e polarizzano i TAM in senso immunosoppressivo attraverso il segnalamento mTORC. Di conseguenza, i metaboliti lipidici tumorali orchestrano il fenotipo dei TAM, e ciò potrebbe spiegare perché un TME ricco di gocce lipidiche sia associato a un maggiore infiltramento di TAM. Tuttavia, i ricercatori hanno dimostrato che gli acidi grassi liberi, in particolare l'acido stearico, promuovono le funzioni infiammatorie dei macrofagi CD11c⁺ tramite l'attivazione del recettore nucleare dell'acido retinoico e l'espressione citosolica delle proteine di legame degli acidi grassi epidermiche (E-FABP) in modelli di obesità. Risulta pertanto necessario

chiarire se le diverse categorie di acidi grassi esercitano effetti differenti sulla polarizzazione dei TAM¹⁹.

L'acido retinoico (RA) è un metabolita della vitamina A con un ruolo consolidato nello sviluppo organico, nella terapia oncologica e nell'omeostasi immunitaria. In vitro, le cellule di carcinoma squamocellulare della testa e del collo trattate con RA non riescono ad attivare i macrofagi a causa della ridotta secrezione di VEGF e IL-8. Inoltre, l'impiego clinico dell'acido tutto-trans-retinoico (ATRA) annulla il fenotipo pro-tumorigenico dei TAM nel carcinoma prostatico sopprimendo l'attivazione di NF- κ B p50 e riduce le metastasi dell'osteosarcoma sottoregolando la secrezione della metalloproteinasi della matrice 12 (MMP12) da parte dei TAM di tipo M2. Inoltre, l'ATRA potrebbe prevenire l'esordio e la staminalità dell'osteosarcoma inibendo i TAM M2-like. Tuttavia, è stato riscontrato che il recettore orfano correlato all'acido retinoico (RORC1/ROR γ), uno dei recettori retinoidi nucleari, previene l'apoptosi delle cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSC) e promuove il differenziamento dei TAM M2 nel TME. Uno studio recente ha inoltre indicato che l'RA derivato dalle cellule tumorali promuove i TAM e sopprime il differenziamento dei monociti in cellule dendritiche immunostimolanti. In combinazione con il meccanismo dell'RA nel trattamento della leucemia promielocitica acuta e il concetto di terapia di differenziamento, l'RA derivato dalle cellule tumorali sembra agire prevalentemente come un immunosoppressore che media la formazione dei TAM nel TME¹⁹.

Sono stati indagati gli effetti di altri metaboliti derivati dalle cellule tumorali sui TAM. I chetoacidi a catena ramificata, escreti dalle cellule di glioblastoma tramite il trasportatore dei monocarbossilati 1 (MCT1), vengono captati dai TAM e riutilizzati per sintetizzare amminoacidi a catena ramificata, riducendo la fagocitosi da parte dei TAM e mediando l'immunosoppressione tumorale. Inoltre, un recente studio ha rivelato che la chinurenina derivata dalle cellule di glioblastoma attiva il recettore degli idrocarburi arilici (AHR) nei TAM, modulando il reclutamento dei TAM e la disfunzione dei linfociti T. Sempre nel contesto del glioblastoma, i ricercatori hanno scoperto che la periostina (POSTN) secreta dalle cellule staminali del glioma (GSC) recluta macrofagi derivati dai

monociti del sangue periferico attraverso l'integrina $\alpha v \beta 3$ per indurre un fenotipo M2; il silenziamento (knockdown) di POSTN nelle GSC inibisce la crescita tumorale. Un lavoro ha evidenziato che la versican derivata dalle cellule tumorali della vescica guida la metastatizzazione polmonare in modo TAM-dipendente; tuttavia, il meccanismo alla base dell'espressione di CCL2 nei TAM mediata dalla versican richiede ulteriori indagini. Un altro studio recente ha riportato che la proteina sonic hedgehog derivata dalle cellule tumorali innesca il segnalamento hedgehog nei TAM per la polarizzazione M2 e ostacola il reclutamento dei linfociti T CD8+ bloccando la produzione di CXCL9 e CXCL10 da parte dei TAM, un processo mediato dal fattore Kruppel-simile 4 (Klf4)¹⁹.

Allo stesso tempo, tuttavia, alcuni metaboliti tumorali possono ridurre i TAM inducendo un'attività antitumorale. I livelli di glicoproteina ricca di istidina (HRG) risultano ridotti nel TME; aumentando i livelli tumorali tramite strategie genetiche di gain-of-function, i ricercatori hanno osservato che l'HRG derivata da queste cellule tumorali inibisce la crescita tumorale e le metastasi inducendo la polarizzazione macrofagica e la normalizzazione dei vasi mediante la sottoregolazione del fattore di crescita placentare (PIGF), suggerendo che l'HRG contribuisca a indirizzare i TAM verso un fenotipo di polarizzazione ad azione antitumorale¹⁹.

Tabella 6. Principali metaboliti coinvolti nell'attivazione dei macrofagi M2

Metabolita / Molecola	Origine /meccanismo nel TME	Effetto / ruolo sui macrofagi e sulla progressione tumorale
Acido lattico	Prodotto dalla glicolisi aerobica (effetto Warburg) e rilasciato via MCT4	• Inibisce la secrezione di TNF nei monociti • Induce polarizzazione M2 e secrezione di VEGF (mediato da HIF1α) • Attiva geni M2 via lattilazione istonica
Acidosi extracellulare	Generata dal metabolismo glicolitico del tumore	• Percepita da GPCR sui TAM → esprime il repressore ICER • Potenzia il fenotipo pro-

(Ioni H⁺ e acidi organici)		tumorale/M2 (es. nel melanoma)
α-Chetoglutarato	Derivato dal catabolismo della glutammina nel ciclo TCA	• Promuove l'attivazione M2-like tramite ossidazione degli acidi grassi (FAO) e riprogrammazione epigenetica Jmjd3-dipendente
Succinato	Accumulato per inibizione/mutazione di SDH o via shunt del GABA	• Captato via SUCNR1 sui TAM → attiva via SUCNR1/PI3K/HIF1α • Promuove la polarizzazione pro-tumorale e la metastatizzazione
ATP / Adenosina	ATP extracellulare degradato ad adenosina dalle ectonucleotidasi CD39 e CD73	• L'adenosina lega i recettori A2AR/A2BR sui macrofagi • Induce la polarizzazione M2, l'evasione immunitaria e la crescita tumorale
Prostaglandina E2 (PGE2)	Sintetizzata dalla ciclossigenasi (COX) tumorale	• Induce la polarizzazione M2 via segnalamento cAMP/CREB e modulazione mitocondriale • Regola l'espressione di PD-L1 nei TAM
Acidi grassi a catena lunga (es. Oleato)	Secreti dal tumore e captati via CD36/204	• Aumentano la respirazione mitocondriale nei TAM • Promuovono la polarizzazione immunosoppressiva via segnalamento mTORC
Acido Retinoico (RA) / ATRA	Metabolita della vitamina A	• RA tumorale: Promuove i TAM M2, sopprime le cellule dendritiche (immunosoppressore) • ATRA (Terapeutico): Inibisce i TAM M2 (sopprime NF-κB p50 e MMP12)

Chetoacidi a catena ramificata	Escreti via MCT1 (es. glioblastoma)	• Captati dai TAM per sintetizzare amminoacidi ramificati • Riducono la fagocitosi e mediano l'immunosoppressione
Chinurenina	Derivata dal metabolismo del triptofano (es. glioblastoma)	• Attiva il recettore AHR nei TAM • Modula il reclutamento dei TAM e la disfunzione dei linfociti T
Periostina (POSTN)	Secreta dalle cellule staminali del glioma (GSC)	• Recluta monociti via integrina $\alpha v \beta 3$ e li istruisce al fenotipo M2
Versican	Secreta dalle cellule tumorali della vescica	• Guida la metastatizzazione polmonare tramite l'espressione di CCL2 nei TAM
Sonic Hedgehog (SHH)	Proteina secreta dalle cellule tumorali	• Innesca la via Hedgehog nei TAM via Klf4 → polarizzazione M2 • Blocca CXCL9/CXCL10 e riduce il reclutamento dei linfociti T CD8+
Glicoproteina ricca di Istidina (HRG)	Molecola con livelli solitamente ridotti nel TME	• Effetto Antitumorale: Ripropone i TAM verso un fenotipo antitumorale (M1-like) • Sottoregola PlGF, normalizza i vasi e inibisce le metastasi

Dai TAM al TME

A loro volta, anche i TAM regolano il TME, ad esempio attraverso citochine e rilascio di vescicole note. Come accennato in precedenza, i tessuti tumorali sono ipossici e le cellule neoplastiche utilizzano prevalentemente la glicolisi aerobica per generare energia. I TAM esercitano quindi un impatto diretto sul metabolismo delle cellule tumorali. Uno studio recente ha riportato che i TAM

rendono le cellule del carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) maggiormente glicolitiche attraverso la secrezione di $\text{TNF-}\alpha$ e promuovono un'ipossia accentuata tramite l'attivazione della proteina chinasi attivata da AMP e di $\text{PGC-1}\alpha$. Inoltre, la deplezione dei TAM aumenta l'infiltrazione dei linfociti T e l'espressione di PD-L1 nelle cellule tumorali, facilitando il blocco di PD-L1 nel NSCLC. Un altro studio recente ha suggerito che l'aumento della glicolisi aerobica e la riduzione dell'apoptosi nelle cellule di carcinoma mammario sono mediati da un RNA lungo non codificante stabilizzante $\text{HIF-1}\alpha$ veicolato da vescicole extracellulari derivate dai TAM, il quale risulta sovraregolato dal lattato nel TME. Un ulteriore report recente, focalizzato sul carcinoma renale a cellule chiare — fortemente dipendente dalla glutammina —, ha evidenziato che i TAM privati di glutammina secernono IL-23 per ridurre la sopravvivenza e potenziare la funzione immunosoppressiva delle cellule Treg. Oltre all'alterazione del metabolismo delle cellule tumorali mediata da citochine e vescicole derivate dai TAM, i metaboliti prodotti dai TAM regolano ampiamente il microambiente immunitario tumorale, la metastatizzazione, l'angiogenesi e la farmacoresistenza¹⁹.

1.4.4 Autofagia e TME

L'autofagia è un processo catabolico evolutivamente conservato attraverso il quale la cellula degrada proteine danneggiate, materiale citoplasmatico e organelli cellulari. I prodotti di questa degradazione costituiscono una fonte energetica alternativa che consente di mantenere l'omeostasi e la vitalità cellulare²⁰. I componenti così recuperati possono inoltre essere riciclati per la biosintesi e per la produzione di energia²¹.

L'autofagia è un processo fondamentale in quanto permette di eliminare le specie reattive dell'ossigeno che potrebbero altrimenti causare mutazioni del DNA e determinare perdita del controllo sul rinnovamento cellulare²¹. Nelle cellule sane, la sua attivazione previene infatti le alterazioni del DNA e l'instabilità genomica che possono portare la cellula verso una trasformazione neoplastica²⁰.

Il processo, costituito da più fasi, inizia con la formazione di una membrana di isolamento detta fagoforo²¹. Questa fase di nucleazione dipende principalmente dai complessi centrali Beclin-1 (BECN1)– VPS15 ²⁰; nelle cellule di

mammifero la fosfatidilinositolo-3-chinasi di classe III (PI3KC3/VPS34) e il suo partner di legame BECLIN-1 sono responsabili della formazione del fagoforo, e l'attivazione di questi complessi genera un pool di fosfatidilinositolo-3-fosfato (PI3P²¹).

L'induzione dell'autofagia richiede l'attivazione del complesso della chinasi ULK1, che comprende FIP200, ATG13 e ATG101²¹. Durante l'elongazione del fagoforo, processo che coinvolge diverse proteine ATG, porzioni di citoplasma vengono inglobate e la proteina LC3-I viene lipidata a LC3-II²⁰. Alla base di questo passaggio vi sono due sistemi di coniugazione ubiquitina-simili: il primo genera il complesso ATG12-ATG5-ATG16L attraverso ATG7 e ATG10, mentre il secondo, agendo da ligasi E3-simile, promuove il legame di LC3 alla fosfatidiletanolamina. Le vescicole ATG9-positive del reticolo endoplasmatico partecipano alla nucleazione dell'autofagosoma, mentre le membrane arricchite di PI3P reclutano proteine effettrici come WIPI-2 e DFCP1; WIPI-2, in particolare, favorisce l'allungamento del fagoforo e il reclutamento dei due sistemi di coniugazione²¹.

Il fagoforo viene quindi chiuso e maturato per azione di LC3-II e di BECN1, con formazione dell'autofagosoma, una vescicola a doppia membrana che sequestra il materiale da degradare^{20,21}. Prima della chiusura, le proteine ATG si distaccano dalla membrana, lasciando all'interno la forma lipidata di LC3²¹. Infine, la fusione dell'autofagosoma con il lisosoma espone il contenuto del vacuolo autofagico alle idrolasi lisosomiali, che ne completano la degradazione^{20,21}.

L'autofagia è stata a lungo considerata un processo di degradazione di aspecifico, ma in condizioni di stress può essere altamente selettiva. Tale selettività è garantita da recettori del cargo quali SQSTM1/p62, NBR1, OPTN e CALCOCO2/NDP52, capaci di legare le proteine ubiquitinate e di indirizzarle al fagoforo per la degradazione lisosomiale; le proteine dotate di regione di interazione con LC3 riconoscono infatti LC3 e fungono da recettori per strutture definite, e p62 accelera la degradazione delle proteine mal ripiegate e ubiquitinate. p62 è però, al tempo stesso, un substrato dell'autofagia: viene degradato negli autofagosomi in seguito alla loro fusione con i lisosomi, e tende quindi ad accumularsi quando il flusso autofagico è bloccato²⁰.

Proprio per questa ragione LC3B e SQSTM1 rappresentano le proteine di riferimento per la misurazione dell'autofagia²¹.

Come detto, l'induzione dell'autofagia promuove la sopravvivenza cellulare come risposta adattativa a stress multipli, tra cui l'ipossia. In condizioni di ipossia l'autofagia è infatti attivata da sensori che rilevano la bassa tensione di ossigeno, le proteine mal ripiegate e la deplezione energetica, e sono state descritte tre vie principali di attivazione:

- La prima è quella della bassa pressione di ossigeno: il 50-60% dei tumori cresce in condizioni ipossiche, e l'autofagia indotta dall'ipossia dipende principalmente dai fattori inducibili dall'ipossia (HIF). In questo contesto, l'espressione HIF-1 α -dipendente delle proteine BH3-only BNIP3 e BNIP3L disgrega il complesso BECN1/Bcl-2, liberando BECN1 e inducendo l'autofagia come risposta adattativa di sopravvivenza durante l'ipossia prolungata²⁰.
- La seconda via è quella dell'UPR: la chinasi PERK riconosce le proteine mal ripiegate e induce ATF4, che aumenta l'espressione dei geni autofagici essenziali LC3 e ATG5²⁰;
- La terza è la deplezione energetica: l'aumento del rapporto ADP:ATP attiva AMPK, che a sua volta innesca l'autofagia sia direttamente sia indirettamente, inibendo mTOR²⁰.

Nei tumori consolidati il ruolo dell'autofagia resta controverso: oltre a modulare la morte delle cellule tumorali, l'autofagia ne preserva l'omeostasi di fronte a diversi stress. Il consenso attuale è che l'autofagia sopprima l'iniziazione tumorale ma promuova la sopravvivenza dei tumori già stabiliti²⁰.

Coerentemente, l'autofagia risulta frequentemente aumentata nei tumori consolidati, che mostrano una vera e propria "dipendenza dall'autofagia" necessaria a mantenere il bilancio energetico; i pazienti con un indice autofagico elevato rispondono meno al trattamento e hanno una sopravvivenza più breve rispetto a quelli con indice basso²⁰.

L'autofagia partecipa alla regolazione di numerose componenti del sistema immunitario, tra cui cellule Natural killer, cellule presentanti l'antigene, macrofagi, cellule dendritiche, linfociti T citotossici CD8⁺ e linfociti B, modulandone omeostasi, sopravvivenza, attivazione, proliferazione e differenziamento. È coinvolta nella degranolazione dei mastociti, nell'omeostasi dei macrofagi, nel reclutamento dei monociti e nel loro differenziamento in macrofagi, nella presentazione dell'antigene e quindi nel priming dei linfociti T effettori, oltre che nello sviluppo e nella sopravvivenza dei linfociti T stessi. Citochine e anticorpi influenzano a loro volta la funzione autofagica: TGF- β , IFN- γ , IL-1, IL-2 e IL-12 sono induttori dell'autofagia, mentre IL-4, IL-10 e IL-13 ne sono inibitori²¹.

Nel microambiente ipossico, l'attivazione dell'autofagia nelle cellule tumorali si configura come un meccanismo intrinseco di resistenza all'attacco immunitario²⁰. Ne sono esempi la regolazione dei livelli di pSTAT3, che rende le cellule tumorali meno sensibili alla lisi mediata dai CTL, la degradazione autofagica del granzima B di origine NK, la degradazione della connessina 43 giunzionale con destabilizzazione della sinapsi immunologica, e l'induzione del sensore autofagico ITPR1 a valle di HIF-2 α , tutti meccanismi che compromettono l'uccisione della cellula tumorale da parte delle cellule NK

In questo quadro p62 non funge soltanto da indicatore del flusso autofagico. Nelle cellule tumorali in cui l'autofagia è attiva p62 viene degradato, mentre quando l'autofagia è bloccata si accumula e accelera il trasporto di pSTAT3 al sistema ubiquitina-proteasoma per la degradazione selettiva, con conseguente ripristino della sensibilità delle cellule tumorali alla lisi mediata dai CTL. Un ruolo analogo emerge nella degradazione del granzima B di origine NK, il cui livello nelle cellule ipossiche viene ripristinato agendo su p62. L'accumulo di p62 si associa quindi a un fenotipo tumorale più esposto all'attacco immunitario²⁰.

1.4.4.1 Autofagia e medulloblastoma

Il ruolo dell'autofagia nell'aggressività e nella tumorigenesi del medulloblastoma è un processo molto complesso²¹. In linee cellulari appartenenti a tre distinti sottogruppi di medulloblastoma, il blocco dell'autofagia non ha modificato in modo significativo la crescita ancoraggio-dipendente né quella

ancoraggio-indipendente, ma ha ridotto il potenziale invasivo in tutte e tre le linee, suggerendo un possibile impiego terapeutico degli inibitori dell'autofagia nel medulloblastoma²¹. Nei sottogruppi 3 e SHH-attivati, l'inibizione dell'autofagia mediante shRNA diretti contro ATG5 ha alterato il potenziale invasivo senza influenzare la crescita ancoraggio-dipendente, e in entrambi i sottogruppi la compromissione dell'autofagia ha ridotto la capacità metastatica. Ciò suggerisce che nel MB l'autofagia sia coinvolta nella degradazione di componenti cellulari fondamentali, in particolare dei complessi di adesione focale legati alla motilità cellulare, e che il suo blocco possa rappresentare una strategia preventiva nei confronti delle metastasi²¹.

Uno studio pilota multi-omico basato sulla spettrometria di massa ha individuato, nel liquido cerebrospinale di pazienti con medulloblastoma recidivante, una firma molecolare indicativa di ipossia mediata dall'autofagia. L'induzione dell'autofagia in condizioni ipossiche ha favorito la formazione di macrofagi M2, con uno shift metabolico che ha facilitato lo sviluppo di farmacoresistenza e di staminalità nelle cellule di medulloblastoma. I dati di metabolomica inoltre hanno mostrato una correlazione tra ipossia associata al medulloblastoma e aumento di triptofano (TRP), metionina, serina e lisina. Queste risposte metaboliche adattative sono attivate, in conseguenza dell'ipossia, dall'autofagia e dalla segnalazione di mTOR. Il TRP, il metabolita indotto in modo più marcato, risulta anormalmente elevato nella cachessia associata al medulloblastoma- Anche la formazione di 12,13-diHOME e l'aumento della beta-ossidazione contribuiscono allo shift metabolico che, tramite l'autofagia, alimenta un circolo vizioso di farmacoresistenza e staminalità. L'autofagia indotta dall'ipossia risulta essere quindi un elemento critico nella patogenesi e di conseguenza nelle strategie terapeutiche del medulloblastoma²¹.

I geni regolatori dell'autofagia sono modulati da modificazioni epigenetiche sia a livello trascrizionale sia traduzionale. L'autofagia indotta dall'ipossia si accompagna nel medulloblastoma a iperespressione di HIF-1 α rispetto al cervelletto normale, la sua sottoregolazione determina un aumento della metilazione del promotore di ATG16L1 e una riduzione di quella del promotore di EPAS1, con conseguente riduzione della proliferazione. L'iperespressione o la

modificazione epigenetica di mTOR influenza, inoltre, i livelli di n-MYC e POU5F1, aumentati nel medulloblastoma, a indicare che il blocco di mTOR è efficace nel prevenire la tumorigenesi per via epigenetica²¹.

Un ruolo importante è svolto dai microRNA. Sia miR-204, ridotto in quasi tutti i tumori SHH e in circa metà dei tumori Group 3 e Group 4, sia miR-30a, sottoregolato in tutti e quattro i sottogruppi, esercitano un effetto oncosoppressore quando ripristinati, bloccando invasione, crescita e tumorigenicità attraverso l'inibizione dell'autofagia. I bersagli sono però diversi: miR-204 riduce il flusso di LC3B con accumulo di p62/SQSTM1, quadro indicativo di blocco autofagico, mentre miR-30a sottoregola BECLIN-1 e ATG5, bloccando sia l'autofagia basale sia quella indotta da deprivazione²¹.

MBRA1 è fortemente iperespressa nelle cellule staminali di medulloblastoma del Gruppo 3 e la sua espressione dipende dai livelli di c-MYC e MIZ-1; il suo blocco agisce sia sull'autofagia sia sulla via di STAT3, inducendo differenziamento, riduzione della migrazione e perdita del potenziale staminale. Nel Gruppo 3, la deplezione di AMBRA1 si accompagna a una riduzione della trascrizione di c-MYC dipendente da STAT3 e a un blocco della segnalazione di STAT3 mediato dalla stabilizzazione di SOCS3, a indicare che il potenziale staminale e la sopravvivenza cellulare nel MB dipendono dall'attivazione di AMBRA1²¹.

Infine, mTORC1 è stato proposto come bersaglio molecolare per i MB del sottogruppo SHH, per il suo ruolo nella via canonica SHH; l'asse mTORC1/4E-BP1/IGF-II rappresenta un bersaglio trascrizionale a valle di SHH, critico nella patogenesi e nella terapia del medulloblastoma²¹.

Il microambiente tumorale è il risultato di complesse interazioni tra numerosi componenti cellulari. Vi partecipano anche diversi elementi quali i fibroblasti associati al cancro, gli adipociti, i mastociti, i linfociti T e B, e altre popolazioni cellulari che vengono solo menzionati poiché non costituiscono oggetto di studio del presente lavoro di tesi.

2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

2.1 Cultural gap e razionale dello studio

Negli ultimi due decenni la comprensione biologica del medulloblastoma è profondamente cambiata. Il progressivo superamento di una classificazione esclusivamente morfologica ha condotto all'identificazione di gruppi molecolari biologicamente distinti e, successivamente, alla loro integrazione nella classificazione WHO dei tumori del sistema nervoso centrale.

La letteratura ha inoltre chiarito che morfologia e biologia molecolare non costituiscono sistemi classificativi indipendenti. Esistono associazioni consolidate tra specifici pattern istologici e gruppi gruppi molecolari.

Questa evoluzione ha prodotto una conoscenza estremamente dettagliata delle caratteristiche intrinseche della cellula tumorale, rimane invece meno definito il ruolo del microambiente immunitario tumorale con le sue varie componenti considerate insieme (*tumor immune microenvironment*, TIME) e, soprattutto, il modo in cui esso si inserisce nella relazione tra fenotipo istologico, gruppo molecolare e comportamento clinico.

La letteratura disponibile sul microambiente del medulloblastoma ha evidenziato la presenza di differenti popolazioni immunitarie e stromali e ha proposto numerosi meccanismi attraverso i quali il tumore può modulare la risposta immune; tuttavia, una parte rilevante delle conoscenze attuali deriva da studi sperimentali, modelli cellulari, analisi molecolari o indagini concentrate su singole componenti del microambiente.

Dal gruppo molecolare al fenotipo immunitario

Un primo gap conoscitivo riguarda la relazione tra identità molecolare del tumore e organizzazione del suo microambiente immunitario. La classificazione WHO definisce in maniera sempre più precisa l'identità intrinseca della cellula neoplastica, ma non include parametri relativi alla composizione del TIME. La presenza di gruppi e sottogruppi molecolari differenti suggerisce che tumori originati da differenti precursori cellulari e sostenuti da pathway oncogenici

differenti possano generare microambienti immunologici differenti. Tuttavia, questa relazione non è ancora incorporata nella classificazione diagnostica corrente e il suo eventuale significato clinico rimane incompletamente definito.

In particolare, rimane da chiarire se le differenze immunologiche rappresentino semplicemente un epifenomeno della diversa biologia molecolare oppure costituiscano un ulteriore livello di eterogeneità biologica, potenzialmente capace di spiegare almeno in parte la variabilità clinica osservabile tra i gruppi. Il primo contributo del presente studio consiste pertanto nell'analizzare, nella medesima coorte, il rapporto tra pattern morfologico, gruppo molecolare e caratteristiche quantitative del microambiente.

Il gap relativo alla componente NKG2A-positiva

Le cellule NK rappresentano una componente importante dell'immunità antitumorale e l'asse inibitorio NKG2A/HLA-E costituisce un potenziale meccanismo di immunoevasione. Tuttavia, nel medulloblastoma la caratterizzazione tissutale della componente NKG2A-positiva e delle sue relazioni con morfologia, gruppo molecolare e comportamento clinico rimane limitata.

Il nostro studio introduce quindi una valutazione quantitativa delle cellule NKG2A-positive, distinguendone inoltre la localizzazione intratumorale e perivascolare. Quest'ultimo elemento assume particolare rilevanza: il semplice numero complessivo di cellule immunitarie presenti nel tumore non descrive necessariamente la loro organizzazione spaziale. Una popolazione prevalentemente confinata agli spazi perivascolari e una popolazione capace di infiltrare diffusamente il parenchima neoplastico possono infatti rappresentare condizioni biologicamente differenti.

Il gap relativo ai macrofagi CD163-positivi

Un secondo elemento riguarda i macrofagi TAM. La letteratura attribuisce ai TAM un ruolo rilevante nella modulazione della risposta immunitaria, dell'angiogenesi, dell'invasività e della progressione neoplastica. Nel medulloblastoma, tuttavia, rimangono da chiarire sia la distribuzione dei macrofagi nei diversi contesti biologici sia il loro rapporto con le caratteristiche proliferanti e molecolari della neoplasia.

Nel presente studio CD163 è stato quindi utilizzato per quantificare la componente monocito-macrofagica, distinguendo ancora una volta i compartimenti intratumorale e perivascolare. Il dato sperimentale assume interesse perché CD163 non viene considerato isolatamente, ma viene messo in relazione con istotipo, gruppo molecolare, proliferazione, p62 e outcome clinico, collocandolo così all'interno del fenotipo complessivo della neoplasia.

Il collegamento tra autofagia e microambiente

Un terzo gap riguarda l'autofagia. Nella letteratura considerata nella presente tesi, l'autofagia emerge come processo potenzialmente rilevante per invasività, adattamento all'ipossia, staminalità, farmacoresistenza e interazione con la risposta immunitaria. Studi sperimentali hanno mostrato che la sua modulazione può modificare il potenziale invasivo e metastatico delle cellule di medulloblastoma; sono state inoltre proposte inoltre interazioni tra ipossia, autofagia e polarizzazione macrofagica.

Queste osservazioni derivano tuttavia prevalentemente da modelli sperimentali e analisi funzionali, mentre rimane meno esplorata la possibilità di riconoscere nel tessuto tumorale umano relazioni quantitative tra marcatori associati all'autofagia e componenti cellulari del microambiente. Da questo punto di vista, la valutazione immunoistochimica di p62/SQSTM1 costituisce uno degli elementi peculiari del presente studio.

La correlazione osservata nella nostra casistica tra p62 e CD163, sia nel compartimento intratumorale sia in quello perivascolare, fornisce un collegamento tissutale tra due fenomeni che la letteratura biologica suggerisce possano interagire, ma che sono più raramente valutati congiuntamente in una casistica clinico-patologica di medulloblastoma

Probabilmente il principale limite dell'attuale stato dell'arte è concettuale: la maggior parte dei biomarcatori viene studiata singolarmente: proliferazione, infiltrato macrofagico, popolazioni linfocitarie, checkpoint immunitari, pathway metabolici e autofagia. Un tumore, tuttavia, non è costituito dalla semplice somma di singoli parametri.

Il presente studio esplora quindi l'ipotesi che la combinazione di caratteristiche biologiche differenti possa contenere un'informazione non immediatamente evidente considerando separatamente ciascun marcatore. Da questo razionale nasce l'analisi esplorativa dello score costituito da NKG2A intratumorale, p62 e CD163 perivascolare. La differenza osservata nella frequenza di progressione/recidiva tra i pazienti con score 0–1 e quelli con score 2–3 suggerisce l'esistenza potenziale di un fenotipo microambientale composito associato a un differente comportamento clinico.

Il contributo del presente studio

Il gap che il presente lavoro cerca di colmare può quindi essere sintetizzato come il passaggio da una conoscenza prevalentemente segmentata del medulloblastoma a una sua lettura integrata. La letteratura ha definito con grande dettaglio la morfologia del tumore, i suoi gruppi molecolari e numerosi meccanismi del microambiente immunitario. Ciò che rimane meno esplorato è la loro osservazione simultanea all'interno della stessa serie di pazienti e il loro rapporto con il comportamento clinico.

In questa prospettiva, i risultati ottenuti suggeriscono che il microambiente non debba essere considerato un elemento accessorio rispetto alla classificazione del medulloblastoma, ma un ulteriore livello della sua eterogeneità biologica. Le correlazioni osservate tra p62 e infiltrato CD163-positivo e il segnale prodotto dalla combinazione NKG2A–p62–CD163 costituiscono elementi preliminari a sostegno di questa interpretazione.

Il passaggio successivo sarà verificare tali osservazioni in casistiche indipendenti e più ampie, mediante una caratterizzazione molecolare più granulare e tecniche capaci di definire contemporaneamente identità, localizzazione e stato funzionale delle popolazioni cellulari, quali immunofluorescenza multiplex e metodiche di spatial profiling.

2.2 Obiettivi dello studio

Il presente lavoro di tesi si propone di caratterizzare il profilo clinico-biologico del medulloblastoma pediatrico, definendo le correlazioni tra

caratteristiche morfologiche, assetto molecolare, composizione del microambiente immunitario tumorale e decorso clinico.

In primo luogo, lo studio si propone di effettuare una riclassificazione istologica e molecolare dei campioni in esame, volta a integrare i due sistemi classificativi e a valutare le correlazioni tra i sottotipi morfologici classicamente descritti e i gruppi molecolari stabiliti dalla classificazione WHO 2021 dei tumori del sistema nervoso centrale.

In secondo luogo, lo studio mira a caratterizzare quantitativamente e topograficamente alcune componenti del microambiente tumorale, con particolare attenzione alle cellule NKG2A-positive e ai macrofagi CD163-positivi, distinguendone la distribuzione intratumorale e perivascolare, e a valutare l'espressione di p62/SQSTM1 quale marcatore tissutale associato alla regolazione dell'autofagia.

Un ulteriore obiettivo è verificare le relazioni tra tali parametri immunoistochimici e le caratteristiche istologiche e molecolari del tumore, nonché esplorare le interazioni tra i diversi componenti del microambiente, con particolare attenzione al rapporto tra espressione di p62 e infiltrato CD163-positivo.

Infine, i parametri istologici, molecolari e immunologici vengono correlati con i principali dati clinici e prognostici disponibili, con particolare riferimento a radicalità chirurgica, presenza di metastasi e progressione/recidiva di malattia. In tale contesto viene inoltre esplorata, con finalità generatrice di ipotesi, la possibilità che la combinazione di NKG2A intratumorale, p62 e CD163 perivascolare identifichi un fenotipo microambientale composito associato a un differente comportamento clinico.

3. MATERIALI E METODI

Disegno dello studio e popolazione

È stato condotto uno studio osservazionale, retrospettivo, monocentrico, a carattere descrittivo e analitico, su una serie consecutiva di 54 pazienti pediatrici con diagnosi di medulloblastoma operati presso l'Istituto Giannina Gaslini di Genova nel periodo tra il 2000 e il 2025. Il disegno non prevedeva interventi sperimentali sui pazienti né modifiche ai percorsi diagnostico-terapeutici. L'unità di analisi era

il singolo paziente; le osservazioni istologiche, molecolari e cliniche sono state ricondotte a un record individuale pseudonimizzato.

I casi sono stati identificati mediante interrogazione del Laboratory Information System (LIS) della U.O.C. Anatomia Patologica. I dati clinici, terapeutici e di follow-up sono stati estratti dal gestionale della U.O.S.D. di Neuro-Oncologia e integrati con i dati anatomopatologici.

I preparati istologici sono stati esaminati da due patologi esperti. La revisione morfologica ha consentito l'attribuzione dell'istotipo secondo la classificazione WHO dei tumori del sistema nervoso centrale (2021): classico, desmoplastico/nodulare, a nodularità estesa e a grandi cellule/anaplastico. Le categorie istologiche e molecolari sono state mantenute distinte, pur analizzandone la sovrapposizione.

Indagini istologiche e immunoistochimiche

I preparati istologici sono stati colorati con ematossilina-eosina per analizzare le caratteristiche istopatologiche di cui sopra. Dai relativi blocchetti di tessuto incluso in paraffina sono state realizzate ulteriori sezioni dello spessore di 2-3 micron su vetrini silanati per l'esecuzione dell'immunoistochimica con i markers sopra elencati, seguendo la procedura standard sotto riportata:

- I vetrini, precedentemente allestiti con sezioni da 1-3 micron dal corrispondente blocchetto in paraffina (e se richiesto con tessuto di controllo), sono stati fatti asciugare in stufa termostata a 37°-40° C per circa due ore;
- Le colorazioni immunoistochimiche sono state eseguite su piattaforma chiusa con strumento automatizzato (BenchMark ULTRA Roche), utilizzando gli usuali sistemi di rivelazione (BROWN o RED);
- Per ogni anticorpo esiste un protocollo specifico che contiene tutte le informazioni necessarie alla seduta: sparaffinatura, tempi e modalità di smascheramento (con ph tra 6 e 9 a seconda dell'anticorpo) tempi e temperatura di incubazione dell'anticorpo,

e controcolorazione dei nuclei con ematossilina che deve essere sempre eseguita;

- Infine, i vetrini sono stati sciacquati manualmente nel Reaction Buffer diluito 1:10 con acqua distillata per eliminare l'eccesso di reagenti e successivamente disidratati e montati con film copri oggetto dal montatore automatico SAKURA.

I preparati ottenuti sono stati valutati in microscopia ottica su campo chiaro in doppio cieco.

Le indagini immunoistochimiche sono state eseguite su sezioni di tessuto tumorale con piattaforma automatizzata Ventana/Roche BenchMark XT. Le valutazioni comprendevano l'indice proliferativo Ki67, l'espressione di p53 e β -catenina (distinguendo la localizzazione citoplasmatica da quella nucleare), nonché NKG2A, p62/SQSTM1 e CD163. È importante sottolineare che l'indice mitotico è stato espresso come numero di mitosi per 10 campi ad alto ingrandimento (HPF), per NKG2A e CD163 sono stati registrati separatamente i compartimenti intratumorale e perivascolare.

Nella Tabella 7 sono riportati i dati tecnici relativi a ciascun marcatore immunoistochimico utilizzato.

Tabella 7. Marcatori immunoistochimici e loro caratteristiche principali

Ki67	Proteina nucleare non istonica espressa nelle fasi G1, S, G2 e M del ciclo cellulare, viene rapidamente catabolizzata alla fine della fase M e non è rilevabile nelle fasi G0 e G1-precocce. È un marcatore di proliferazione cellulare; all'immunoistochimica presenta positività nucleare. L'espressione di Ki67 è proporzionale alla conta mitotica, ma rivela più cellule tumorali proliferanti rispetto a quest'ultima. La percentuale di cellule positive è solitamente calcolata in regioni hot-spot con la maggiore concentrazione di positività. Nei meningiomi è utilizzato per determinare il grado secondo WHO 2021, ed è associato al rischio di ricorrenza. Nella presente analisi è stato valutato con il criterio di nuclei neoplastici positivi su almeno 1000 cellule
-------------	---

	neoplastiche, ed espresso in percentuale, considerando aumentato un valore maggiore del 4%.
NKG2A	Recettore inibitorio eterodimerico espresso sulla superficie cellulare delle cellule NK (proteina transmembrana a singolo passaggio di tipo II), il cui ligando è rappresentato da HLA-E. Una volta attivato limita la risposta effettrice delle cellule NK; un'aumentata espressione di HLA-E è stata osservata in un ampio spettro di tumori. La positività è di membrana. Nella presente analisi è stato valutato come numero di cellule NK intratumorali e perivascolari positive/10 HPF.
CD163	Recettore scavenger ad alta affinità per i complessi emoglobina-aptoglobina, e, in assenza di aptoglobina, con un'affinità inferiore, per l'emoglobina da sola. È un marcatore delle cellule della linea monocito-macrofagica, soprattutto delle cellule polarizzate in senso M2. Condizioni di infiammazione acuta o cronica portano al rilascio di una forma solubile di CD163 dalla membrana macrofagica. Positività di membrana. Nella presente analisi è stato valutato come numero di macrofagi intratumorali e perivascolari positivi/10 HPF.
P62	Proteina di impalcatura multifunzionale e recettore autofagico selettivo, gioca un ruolo chiave nel traffico proteico intracellulare e nel turnover degli aggregati proteici ubiquitinati attraverso la via autolisosomiale. Viene continuamente degradata durante il processo autofagico fisiologico; pertanto, un suo accumulo è indice di blocco o compromissione del flusso autofagico. All'immunoistochimica presenta tipicamente una positività citoplasmatica, espressa come numero di elementi positivi per 10 HPF.
β-Catenina (CTNNB1)	Proteina di adesione giunzionale ed effettore chiave della via di trasduzione del segnale WNT/β-catenina. In condizioni fisiologiche, risiede sulla membrana cellulare ancorata ai complessi cadherina-catenina, mentre la quota citoplasmatica libera viene rapidamente fosforilata e degradata dal complesso di distruzione (APC/Axin/GSK3β). In presenza di mutazioni attivanti del gene <i>CTNNB1</i> o di alterazioni

	nei geni del complesso di degradazione (es. <i>APC</i>), la proteina sfugge alla degradazione, accumulandosi nel citoplasma e traslocando nel nucleo, dove agisce come co-attivatore trascrizionale di oncogeni. All'immunoistochimica presenta fisiologicamente positività membranosa/citoplasmatica, mentre la positività nucleare (diffusa o a chiazze) costituisce il reperto patologico patognomonico di attivazione dell'asse WNT e quindi identificativo del gruppo molecolare medulloblastoma WNT-attivato.
p53 (TP53)	Proteina oncosoppressore, coordinatrice centrale della risposta al danno al DNA attraverso la regolazione dell'arresto del ciclo cellulare, della riparazione genica, della senescenza e dell'apoptosi. In condizioni fisiologiche wild-type, la proteina p53 presenta un'emivita estremamente breve a causa della rapida degradazione mediata dall'ubiquitina-ligasi MDM2; pertanto, all'immunoistochimica risulta fisiologicamente espressa in modo debole, discontinuo ed eterogeneo in un numero ridotto di nuclei cellulari (pattern <i>wild-type</i>). Mutazioni a carico del gene <i>TP53</i> determinano l'alterazione di questa dinamica, traducendosi in due principali pattern patologici (pattern <i>mutante</i>): l'accumulo di proteina mutata non funzionale con emivita prolungata oppure la completa assenza di proteina. Nella classificazione del medulloblastoma risulta di fondamentale importanza per la caratterizzazione del gruppo SHH-attivato nei suoi sottotipi TP53 mutato e TP53 wild-type.

Nelle immagini che seguono è possibile apprezzare la positività dei marcatori utilizzati nei campioni in esame.

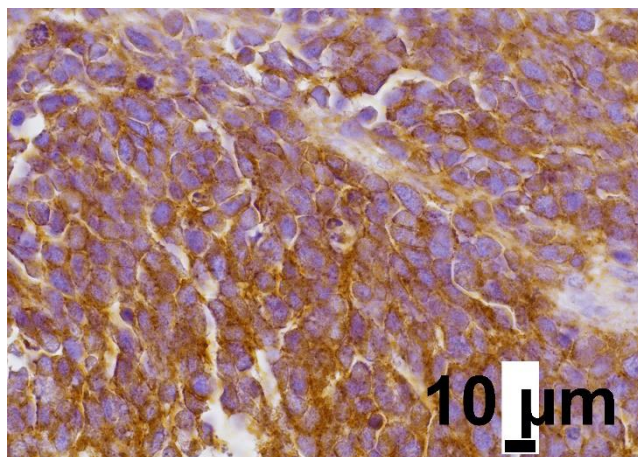


Figura 5. Beta catenina positività citoplasmatica

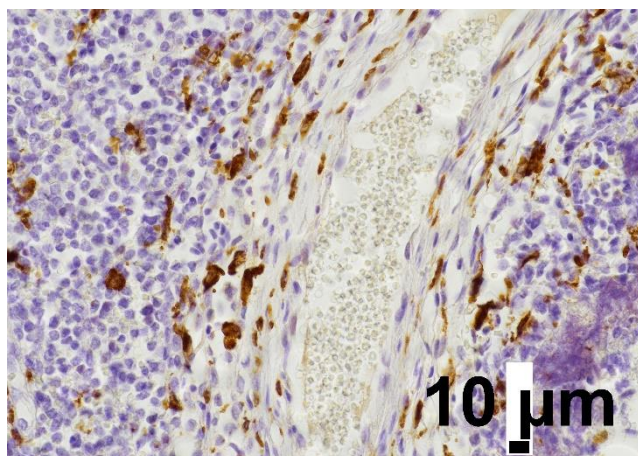


Figura 6. CD163, positività di membrana, disposizione perivascolare

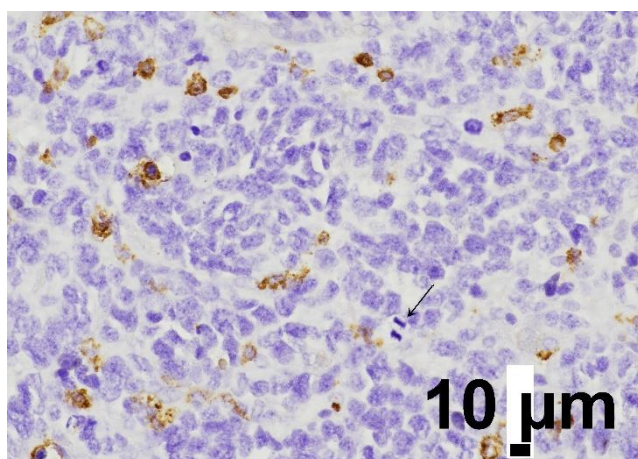


Figura 7. CD 163, positività di membrana, disposizione intratumorale

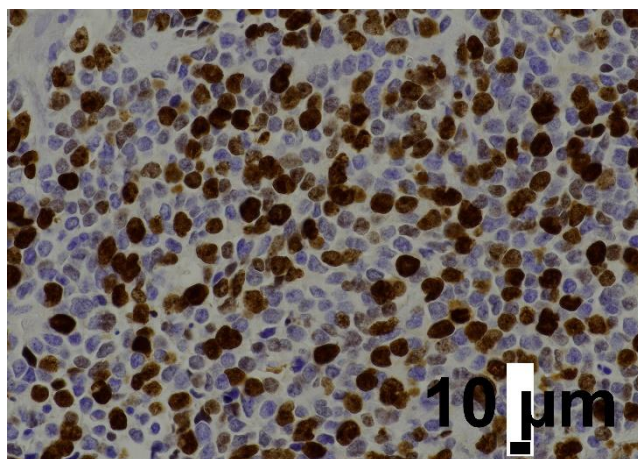


Figura 8. Ki67, positività nucleare

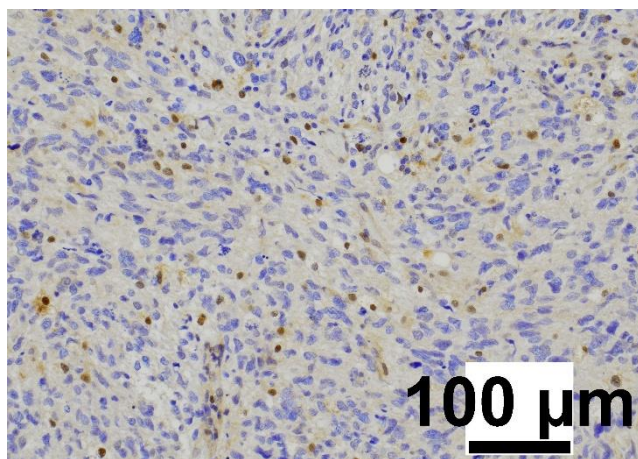


Figura 9. p62, positività citoplasmatica

Riclassificazione molecolare surrogata

Al fine di ottenere una stratificazione diagnostico-prognostica dei casi di medulloblastoma inclusi nello studio, è stato strutturato ed applicato un algoritmo di riclassificazione molecolare surrogata, basato sull'integrazione crociata dei pattern istologici e dei profili immunoistochimici precedentemente elencati.

Tale approccio integrato ha consentito di approssimare la classificazione WHO 2021 dei tumori del sistema nervoso centrale pur in assenza del dato epigenetico da metiloma. La figura 5 mostra lo schema dell'algoritmo riclassificativo utilizzato.

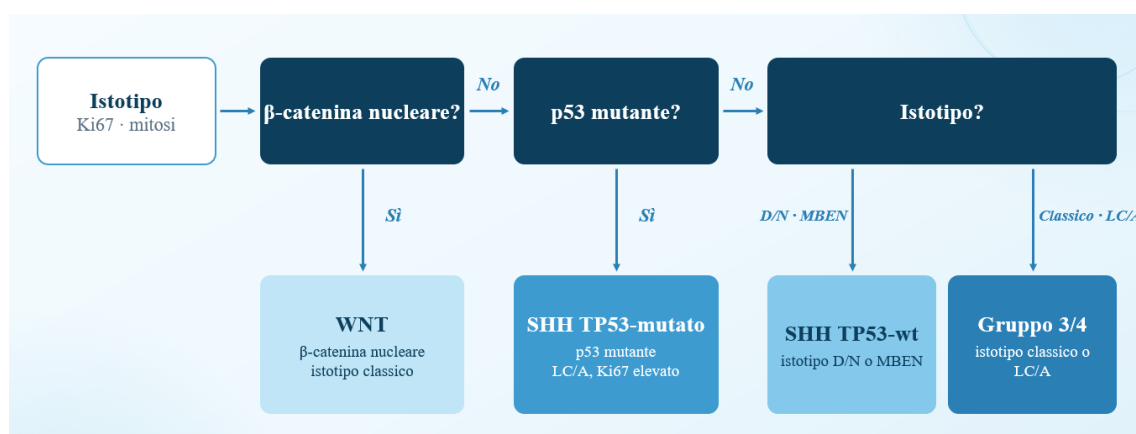


Figura 10. Algoritmo riclassificativo surrogato

Raccolta dei dati clinici e gestione del database

Per ogni paziente sono stati raccolti sesso, età alla diagnosi, istotipo, gruppo molecolare, parametri proliferativi, marcatori immunoistochimici, tipo di chirurgia (radicale/parziale), presenza di metastasi alla diagnosi, trattamento chemioterapico (standard risk e/o alte dosi), radioterapia, progressione/recidiva, ulteriori eventi clinici, (durata del follow-up) e stato vitale. Le informazioni sono state armonizzate in un unico foglio elettronico, mantenendo separati i dati non disponibili dalle categorie cliniche negative.

Le percentuali sono state calcolate sul numero di osservazioni disponibili per ciascuna variabile. I pazienti persi al follow-up sono stati mantenuti come categoria distinta; l'assenza di evento registrato non è stata equiparata a guarigione o a sopravvivenza a lungo termine. Il database utilizzato per le analisi contiene 54 record individuali e, nella versione integrata, 24 variabili principali; sono inoltre presenti campi accessori relativi al follow-up e agli esiti.

Lo studio si è articolato su tre distinti bracci analitici, esplicitati nella Tabella 8. I tre bracci costituiscono prospettive analitiche complementari sulla medesima coorte, non gruppi di trattamento né popolazioni indipendenti.

Tabella 8. Bracci dello studio

Braccio	Finalità e confronti
I. Caratterizzazione descrittiva e correlazioni interne	Distribuzione di istotipi, gruppi molecolari, indici proliferativi e marcatori del microambiente; analisi delle correlazioni tra variabili quantitative e categoriche.

II. Correlazioni fenotipiche e molecolari	Confronto delle caratteristiche clinico-patologiche e immunoistochimiche in funzione dell'istotipo WHO e del gruppo molecolare.
III. Correlazioni prognostiche	Associazione dei parametri con progressione/recidiva e, previa attribuzione individuale della causa di morte, con mortalità specifica per medulloblastoma; esplorazione di uno score composito.

Endpoint prognostici

L'endpoint di progressione/recidiva è definito come progressione documentata del medulloblastoma o ricomparsa di malattia dopo trattamento. Il dato è disponibile per 53 pazienti, di cui 17 con evento e 36 senza evento registrato. La mortalità specifica per medulloblastoma comprende esclusivamente i decessi direttamente attribuiti alla neoplasia primitiva, alla sua progressione o recidiva. Decessi per seconda neoplasia, tossicità terapeutica o altre cause sono classificati separatamente e non conteggiati come morti di malattia. La casistica registra 18 decessi complessivi, numero che non deve essere confuso con gli eventi di mortalità specifica: l'attribuzione individuale della causa è necessaria prima del calcolo di test relativi a quest'ultimo endpoint.

Metodologia statistica

Le variabili categoriche sono descritte mediante frequenze assolute e percentuali; le quantitative mediante mediana e intervallo interquartile (IQR), affiancati ove utile da minimo, massimo e media. Considerata la distribuzione asimmetrica di conteggi cellulari e indici proliferativi, sono stati privilegiati metodi non parametrici. Le associazioni tra variabili quantitative sono state valutate con il coefficiente di Spearman (ρ); per confronti tra due gruppi è stato impiegato il test U di Mann–Whitney bilaterale e per tre o più gruppi il test di Kruskal–Wallis.

Nel braccio istologico i confronti inferenziali principali hanno incluso i gruppi classico, grandi cellule/anaplastico e desmoplastico/nodulare; il caso a nodularità estesa è stato descritto separatamente. I confronti post-hoc sono stati condotti con Mann–Whitney e correzione di Holm entro ciascuna variabile. Per le variabili categoriche sono stati utilizzati test di associazione; i risultati asintotici del χ^2 in presenza di celle rare sono stati considerati esplorativi e da verificare mediante procedure esatte o Monte Carlo.

Nel braccio molecolare il confronto principale è stato SHH-attivato versus non-WNT/non-SHH; il singolo caso WNT è stato descritto ma escluso dall'inferenza. Sono stati utilizzati Mann–Whitney bilaterale per variabili quantitative, test esatto di Fisher per tabelle binarie e, per categoriche a più livelli, permutazione Monte Carlo del χ^2 (10.000 permutazioni, con seme prefissato).

Per l'esplorazione globale del database sono stati considerati 91 confronti a coppie tra 14 variabili istopatologiche/molecolari complete e, dopo integrazione clinica, 210 confronti a coppie nell'insieme analitico esteso. Per le analisi focalizzate sull'istotipo e sul gruppo molecolare sono state definite famiglie di 22 confronti globali ciascuna. I p-value nominali sono stati distinti dai q-value corretti mediante procedura di Benjamini–Hochberg per il controllo del *false discovery rate* (FDR); $q < 0,05$ è stata assunta come soglia di significatività corretta, fermo il carattere esplorativo dello studio. I dati mancanti sono stati gestiti con analisi complete-case per singolo confronto, senza imputazione.

Le associazioni con progressione/recidiva sono state valutate mediante confronti univariati, utilizzando test esatti quando appropriati. Non è stato stimato un modello multivariato prognostico stabile, in ragione della limitata numerosità degli eventi e del potenziale confondimento tra stadio metastatico, radicalità chirurgica, gruppo molecolare e trattamenti. Nessuna associazione osservazionale è stata interpretata come effetto causale.

Score immuno-istopatologico esplorativo

È stato costruito uno score composito a tre criteri binari: NKG2A intratumorale ≥ 10 cellule/10 HPF; p62 ≥ 50 elementi positivi/10 HPF; CD163 perivascolare ≥ 50 cellule/10 HPF. A ciascun criterio soddisfatto è stato attribuito un punto (intervallo 0–3); per il confronto esplorativo sono state utilizzate le classi 0–1 e 2–3. L'associazione con progressione/recidiva è stata valutata mediante test esatto di Fisher.

Le soglie e la combinazione dei marcatori sono state derivate dalla stessa casistica sulla quale è stato misurato l'esito. Pertanto, il p-value nominale è soggetto a ottimismo da selezione e non rappresenta una validazione indipendente. Una verifica mediante permutazione, tenendo conto della ricerca tra combinazioni e soglie, ha fornito un risultato dell'ordine di $p \approx 0,11$. Lo score è quindi presentato

esclusivamente come strumento generatore di ipotesi, da validare in una coorte esterna.

Utilizzo di ChatGPT e controllo umano

ChatGPT (OpenAI) è stato impiegato come strumento di support alla formulazione e revisione delle procedure di elaborazione statistica, all'organizzazione delle tabelle e per una più chiara comprensione dei risultati. I risultati numerici sono stati ricavati dal dataset mediante procedure computazionali e verificati rispetto alle tabelle analitiche; il sistema generativo non è stato utilizzato come fonte autonoma di dati clinici o anatomopatologici.

4. RISULTATI

4.1 Caratteristiche della popolazione in studio

Caratteristiche demografiche

Tabella 9. Caratteristiche demografiche

Variabile	Risultato
Pazienti	54
Maschi	36 (66,7%)
Femmine	18 (33,3%)
Età media $\pm$ DS	6,66 $\pm$ 4,06 anni
Età mediana	5,96 anni
Intervallo interquartile	3,92–9,73 anni
Min–Max	0,09–14,33 anni

Caratteristiche cliniche e terapeutiche

Tabella 10. Caratteristiche clinico-terapeutiche

Variabile	n/N (%)
Resezione radicale	25/53 (47,2%)
Resezione parziale	28/53 (52,8%)
Metastasi alla diagnosi	17/53 (32,1%)
Assenza di metastasi	36/53 (67,9%)
Chemioterapia standard risk	13/54 (24,1%)
Chemioterapia alte dosi	39/54 (72,2%)
Radioterapia eseguita	40/54 (74,1%)
Progressione/recidiva	17/54 (31,5%)
Vivo all'ultimo follow-up	32/53 (60,4%)
Deceduto	18/53 (34,0%)
Perso al follow-up	3/53 (5,7%)

Distribuzione istologica e molecolare

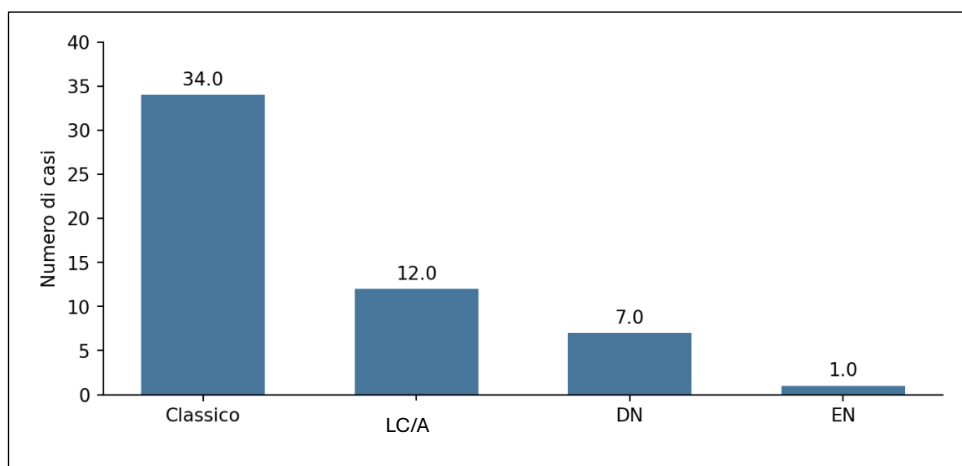


Grafico 1. Distribuzione per istotipo

Tabella 11. Distribuzione per istotipo

Sottotipo	n	%
Classico	34	63,0
Grandi cellule/anaplastico	12	22,2
Desmoplastico/nodulare	7	13,0
Nodularità estesa	1	1,9
Totale	54	100

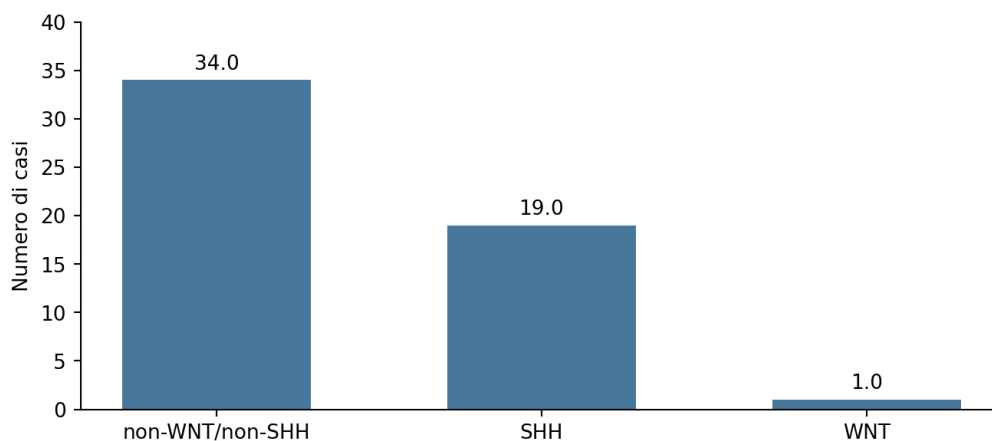


Grafico 2. Distribuzione per gruppo molecolare

Tabella 12. Distribuzione per gruppo molecolare

Gruppo	n	%
Non-WNT/non-SHH	34	63,0
SHH-attivato	19	35,2
WNT-attivato	1	1,9
Totale	54	100

Parametri proliferativi

Tabella 13. Parametri proliferativi

Parametro	Media $\pm$ DS	Mediana (IQR)	Min–Max
Mitosi/10 HPF	10,02 $\pm$ 12,84	4,5 (2–12,75)	0–60
Ki67 (%)	37,29 $\pm$ 20,80	30 (20,4–45,6)	6,7–80,2

Marcatori quantitativi del microambiente

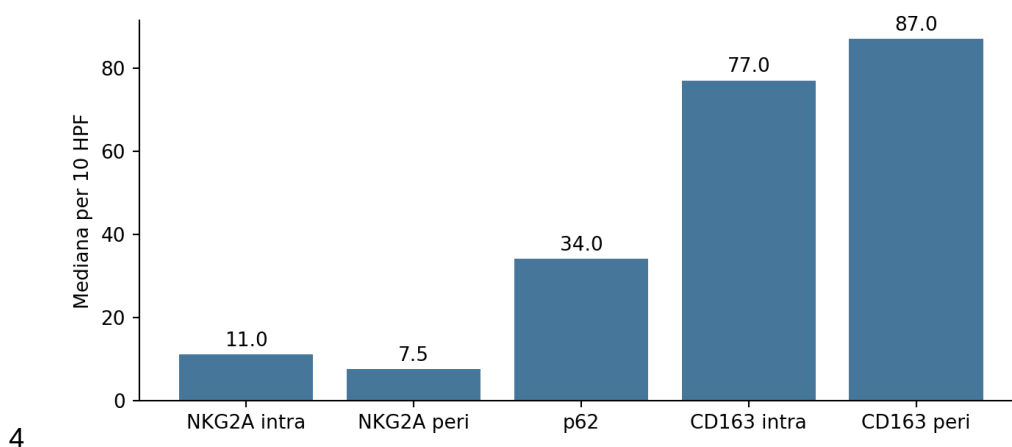


Grafico 3. Marcatori quantitativi del microambiente per 10HPF

Tabella 14. Mediane dei marcatori quantitativi del microambiente per 10 HPF

Marcatore	Media $\pm$ DS	Mediana (IQR)	Min–Max
NKG2A intratumorale	11,39 $\pm$ 6,95	11 (6–16,75)	0–33
NKG2A perivascolare	9,06 $\pm$ 6,06	7,5 (4–14)	0–22
p62	45,04 $\pm$ 51,82	34 (6,75–58,25)	0–246
CD163 intratumorale	90,28 $\pm$ 79,74	77 (37,5–119,75)	0–460
CD163 perivascolare	97,50 $\pm$ 73,50	87 (38,25–148)	0–326

Marcatori immunoistochimici qualitativi

Tabella 15. Marcatori qualitativi

Marcatore	Positivi	Negativi
β-catenina citoplasmatica	43 (79,6%)	11 (20,4%)
β-catenina nucleare	1 (1,9%)	53 (98,1%)
p53	4 (7,4%)	50 (92,6%)

4.2 Correlazioni secondo istotipo

Variabili quantitative

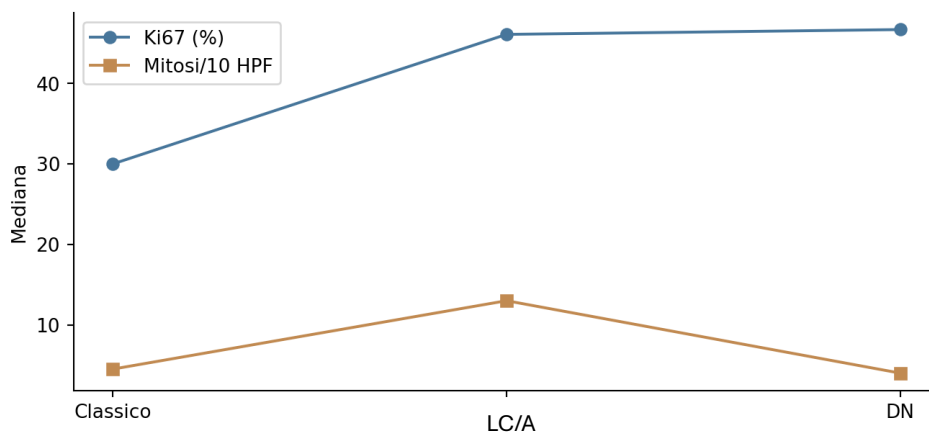


Grafico 4. Mediane di Ki67 e indice mitotico per istotipo

Tabella 16. Distribuzione delle variabili quantitative per istotipo

Variabile	C	LC/A	DN	EN (singolo)	p globale
Età	6.24 (3.99–10.10); n=34	5.05 (4.50–7.09); n=12	1.83 (1.72–11.50); n=7	0.74	0.6069
Mitosi/10HPF	4.50 (2.00–11.75); n=34	13.00 (4.00–35.75); n=12	4.00 (2.00–5.50); n=7	4	0.01969
Ki67%	30.00 (20.00–35.00); n=34	46.10 (37.50–75.00); n=12	46.70 (30.00–70.60); n=7	30.0	0.00174
NK parenchima	11.50 (7.25–17.00); n=34	9.00 (4.00–13.75); n=12	11.00 (7.00–16.00); n=7	4	0.5813
NK perivasc	9.00 (4.25–14.75); n=34	7.00 (3.00–12.00); n=12	7.00 (3.50–10.00); n=7	7	0.3765
p62	26.50 (3.75–55.75); n=34	51.00 (17.50–141.75); n=12	23.00 (11.50–41.50); n=7	25	0.1987
CD163 intra	63.50 (31.25–101.25); n=34	90.00 (75.50–159.50); n=12	69.00 (49.50–213.00); n=7	120	0.0823
CD163 perivasc	60.50 (34.00–121.25); n=34	114.00 (78.00–177.00); n=12	127.00 (74.50–197.50); n=7	154	0.02221
FU (mesi)	192.00 (81.00–228.00); n=34	156.00 (87.00–195.00); n=12	180.00 (30.00–210.00); n=7	240	0.2717

Confronti post-hoc.

Tabella 17. Confronti post-hoc delle variabili quantitative

Variabile	Confronto	p nominale	p Holm	Significativo
Età	C–LC/A	0.5482	1	No
Età	C–DN	0.4155	1	No
Età	LC/A–DN	0.5258	1	No
Mitosi/10HPF	C–LC/A	0.01164	0.03493	Sì
Mitosi/10HPF	C–DN	0.4436	0.4436	No
Mitosi/10HPF	LC/A–DN	0.03012	0.06024	No
Ki67%	C–LC/A	0.0006184	0.001855	Sì
Ki67%	C–DN	0.08835	0.1767	No

Ki67%	LC/A–DN	0.5245	0.5245	No
NK parenchima	C–LC/A	0.3412	1	No
NK parenchima	C–DN	0.9171	1	No
NK parenchima	LC/A–DN	0.4204	1	No
NK perivasc	C–LC/A	0.2755	0.8264	No
NK perivasc	C–DN	0.2974	0.8264	No
NK perivasc	LC/A–DN	0.8314	0.8314	No
p62	C–LC/A	0.09345	0.2803	No
p62	C–DN	1	1	No
p62	LC/A–DN	0.1673	0.3347	No
CD163 intra	C–LC/A	0.03558	0.1067	No
CD163 intra	C–DN	0.2387	0.4774	No
CD163 intra	LC/A–DN	0.9018	0.9018	No
CD163 perivasc	C–LC/A	0.01933	0.05798	No
CD163 perivasc	C–DN	0.0613	0.1226	No
CD163 perivasc	LC/A–DN	0.6725	0.6725	No
FU (mesi)	C–LC/A	0.1323	0.3969	No
FU (mesi)	C–DN	0.3946	0.7891	No
FU (mesi)	LC/A–DN	0.8648	0.8648	No

Variabili categoriche

Tabella 18. Distribuzione delle variabili categoriche per istotipo

Categoria	C	LC/A	DN	EN
Sesso M	22/34 (64.7%)	10/12 (83.3%)	3/7 (42.9%)	1/1 (100.0%)
Sesso F	12/34 (35.3%)	2/12 (16.7%)	4/7 (57.1%)	0/1 (0.0%)
SHH	8/34 (23.5%)	3/12 (25.0%)	7/7 (100.0%)	1/1 (100.0%)
non-WNT / non-SHH	25/34 (73.5%)	9/12 (75.0%)	0/7 (0.0%)	0/1 (0.0%)
WNT	1/34 (2.9%)	0/12 (0.0%)	0/7 (0.0%)	0/1 (0.0%)
B cat citoplasm pos	25/34 (73.5%)	11/12 (91.7%)	7/7 (100.0%)	0/1 (0.0%)
B catenina citoplasm neg	9/34 (26.5%)	1/12 (8.3%)	0/7 (0.0%)	1/1 (100.0%)
B cat nucleare neg	33/34 (97.1%)	12/12 (100.0%)	7/7 (100.0%)	1/1 (100.0%)
B cat nucleare pos	1/34 (2.9%)	0/12 (0.0%)	0/7 (0.0%)	0/1 (0.0%)
p53 neg	33/34 (97.1%)	10/12 (83.3%)	6/7 (85.7%)	1/1 (100.0%)
p53 pos	1/34 (2.9%)	2/12 (16.7%)	1/7 (14.3%)	0/1 (0.0%)
Chirurgia parziale	16/33 (48.5%)	9/12 (75.0%)	3/7 (42.9%)	0/1 (0.0%)

Chirurgia Radicale	17/33 (51.5%)	3/12 (25.0%)	4/7 (57.1%)	1/1 (100.0%)
No metastasi	24/33 (72.7%)	5/12 (41.7%)	6/7 (85.7%)	1/1 (100.0%)
Si metastasi	9/33 (27.3%)	7/12 (58.3%)	1/7 (14.3%)	0/1 (0.0%)
No CTH standard risk	23/34 (67.6%)	11/12 (91.7%)	6/7 (85.7%)	1/1 (100.0%)
Si CTH standard risk	11/34 (32.4%)	1/12 (8.3%)	1/7 (14.3%)	0/1 (0.0%)
Si CHT alte dosi	22/34 (64.7%)	11/12 (91.7%)	5/7 (71.4%)	1/1 (100.0%)
No CHT alte dosi	12/34 (35.3%)	1/12 (8.3%)	2/7 (28.6%)	0/1 (0.0%)
No RT	7/34 (20.6%)	2/12 (16.7%)	4/7 (57.1%)	1/1 (100.0%)
Si RT	27/34 (79.4%)	10/12 (83.3%)	3/7 (42.9%)	0/1 (0.0%)
Si progressione/recidiva	9/33 (27.3%)	6/12 (50.0%)	2/7 (28.6%)	0/1 (0.0%)
No progressione/recidiva	24/33 (72.7%)	6/12 (50.0%)	5/7 (71.4%)	1/1 (100.0%)
Pazienti deceduti	9/33 (27.3%)	6/12 (50.0%)	2/7 (28.6%)	1/1 (100.0%)
Pazienti vivi	22/33 (66.7%)	5/12 (41.7%)	5/7 (71.4%)	0/1 (0.0%)
pdv	2/33 (6.1%)	1/12 (8.3%)	0/7 (0.0%)	0/1 (0.0%)
Deceduto	9/26 (34.6%)	6/8 (75.0%)	2/4 (50.0%)	1/1 (100.0%)
Vivo lungo FU	17/26 (65.4%)	2/8 (25.0%)	2/4 (50.0%)	0/1 (0.0%)

Confronti globali e correzione FDR

Tabella 19. Test globali per istotipo e correzione Benjamini–Hochberg

Variabile	Metodo	p	q FDR	q < 0,05
Ki67%	Kruskal–Wallis	0.00174	0.0318	Si
Molecolare	χ^2 esplorativo	0.002891	0.0318	Si
Mitosi/10HPF	Kruskal–Wallis	0.01969	0.1222	No
CD163 perivasc	Kruskal–Wallis	0.02221	0.1222	No
Metastasi	χ^2 esplorativo	0.07794	0.2985	No

CD163 intra	Kruskal–Wallis	0.0823	0.2985	No
RT	χ^2 esplorativo	0.09499	0.2985	No
Esito maturo (analisi)	χ^2 esplorativo	0.1297	0.3455	No
B-cat citopl	χ^2 esplorativo	0.1509	0.3455	No
Sesso	χ^2 esplorativo	0.1916	0.3455	No
p62	Kruskal–Wallis	0.1987	0.3455	No
CTH standard risk	χ^2 esplorativo	0.1998	0.3455	No
CHT alte dosi	χ^2 esplorativo	0.2042	0.3455	No
P53	χ^2 esplorativo	0.2323	0.3471	No
Chirurgia	χ^2 esplorativo	0.2366	0.3471	No
FU (mesi)	Kruskal–Wallis	0.2717	0.3735	No
Progressione/ Recidiva	χ^2 esplorativo	0.3451	0.4465	No
NK perivasc	Kruskal–Wallis	0.3765	0.4601	No
Stato vitale	χ^2 esplorativo	0.5578	0.6358	No
NK parenchima	Kruskal–Wallis	0.5813	0.6358	No
Età	Kruskal–Wallis	0.6069	0.6358	No
B-cat nucleare	χ^2 esplorativo	0.7522	0.7522	No

Nei confronti quantitativi, mitosi/10 HPF ($p=0,01969$), Ki67 ($p=0,00174$) e CD163 perivascolare ($p=0,02221$) presentano p globali inferiori a 0,05. Nei post-hoc corretti con Holm risultano significativi C–LC/A per mitosi ($p=0,03493$) e Ki67 ($p=0,001855$).

4.3. Correlazioni secondo gruppo molecolare

Variabili quantitative

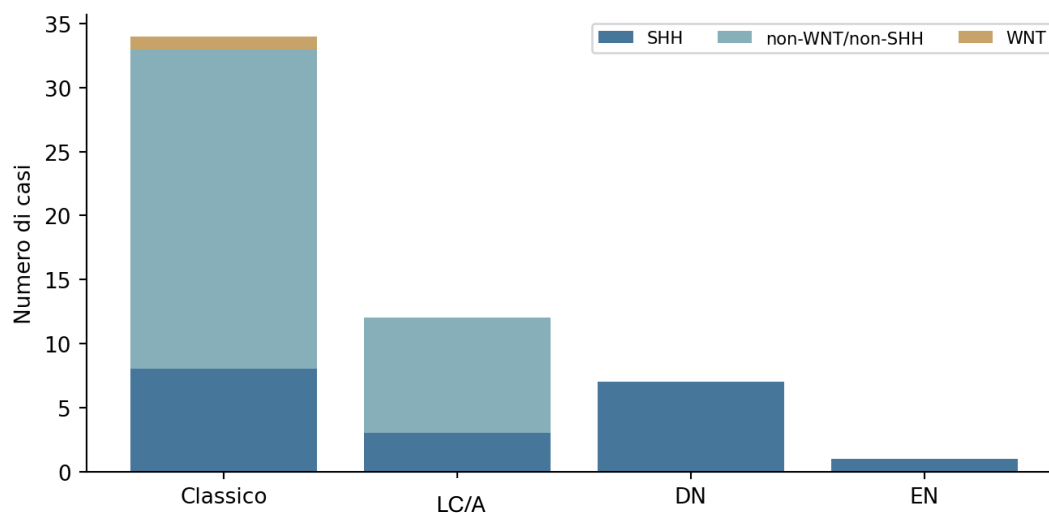


Grafico 5. Distribuzione congiunta degli istotipi e dei gruppi molecolari

Tabella 20. Variabili quantitative per gruppo molecolare: mediane (IQR), p e q

Variabile	SHH: mediana (IQR)	Non- WNT/non- SHH	WNT (n=1)	p / q FDR
Età	4,74 (1,72–7,88)	6,36 (4,25–9,55)	10,27	0,07 / 0,26
Mitosi/10HPF	4,00 (2,00–6,00)	7,00 (2,25–14,75)	10,00	0,26 / 0,53
Ki67%	30,00 (20,00–70,60)	30,00 (26,25–40,00)	18,70	0,80 / 0,98
NK parenchima	11,00 (7,00–17,00)	9,00 (5,25–15,25)	17,00	0,22 / 0,48
NK perivasc	7,00 (5,00–12,50)	7,50 (3,00–13,75)	22,00	0,59 / 0,86
p62	37,00 (11,50–55,50)	26,50 (6,00–76,25)	9,00	0,77 / 0,98
CD163 intra	75,00 (58,00–130,00)	73,00 (32,75–118,50)	83,00	0,34 / 0,58
CD163 perivasc	118,00 (60,00–169,50)	71,50 (22,75–124,25)	152,00	0,06 / 0,26
FU (mesi)	192,00 (36,00–240,00)	180,00 (108,00–213,00)	24,00	0,85 / 0,98

Variabili categoriche

Tabella 21. Distribuzione delle variabili categoriche per gruppo molecolare, *p* e *q*

Variabile	SHH	non-WNT/non-SHH	WNT	p	q (FDR)
Sesso				0,55	0,86
F	5/19	13/34	0/1		
M	14/19	21/34	1/1		
Istologia WHO				<0,01	0,01
Classico (C)	8/19	25/34	1/1		
Desmoplastico/nodulare (DN)	7/19	0/34	0/1		
Extensive nodularity (EN)	1/19	0/34	0/1		
Grandi cellule/anaplastico (LC/A)	3/19	9/34	0/1		
β-catenina citoplasmatica				0,14	0,39
neg	6/19	4/34	1/1		
pos	13/19	30/34	0/1		
β-catenina nucleare				1,00	1,00
neg	19/19	34/34	0/1		
p53				0,01	0,15
neg	15/19	34/34	1/1		
pos	4/19	0/34	0/1		
Chirurgia				1,00	1,00
Parziale	9/18	18/34	1/1		
Radicale	9/18	16/34	0/1		
Metastasi				0,12	0,38
no	15/18	20/34	1/1		
sì	3/18	14/34	0/1		
CHT standard risk				0,17	0,43
no	17/19	24/34	0/1		
sì	2/19	10/34	1/1		
CHT alte dosi				0,75	0,98
no	4/19	10/34	1/1		
sì	15/19	24/34	0/1		
RT				0,02	0,15
no	9/19	5/34	0/1		

Variabile	SHH	non-WNT/non-SHH	WNT	p	q (FDR)
sì	10/19	29/34	1/1		
Progressione/recidiva				1,00	1,00
no	12/18	23/34	1/1		
sì	6/18	11/34	0/1		
Stato vitale				0,32	0,58
Morto (M)	8/18	10/34	0/1		
Vivo (V)	10/18	21/34	1/1		
Perso al follow-up (pdv)	0/18	3/34	0/1		
Esito maturo				0,07	0,26
Deceduto	8/11	10/28	—		
Vivo a lungo FU	3/11	18/28	—		

Nel confronto tra SHH e non-WNT/non-SHH, l'associazione con l'istotipo WHO presenta q FDR $\approx$ 0,01. Per p53 $q\approx$ 0,15, radioterapia $q\approx$ 0,15, CD163 perivascolare $q\approx$ 0,26, età $q\approx$ 0,26 ed esito maturo $q\approx$ 0,26.

4.4 Correlazioni con il decorso clinico

Progressione e recidiva

L'endpoint è disponibile per 53 pazienti: 17 (32,1%) con progressione/recidiva e 36 (67,9%) senza evento registrato.

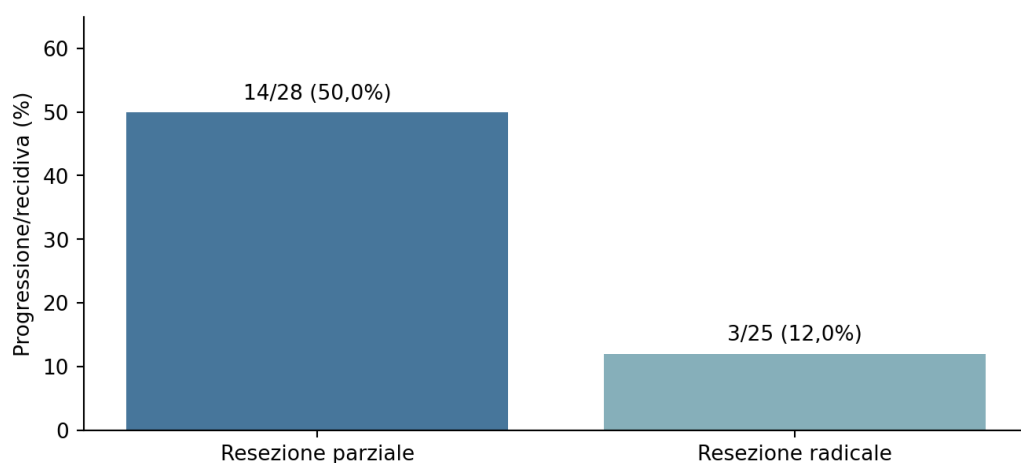


Grafico 6. Progressione/recidiva secondo radicalità chirurgica

Tabella 22. Confronti univariati con progressione e recidiva, *p* nominale e *q* FDR

Variabile	p nominale	q FDR
Radicalità chirurgica	0,0037	0,0707
Metastasi alla diagnosi	0,0100	0,0946
Chemioterapia alte dosi	0,1803	0,6694
Chemioterapia standard risk	0,1829	0,6694
p62	0,2260	0,6694
β-catenina citoplasmatica	0,2601	0,6694
Radioterapia	0,3057	0,6694
Età	0,3125	0,6694
CD163 perivascolare	0,3171	0,6694
CD163 intratumorale	0,4402	0,7270
Istotipo	0,4521	0,7270
NKG2A perivascolare	0,4795	0,7270
Indice mitotico	0,4974	0,7270
Ki67	0,6664	0,8904
Sesso	0,7603	0,8904
Gruppo molecolare	0,7841	0,8904
NKG2A intratumorale	0,7967	0,8904
β-catenina nucleare	1,000	1,000
p53	1,000	1,000

Sono registrati 18 decessi complessivi. La documentazione disponibile comprende decessi per cause differenti dal medulloblastoma; il numero definitivo di eventi di mortalità specifica non è ricavabile senza revisione individuale delle cause. Non sono pertanto riportati test di associazione per la mortalità specifica. I 18 decessi complessivi non sono utilizzati come surrogato di tale endpoint.

4.4.1 Score prognostico sperimentale

Viene assegnato 1 punto per ciascun parametro che raggiunge il cut-off.

HPF: high-power field (campo ad alto ingrandimento).

Tabella 23. Punti e cut-off per parametro

Parametro	Cut-off	Punti
NKG2A intratumorale	≥ 10 cellule/10 HPF	1
p62	≥ 50 elementi positivi/10 HPF	1
CD163 perivascolare	≥ 50 cellule/10 HPF	1
Score totale		0–3

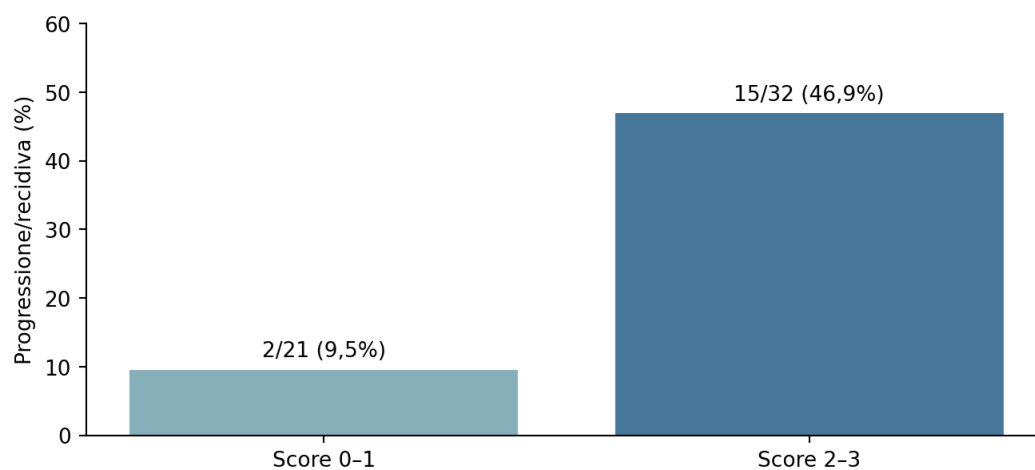


Grafico 7. Progressione/recidiva per categoria dello score sperimentale

Tabella 24. Distribuzione per categoria dello score sperimentale

Score	Pazienti	Eventi	Frequenza
0–1	21	2	9,5%
2–3	32	15	46,9%
Totale	53	17	32,1%

La frequenza di evento è 2/21 (9,5%) con score 0–1 e 15/32 (46,9%) con score 2–3; test esatto di Fisher p nominale=0,0062. Per score 0, 1, 2 e 3 le frequenze sono rispettivamente 12,5%, 7,7%, 40,7% e 80,0%. Il test di permutazione riportato

nell'analisi preliminare, considerando la ricerca delle combinazioni, ha prodotto $p \approx 0,11$.

Nota sui denominatori: i risultati sono riportati per i casi con dato disponibile in ciascuna analisi. Le proporzioni di progressione nella tabella descrittiva originale (17/54) e nell'analisi prognostica (17/53) hanno denominatori differenti; per l'endpoint prognostico è adottato il secondo.

5. DISCUSSIONE

Risultati principali

Il primo risultato rilevante riguarda il rapporto tra morfologia e classificazione molecolare. Il medulloblastoma classico rappresentava il 63,0% della casistica, seguito dalla variante a grandi cellule/anaplastica (22,2%), dalla variante desmoplastico/nodulare (13,0%) e da un singolo caso a nodularità estesa. Sul piano molecolare, il 63,0% dei tumori apparteneva alla categoria non-WNT/non-SHH, il 35,2% al gruppo SHH-attivato e un solo caso al gruppo WNT-attivato.

Le due classificazioni hanno mostrato una significativa relazione reciproca. Tutti i tumori desmoplastico/nodulari e il singolo tumore a nodularità estesa appartenevano al gruppo SHH, mentre gli istotipi classico e a grandi cellule/anaplastico risultavano distribuiti tra i due principali gruppi molecolari. L'associazione tra istotipo e gruppo molecolare rimaneva significativa dopo correzione per confronti multipli (q FDR circa 0,01).

Un secondo risultato riguarda la proliferazione tumorale, misurata attraverso il marcatore Ki67 e la conta mitotica. La variante a grandi cellule/anaplastica presentava un indice mitotico mediano di 13 mitosi/10 HPF, rispetto a 4,5 nel classico, e un Ki67 mediano del 46,1% rispetto al 30,0% del classico. Il confronto classico–grandi cellule/anaplastico rimaneva significativo dopo correzione di Holm sia per mitosi sia per Ki67. Il dato supporta quindi l'associazione tra fenotipo a grandi cellule/anaplastico e maggiore attività proliferativa, senza tuttavia identificare nella proliferazione un parametro prognostico autonomo nella presente serie.

Il terzo e più originale livello di analisi riguarda il microambiente immunitario tumorale. NKG2A e CD163 sono stati valutati separatamente nei compartimenti intratumorale e perivascolare, introducendo una dimensione spaziale nella caratterizzazione immunoistochimica. La correlazione tra le due localizzazioni era elevata per NKG2A e presente anche per CD163, suggerendo che

la densità dell'infiltrato nei due compartimenti tenda a variare concordemente, pur conservando informazioni topografiche distinte.

Particolarmente interessante è risultata la relazione tra p62/SQSTM1 e CD163. p62 correlava positivamente con CD163 intratumorale (p circa 0,53) e perivascolare (p circa 0,44). Anche Ki67 mostrava correlazioni positive con la componente CD163-positiva. Queste osservazioni suggeriscono l'esistenza di una relazione tra fenotipo proliferativo tumorale, processi biologici associati a p62 e composizione macrofagica del microambiente. Esse documentano tuttavia una co-occorrenza quantitativa e non dimostrano, di per sé, un rapporto causale.

CD163 perivascolare mostrava inoltre valori numericamente superiori nei tumori a grandi cellule/anaplastici e desmoplastico/nodulari rispetto ai classici e nei tumori SHH rispetto ai non-WNT/non-SHH. Queste differenze non superavano però in maniera robusta le correzioni per confronti multipli e devono essere considerate esplorative.

Sul piano clinico, 17 dei 53 pazienti valutabili avevano sviluppato progressione o recidiva. La resezione parziale e la presenza di metastasi alla diagnosi rappresentavano i segnali prognostici nominalmente più evidenti, ma nessuna delle 19 associazioni esaminate manteneva la significatività dopo correzione FDR. Questo risultato non nega il significato clinico di tali variabili, ma sottolinea i limiti statistici di una coorte relativamente piccola e biologicamente eterogenea.

Infine, l'integrazione di NKG2A intratumorale, p62 e CD163 perivascolare in uno score composito esplorativo identificava due popolazioni con frequenze differenti di progressione/recidiva: 9,5% nei pazienti con score 0–1 e 46,9% in quelli con score 2–3, con p nominale pari a 0,0062. Il dato costituisce uno dei risultati più suggestivi dello studio, ma non può essere considerato una validazione prognostica: marcatori e soglie sono stati selezionati nella stessa casistica e la verifica mediante permutazione, tenendo conto della ricerca combinatoria, ha restituito una probabilità dell'ordine dell'11% di ottenere casualmente un risultato almeno altrettanto estremo.

Confronto con la letteratura esistente

I risultati relativi alla relazione tra istotipo e gruppo molecolare sono coerenti con il modello biologico attualmente riconosciuto del medulloblastoma. La letteratura riportata nella parte compilativa della tesi evidenzia una forte associazione tra fenotipo desmoplastico/nodulare o a estensiva nodularità e attivazione della pathway SHH, mentre morfologia classica e grandi cellule/anaplastica possono ricorrere in contesti molecolari differenti. La nostra casistica riproduce esattamente questo pattern e conferma, in una popolazione pediatrica monocentrica, la complementarità tra classificazione istologica e molecolare.

Il dato proliferativo è ugualmente coerente con la maggiore aggressività biologica associata al fenotipo a grandi cellule/anaplastico. Il nostro studio aggiunge tuttavia un elemento importante: la maggiore proliferazione non si traduce automaticamente in una significativa associazione con progressione/recidiva. Mitosi e Ki67 descrivono quindi una proprietà biologica del tumore, ma non possono essere considerati isolatamente come surrogati dell'outcome.

Più innovativo è il confronto con la letteratura relativa al tumor immune microenvironment (TIME).:

- Per NKG2A, la letteratura considerata suggerisce il possibile coinvolgimento dell'asse NKG2A/HLA-E nei meccanismi di immunoevasione, ma la caratterizzazione tissutale di questa componente nel medulloblastoma e la sua relazione con istotipo, gruppo molecolare e outcome rimangono limitate. La distinzione effettuata nel nostro studio tra componente intratumorale e perivascolare aggiunge pertanto un'informazione spaziale potenzialmente rilevante. È tuttavia fondamentale non identificare automaticamente le cellule NKG2A-positive con cellule NK: in assenza di co-espressione di marcatori di linea, il risultato deve rimanere definito come infiltrato NKG2A-positivo.
- CD163: i TAM sono coinvolti, secondo la letteratura discussa nella tesi, nella regolazione dell'immunità, dell'angiogenesi e

dell'invasività; rimane tuttavia incompletamente definita la loro distribuzione nei diversi contesti biologici del medulloblastoma. I nostri risultati suggeriscono che la componente CD163-positiva possa essere quantitativamente collegata sia alla proliferazione sia a p62, introducendo l'ipotesi che il fenotipo tumorale e quello microambientale non siano indipendenti.

La correlazione p62–CD163 costituisce, in questo senso, uno dei risultati biologicamente più interessanti. La letteratura esaminata attribuisce all'autofagia un ruolo potenziale nell'adattamento all'ipossia, nell'invasività, nella staminalità, nella farmacoresistenza e nell'interazione con il microambiente. Sono inoltre state proposte relazioni tra ipossia, autofagia e polarizzazione macrofagica. La nostra osservazione porta questa ipotesi sul tessuto tumorale umano, mostrando una relazione quantitativa tra p62 e infiltrato CD163-positivo.

L'interpretazione ha però dei limiti: p62 immunoistochimico non misura direttamente il flusso autofagico e CD163 non dimostra automaticamente un fenotipo M2. Non è quindi possibile affermare che una modificazione dell'autofagia determini il reclutamento o la polarizzazione dei macrofagi.

Lo score NKG2A–p62–CD163 porta infine questa impostazione a un livello ulteriore. La letteratura tende frequentemente ad analizzare singoli biomarcatori, mentre il comportamento del tumore deriva plausibilmente dall'interazione di differenti componenti. Il segnale osservato con lo score sostiene quindi il concetto di un fenotipo microambientale composito, pur senza dimostrarne ancora un valore prognostico indipendente.

Punti di forza

I punti di forza dello studio sono:

- La natura consecutiva della casistica, che riduce il rischio di una selezione discrezionale dei casi;
- La revisione neuropatologica dei preparati e dall'applicazione di una classificazione surrogata integrata coerente con WHO 2021;

- La valutazione multidimensionale dello stesso materiale biologico. Morfologia, gruppo molecolare, proliferazione, NKG2A, CD163, p62 e informazioni cliniche non vengono analizzati come dataset separati, ma ricondotti allo stesso paziente;
- La compartimentazione spaziale dell'infiltrato. La distinzione tra componente intratumorale e perivascolare per NKG2A e CD163 tenta di conservare un'informazione che andrebbe persa utilizzando una misura globale dell'infiltrato;
- L'approccio prudente all'analisi statistica. La correzione FDR, la distinzione tra significatività nominale e corretta, l'esclusione di inferenze improprie sul singolo caso WNT e la verifica mediante permutazione dello score riducono il rischio di sovrainterpretare risultati derivati da una casistica relativamente piccola.

Limiti dello studio

Lo studio presenta tuttavia alcuni limiti:

- Il disegno retrospettivo e monocentrico e dalla numerosità complessivamente contenuta della casistica. La suddivisione in sottotipi riduce ulteriormente la potenza statistica, soprattutto per le categorie meno frequenti;
- La classificazione molecolare. I gruppi 3 e 4 sono aggregati nella categoria non-WNT/non-SHH, mentre il gruppo WNT comprende un solo paziente. Ciò riduce la capacità di identificare differenze biologiche e prognostiche che potrebbero emergere utilizzando una classificazione molecolare più granulare.
- La caratterizzazione immunofenotipica. NKG2A non identifica autonomamente cellule NK, CD163 non equivale a polarizzazione M2 e p62 non rappresenta una misura diretta del flusso autofagico. L'assenza di immunofluorescenza multiplex, co-localizzazione o analisi funzionali impedisce pertanto di trasformare le correlazioni osservate in conclusioni meccanicistiche.

- La quantificazione per HPF introduce inoltre una possibile dipendenza dalle aree selezionate e dalla superficie effettiva del campo. Per una futura validazione sarà preferibile una quantificazione digitalizzata per unità di superficie, associata a segmentazione spaziale standardizzata.
- La durata non uniforme del follow-up e l'assenza, nel database attuale, di date individuali adeguate degli eventi impediscono analisi time-to-event robuste. Per questa ragione non sono state prodotte curve Kaplan–Meier o analisi di Cox.

La presenza di 18 decessi complessivi non può inoltre essere assimilata alla mortalità specifica per medulloblastoma: la causa individuale deve essere verificata prima di qualsiasi analisi disease-specific.

Infine, lo score composito è stato costruito e testato sulla medesima coorte. È pertanto esposto a overfitting e ottimismo da selezione e deve essere considerato esclusivamente generatore di ipotesi.

Aspetti traslazionali

L'interesse traslazionale dello studio non consiste, allo stato attuale, nell'introduzione immediata di nuovi biomarcatori nella routine diagnostica, quanto nell'identificazione di fenotipi biologici suscettibili di ulteriore caratterizzazione e, potenzialmente, di intervento terapeutico.

La prima implicazione riguarda la possibilità di affiancare alla diagnosi integrata WHO una caratterizzazione del microambiente. Se confermata, l'esistenza di profili immunologici differenti tra sottotipi istologici o gruppi molecolari potrebbe contribuire a definire una stratificazione biologica più completa del medulloblastoma.

NKG2A assume particolare interesse in quanto appartiene a un asse immunoregolatorio potenzialmente modulabile. Prima di qualsiasi prospettiva terapeutica è però necessario dimostrare quali cellule esprimano effettivamente NKG2A nel medulloblastoma, la presenza del relativo ligando nel tessuto tumorale e il significato funzionale dell'interazione.

Analogamente, la componente CD163-positiva potrebbe rappresentare non soltanto una misura dell'infiltrato macrofagico, ma un indicatore dell'organizzazione immunologica del tumore. L'eventuale associazione tra macrofagi, proliferazione e p62 suggerisce che metabolismo/autofagia tumorale e microambiente possano appartenere a un circuito biologico comune, suscettibile in futuro di essere studiato mediante approcci combinati.

Un ulteriore aspetto traslazionale deriva dallo score composito. Se il segnale osservato fosse riprodotto in una coorte indipendente, un pannello immunoistochimico relativamente semplice potrebbe rappresentare uno strumento complementare alla classificazione molecolare. Questa prospettiva rimane tuttavia subordinata alla dimostrazione di riproducibilità, valore prognostico indipendente e reale capacità incrementale rispetto ai parametri clinico-molecolari già disponibili.

L'obiettivo traslazionale non è quindi sostituire la classificazione molecolare con l'immunoistochimica, ma verificare se il TIME aggiunga informazione biologica e clinica a quella già fornita dal tumore.

Prospettive future

Lo studio apre la strada a diversi sviluppi:

- La validazione della casistica attuale: sarà necessario, cioè, completare l'attribuzione delle cause di morte, recuperare le date individuali di diagnosi, progressione, recidiva e decesso e condurre analisi di sopravvivenza propriamente time-dependent.
- Aumentare la numerosità mediante una coorte indipendente, idealmente multicentrica, nella quale verificare in maniera predefinita le associazioni osservate e soprattutto lo score NKG2A-p62-CD163. I cut-off dovranno essere fissati prima dell'analisi della coorte di validazione.
- Miglior divisione dei gruppi: la classificazione molecolare dovrà essere approfondita distinguendo i gruppi 3 e 4 e, ove possibile, i sottotipi molecolari più fini. Ciò permetterà di stabilire se i fenotipi

immunologici osservati siano associati a specifiche identità molecolari oppure rappresentino una dimensione biologica parzialmente indipendente.

- La caratterizzazione del microambiente dovrà evolvere dall'immunoistochimica singola verso metodiche multiplex e spatial. Per NKG2A sarà necessario identificare le popolazioni cellulari che esprimono il recettore mediante co-localizzazione con marcatori di linea; per CD163 sarà opportuno utilizzare pannelli capaci di descrivere più accuratamente gli stati funzionali macrofagici; per p62 saranno necessari marcatori complementari e approcci funzionali per valutare il pathway autofagico.
- L'impiego di *digital pathology* e analisi quantitativa dell'immagine potrebbe inoltre consentire di superare il conteggio manuale per HPF, misurando densità cellulari per unità di superficie, distanze tra popolazioni cellulari, aggregazione perivascolare e rapporti spaziali tra cellule tumorali e componenti immunitarie.

In questa prospettiva, il risultato più importante del presente studio non consiste nell'aver identificato un nuovo biomarcatore prognostico già pronto per l'applicazione clinica. Consiste piuttosto nell'aver individuato, all'interno di una casistica pediatrica clinicamente annotata, relazioni misurabili tra fenotipo tumorale e microambiente e nell'aver formulato ipotesi verificabili sperimentalmente.

Il percorso futuro è quindi coerente con quello che costituisce il filo conduttore dell'intera tesi: passare dalla morfologia alla classificazione molecolare, dalla classificazione molecolare al microambiente e, infine, verificare se l'integrazione di questi livelli possa contribuire a comprendere meglio il comportamento clinico del medulloblastoma.

6. CONCLUSIONI

Il presente studio conferma come il medulloblastoma pediatrico non possa essere interpretato attraverso una singola dimensione diagnostica o biologica, ma richieda una lettura integrata che comprenda morfologia, classificazione molecolare, attività proliferativa, microambiente immunitario e caratteristiche cliniche.

Nella casistica analizzata, la significativa associazione tra sottotipo istologico e gruppo molecolare conferma la complementarità tra morfologia e biologia molecolare. In particolare, l'appartenenza dei tumori desmoplastico/nodulari e a estensiva nodularità al gruppo SHH e la maggiore attività proliferativa osservata nella variante a grandi cellule/anaplastica riproducono associazioni biologiche consolidate e documentano la coerenza della popolazione studiata con l'attuale modello classificativo del medulloblastoma.

L'elemento maggiormente caratterizzante del presente lavoro è tuttavia rappresentato dall'analisi del microambiente immunitario tumorale. La valutazione quantitativa e compartimentale di NKG2A e CD163, associata allo studio di p62/SQSTM1, ha consentito di esplorare le relazioni tra caratteristiche intrinseche della neoplasia e organizzazione del suo microambiente. La correlazione positiva osservata tra p62 e infiltrato CD163-positivo, sia intratumorale sia perivascolare, suggerisce in particolare l'esistenza di un'interazione biologica tra processi associati alla regolazione dell'autofagia e componente monocito-macrofagica del TIME. Tale associazione non dimostra un rapporto causale, ma identifica un segnale biologico meritevole di ulteriori approfondimenti.

L'analisi degli outcome conferma al tempo stesso la necessità di una interpretazione prudente. Nella presente casistica, radicalità chirurgica e presenza di metastasi hanno mostrato associazioni nominali con progressione/recidiva, che non sono rimaste significative dopo correzione per confronti multipli. I dati disponibili non consentono inoltre, allo stato attuale, una robusta analisi tempo-dipendente o della mortalità specifica per medulloblastoma.

Particolarmente interessante appare il segnale derivante dallo score composito NKG2A–p62–CD163. La maggiore frequenza di progressione/recidiva osservata nei pazienti con score elevato suggerisce che l'integrazione di differenti componenti del microambiente possa fornire informazioni non immediatamente riconoscibili attraverso l'analisi dei singoli marcatori. Tuttavia, poiché combinazione e cut-off sono stati derivati dalla stessa casistica, tale risultato deve essere considerato esclusivamente generatore di ipotesi e necessita di validazione indipendente.

Nel complesso, i risultati sostengono quindi una visione del medulloblastoma come sistema biologico integrato, nel quale le caratteristiche della cellula tumorale e quelle del microambiente non costituiscono fenomeni separati, ma dimensioni potenzialmente interconnesse della stessa malattia.

La prosecuzione di questa linea di ricerca richiederà casistiche più ampie e indipendenti, una caratterizzazione molecolare più granulare e metodiche multiplex e spatial capaci di definire simultaneamente identità, distribuzione e stato funzionale delle popolazioni cellulari. Sarà inoltre necessario verificare se l'integrazione dei parametri del TIME con gli attuali fattori clinico-molecolari sia in grado di fornire un reale valore prognostico incrementale.

Dalla morfologia alla clinica, il percorso proposto da questo studio suggerisce pertanto che il passo successivo nella comprensione del medulloblastoma possa consistere non soltanto in una classificazione sempre più precisa della cellula neoplastica, ma nella comprensione del sistema biologico che essa costruisce e con il quale interagisce. È in questa integrazione tra tumore, microambiente e paziente che potranno essere ricercati nuovi biomarcatori e, potenzialmente, nuovi bersagli terapeutici.

BIBLIOGRAFIA

1. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Central nervous system tumours. 5th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2021. (WHO classification of tumours series; vol. 6).
2. Price M, Ballard C, Benedetti J, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2018–2022. *Neuro Oncol.* 2025 Oct 14;27(Suppl 4): iv1-iv66.
3. Ciobanu-Caraus O, Czech T, Peyrl A, et al. The Site of Origin of Medulloblastoma: Surgical Observations Correlated to Molecular Groups. *Cancers (Basel).* 2023 Oct 7;15(19):4877.
4. Waszak SM, Northcott PA, Buchhalter I, et al. Spectrum and prevalence of genetic predisposition in medulloblastoma: a retrospective genetic study and prospective validation in a clinical trial cohort. *Lancet Oncol.* 2018 Jun;19(6):785-798.
5. Northcott PA, Jones DT, Kool M, et al. Medulloblastomics: the end of the beginning. *Nat Rev Cancer.* 2012 Dec;12(12):818-834.
6. Carta R, Del Baldo G, Miele E, et al. Cancer Predisposition Syndromes and Medulloblastoma in the Molecular Era. *Front Oncol.* 2020 Oct 29;10:566822.
7. Louis DN, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021 Aug 2;23(8):1231-1251.
8. Martirosian V, Neman J. Medulloblastoma: Challenges and advances in treatment and research. *Cancer Rep (Hoboken).* 2019 Jun;2(3):e1146.
9. Zafari P, Azarhomayoun A. Medulloblastoma Diagnosis and Treatment. In: FitzGerald TJ, editor. *Medulloblastoma - Therapeutic Outcomes and Future Clinical Trials.* IntechOpen, London 2024.

10. Capper D, Jones DTW, Sill M, et al. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*. 2018 Mar 22;555(7697):469-474.
11. Northcott PA, Buchhalter I, Morrissy AS, et al. The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. *Nature*. 2017 Jul 19;547(7663):311-317.
12. Harry JL, Shezi NB, Mwazha A, et al. Molecular classification of medulloblastoma using immunohistochemistry: A single centre study. *Ann Diagn Pathol*. 2025 Jun;76:152463.
13. Bailey S, Jacobs S, Kourti M, et al. Medulloblastoma therapy: Consensus treatment recommendations from SIOP-Europe and the European Reference Network. *EJC Paediatr Oncol*. 2025 Jun;5:100205.
14. Cotter JA, Hawkins C. Medulloblastoma: WHO 2021 and Beyond. *Pediatr Dev Pathol*. 2022 Jan-Feb;25(1):23-33.
15. Zhou Y, Cheng L, Liu L, et al. NK cells are never alone: crosstalk and communication in tumour microenvironments. *Mol Cancer*. 2023 Feb 16;22(1):34.
16. Jin M-Z, Jin W-L. The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Aug 25;5(1):166.
17. Fisher JG, Doyle ADP, Graham LV, Khakoo SI, Blunt MD. Disruption of the NKG2A:HLA-E immune checkpoint axis to enhance NK cell activation against cancer. *Vaccines (Basel)*. 2022;10(12):1993.
18. Li M, Yang Y, Xiong L, et al. Metabolism, metabolites, and macrophages in cancer. *J Hematol Oncol*. 2023 Jul 25;16(1):80.
19. 19. Chen D, Zhang X, Li Z, et al. Metabolic regulatory crosstalk between tumor microenvironment and tumor-associated macrophages. *Theranostics*. 2021 Jan 1;11(3):1016-1030.

20. Janji B, Viry E, Moussay E, Paggetti J, Arakelian T, Mgrditchian T, et al. The multifaceted role of autophagy in tumor evasion from immune surveillance. *Oncotarget*. 2016;7(14):17591-607.
21. Richard SA. The pivotal role of autophagy in the pathogenesis and therapy of medulloblastoma. *Future Oncol*. 2024;20(39):3313-24.