

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI GENOVA**  
**FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**



**CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN**  
**MEDICINA E CHIRURGIA**

**ANNO ACCADEMICO 2021-2022**

**TESI DI LAUREA**

**Ruolo dei biomarcatori molecolari dei tumori cerebrali nell'epilessia  
tumorale sintomatica. Uno studio preliminare su 151 casi.**

RELATORE

Chiar.mo Prof. Dario Arnaldi

Candidata

Silvia Mambriani

## INDICE

<b>1. Introduzione</b> .....	pag.4
1.1 definizione e classificazione dell'epilessia.....	pag.4
<b>2. Epilessia tumorale</b> .....	pag.8
2.1 Epidemiologia.....	pag.8
2.2 Epilettogenesi nei tumori cerebrali, diagnosi, correlazioni cliniche.....	pag.10
❖ 2.2.1 Istologia e localizzazione.....	pag.11
❖ 2.2.2 Ipossia, ph, forza ionica.....	pag.12
❖ 2.2.3 Infiammazione e gliosi.....	pag.14
❖ 2.2.4 Neurotrasmettitori.....	pag.16
❖ 2.2.5 Comunicazione intercellulare e alterazioni della barriera emato-encefalica.....	pag.19
<b>3. I tumori cerebrali</b> .....	pag.21
3.1 classificazione WHO 2016.....	pag.21
❖ 3.1.1 Gliomi Diffusi.....	pag.23
❖ 3.1.2 Astrocitoma diffuso e astrocitoma anaplastico.....	pag.23
❖ 3.1.3 Oligodendroglioma.....	pag.24
❖ 3.1.4 Glioblastoma.....	pag.24
3.2 Classificazione WHO 2021.....	pag.26
3.3 Marcatori immunoistochimici e molecolari.....	pag.30
❖ 3.3.1 Sinaptofisina.....	pag.30
❖ 3.3.2 GFAP (proteina acida fibrillare gliale) .....	pag.31
❖ 3.3.3 Ki67 (%) .....	pag.31
❖ 3.3.4 ATRX.....	pag.32
❖ 3.3.5 TP53.....	pag.33
❖ 3.3.6 IDH1 e IDH2.....	pag.33
❖ 3.3.7 MGMT (O6-methylguanine-DNA methyltransferase) .....	pag.35
❖ 3.3.8 Codelezione 1p/19q.....	pag.36

❖ 3.3.9 Promotore TERT.....	pag.37
❖ 3.3.10 Cromosomi 7/10.....	pag.38
❖ 3.3.11 EGFR (Epidermal growth factor receptor) .....	pag.38
❖ 3.3.12 CDKN2A/B (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B) .....	pag.39
<b>4. Scopo dello studio.....</b>	<b>pag.41</b>
<b>5. Materiali e metodi.....</b>	<b>pag.42</b>
❖ 5.1 Pazienti studiati .....	pag.42
❖ 5.2 Caratteristiche dei pazienti.....	pag.42
❖ 5.3 Follow-up.....	pag.44
❖ 5.4 Analisi statistica.....	pag.45
<b>6. Risultati.....</b>	<b>pag.46</b>
❖ 6.1 Associazione tra marcatori tumorali ed epilessia.....	pag.49
❖ 6.2 Risposta alla terapia.....	pag.49
❖ 6.3 Prognosi: PFS ed OS.....	pag.50
<b>7. Discussione.....</b>	<b>pag.58</b>
❖ 7.1 Limiti dello studio.....	pag.64
<b>8. Conclusioni.....</b>	<b>pag.66</b>
<b>9. Bibliografia.....</b>	<b>pag.67</b>
<b>10. Ringraziamenti.....</b>	<b>pag.76</b>

## INTRODUZIONE

### 1.1 Definizione e classificazione dell'epilessia

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, nel mondo vi sono circa 50 milioni di individui affetti da epilessia, di cui circa 500.000 in Italia, secondo le stime della Lega Italiana contro l'epilessia. L'incidenza dell'epilessia presenta due picchi rispettivamente nel primo anno di vita e nell'età anziana che risultano essere le fasce di età più colpite.<sup>1</sup>

Una crisi epilettica viene definita come la transitoria occorrenza di segni e/o sintomi causati da una abnorme, eccessiva o sincrona attività neuronale cerebrale. L'epilessia è un disturbo cerebrale caratterizzato da una perdurante predisposizione a generare crisi epilettiche e dall'insieme delle conseguenze neurobiologiche, cognitive, psicologiche e sociali legate a questa condizione. La definizione di epilessia richiede l'occorrenza di almeno un attacco epilettico<sup>2</sup>.

La Lega Internazionale contro l'Epilessia (ILAE) ha proposto, nel 2017, una nuova classificazione delle crisi, dell'epilessia, della sindrome epilettica, conferendo molta importanza alle comorbidità che possono accompagnarsi e all'eziologia (Figura 1)<sup>3</sup>.

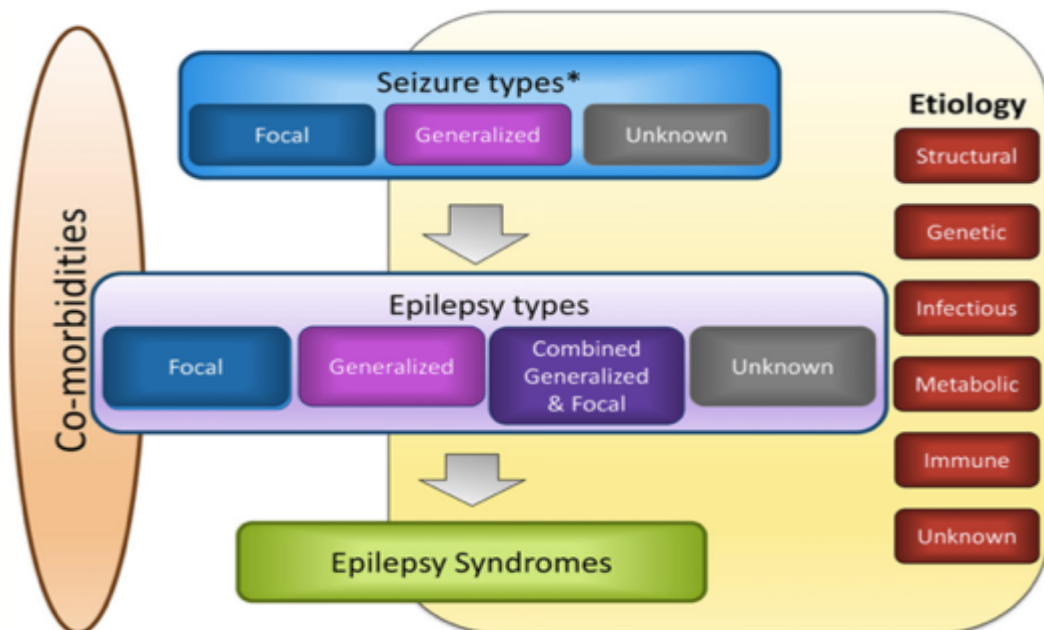


Figura 1: Classificazione delle epilessie, ILAE (2017).

Le crisi focali sono caratterizzate dalla presenza di un'attività neuronale anormale che insorge in una o più aree circoscritte di un singolo emisfero, mentre quelle generalizzate presentano fin dall'inizio un coinvolgimento di entrambi gli emisferi. L'esordio della crisi può passare inosservato o essere poco chiaro, nel qual caso la crisi è ad esordio sconosciuto. <sup>4</sup>

Per quanto riguarda il tipo di epilessia, oltre a quella focale, generalizzata e di origine sconosciuta, esiste un nuovo gruppo di epilessie, definite come “Epilessie Combinate Generalizzate e Focali”, dal momento che alcuni pazienti presentano sia crisi generalizzate che focali (Figura 2).

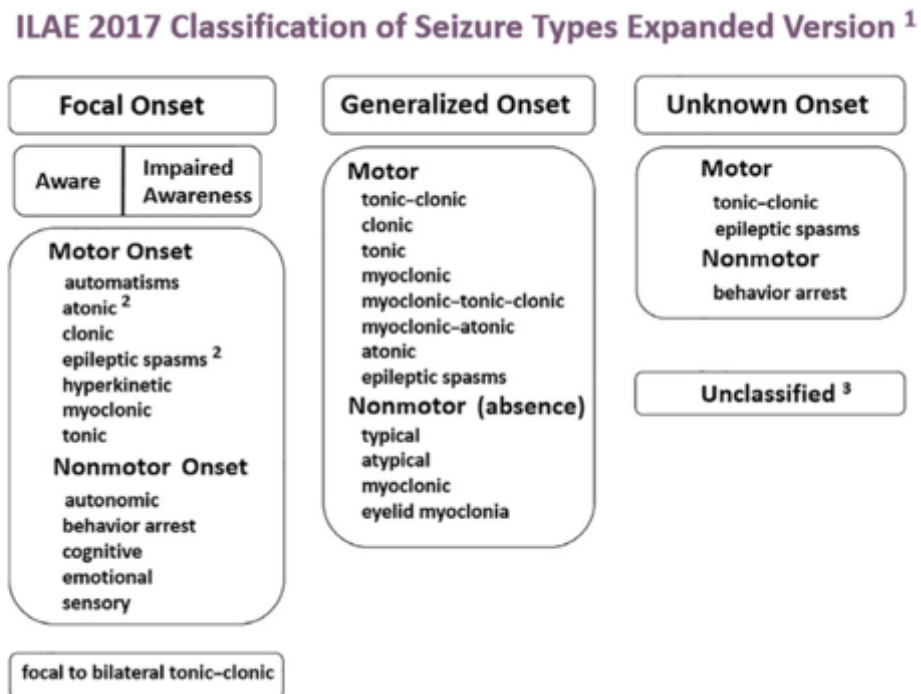


Figura 2: classificazione dei tipi di Epilessia, ILAE 2017.

Le crisi focali vengono suddivise innanzitutto in base alla conservazione o alla perdita della consapevolezza di sé e dell'ambiente o la memoria dell'evento occorso.

Inoltre, le crisi si possono classificare in motorie e non motorie. Infatti, a seconda di dove si trovi il focolaio epilettogeno, la crisi può avere caratteristiche diverse. Per esempio, una crisi focale clonica, che si manifesta con rapide scosse ad un'emifaccia, ad un arto superiore o inferiore, origina verosimilmente da zona epilettogena situata nell'area 4 motoria primaria controlaterale all'emilato colpito; una crisi olfattiva,

caratterizzata da disosmia, cacosmia, insorge invece verosimilmente nell'area 28 del lobo temporale.

Le crisi generalizzate, invece, si accompagnano sempre a perdita di consapevolezza e possono essere motorie o non motorie, come le assenze.

Nel percorso diagnostico dell'epilessia, oltre a considerare le manifestazioni cliniche, è generalmente indicata l'esecuzione di un elettroencefalogramma (EEG; Figura 3), ossia un esame non invasivo che registra l'attività elettrica cerebrale spontanea. Per esempio, il riscontro all'EEG di complessi punta-onda diffuse a 3 Hz può essere indicativo di una forma di epilessia generalizzata a tipo assenza.

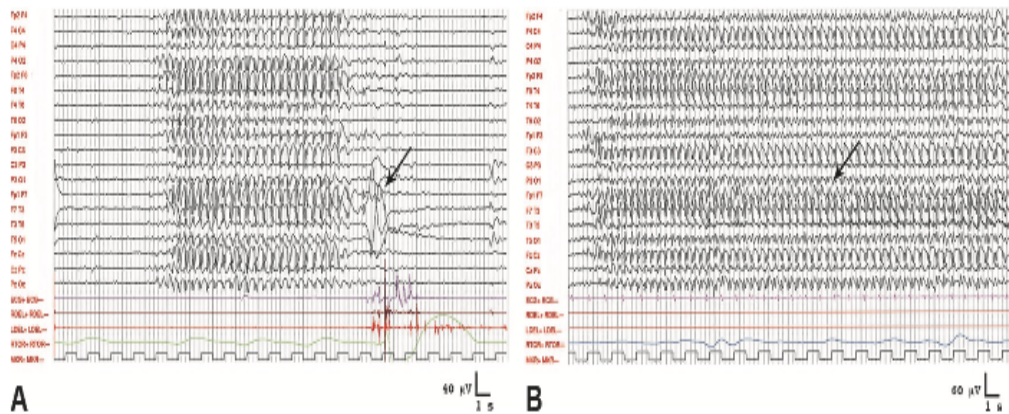


Figura 3. (A) Tracciato elettroencefalografico di un bambino di 7 anni affetto da Epilessia tipo assenza infantile (CAE, Childhood Absence Epilepsy) che mostra un'assenza semplice con scariche punta-onda generalizzate di alto voltaggio a 3 Hz con respiro irregolare e stato di incoscienza. (B) Tracciato di una ragazza di 16 anni con epilessia tipo assenza giovanile (JAE, Juvenile Absence Epilepsy), l'EEG mostra una assenza complessa con scariche punta-onda generalizzate con voltaggio di 3-3,5 Hz associate a perdita di responsività e automatismi oroalimentari e gestuali. <sup>5</sup>

Il terzo livello della classificazione ILAE riguarda la diagnosi di Sindrome Epilettica. Una sindrome epilettica è definita dalla associazione di specifiche caratteristiche che comprendono tipi di crisi e di reperti dell'EEG e delle neuroimmagini. Spesso le sindromi hanno caratteristiche età-dipendenti: età di esordio ed eventualmente di remissione, fattori scatenanti le crisi, le variazioni circadiane e talora la prognosi <sup>3</sup>. Oltre a identificare le caratteristiche generali dell'epilessia, è importante distinguere le crisi non provocate, ossia prive di un evidente rapporto causa-effetto con stimoli

epilettogeni o eventi scatenanti, da quelle sintomatiche, che invece dipendono da cause identificabili temporalmente correlate all'esordio dell'epilessia. Le possibili cause di epilessia sono:

- strutturali: comprendono forme causate da alterazioni strutturali del sistema nervoso centrale, sia geneticamente determinate che acquisite, in cui l'epilessia fa parte di un quadro sintomatologico e clinico più vasto. Alcuni esempi sono le malformazioni dello sviluppo corticale, come la displasia corticale focale, la sclerosi tuberosa, la polimicrogiria, alterazioni di natura vascolare come l'angioma cerebrale, gli aneurismi artero-venosi, la sclerosi ippocampale, lesioni ischemiche-ipossiche sia prenatali che postnatali e le neoplasie cerebrali.

- genetiche: comprendono forme in cui l'alterazione genetica si manifesta senza alterazioni strutturali o metaboliche del sistema nervoso centrale e determina un'epilessia quale unico o predominante disturbo. Fra quelle dovute a un disturbo monogenico vi sono ad esempio le Crisi neonatali familiari benigne (BFNS), dovute a mutazioni del gene KCNQ2, l'Epilessia autosomica dominante notturna del lobo frontale (ADNLFE) associata al gene CHRNA4, le Crisi febbrili plus (GEFS+) il cui gene mutato è SCN1A<sup>4</sup>.

- infettive: meningiti e meningoencefaliti batteriche; encefaliti virali (ad es. varicella, citomegalovirus, HIV, herpes simplex); malaria cerebrale; toxoplasmosi; neuroborreliosi.

- metaboliche: si identificano in questo gruppo sia condizioni dismetaboliche o tossico-carenziali acquisite e/o reversibili, come variazioni della glicemia, della natriemia, della calcemia e della creatininemia, che difetti geneticamente determinati per esempio le encefalopatie mitocondriali, le malattie perossisomiali, il difetto cerebrale di folati e la sindrome MELAS (miopatia mitocondriale, encefalopatia, acidosi lattica e ictus).

- autoimmuni: patologie caratterizzate dalla presenza di anticorpi anti-NMDA, anti-AMPA, anti-GABA, anti-LGI1 ed altri, ma anche la sindrome da malattia celiaca con epilessia e calcificazioni cerebrali.<sup>4</sup> Tuttavia, non sempre si riesce ad identificare un

anticorpo specifico, ma sulla base dei dati clinico-strumentali, si pone comunque la diagnosi di epilessia a genesi autoimmune sieronegativa.

Infine, a prescindere quale che sia la causa, l'epilessia è spesso accompagnata da importanti comorbidità come problemi di apprendimento, disturbi psicologici e comportamentali. Nelle epilessie più gravi, è possibile osservare anche deficit motori, come paralisi cerebrale o disturbo del cammino, disordini del movimento, scoliosi, disturbi del sonno e disturbi gastrointestinali. <sup>2</sup>

## ***2 Epilessia tumorale***

Tra le forme di epilessia sintomatica, vi è l'epilessia correlata ai tumori cerebrali (BTRE, *brain tumor-related epilepsy*), definita dall'ILAE come “*una lesione tumorale cerebrale persistente che causa più di una crisi epilettica*”.<sup>6</sup>

Si tratta di un disturbo la cui complessità ancora oggi costituisce una importante sfida per i medici poiché si ha la compresenza di due patologie che impattano significativamente sulla qualità di vita dei soggetti affetti.

La difficoltà nella gestione di questi pazienti riguarda la terapia, che comprende la chirurgia, la chemioterapia, la radioterapia e i possibili effetti collaterali annessi, ma anche la terapia antiepilettica, non scevra da complicanze.

### ***2.1 Epidemiologia***

Nel 2016, ci sono stati circa 330.000 nuovi casi di tumore primitivo del sistema nervoso centrale e circa 227.000 morti nel mondo. I tre paesi più colpiti in assoluto sono stati la Cina, gli Stati Uniti e l'India.<sup>7</sup> I principali dati epidemiologici riferiti all'Italia sono riassunti nella Tabella 1.



SISTEMA NERVOSO CENTRALE	
<b>Incidenza</b>	Nel 2020, sono state stimate circa 6.100 nuove diagnosi (uomini = 3.500; donne = 2.600). Le stime per il 2021 non sono disponibili
<b>Mortalità</b>	Le stime per il 2021 non sono disponibili
<b>Sopravvivenza netta a 5 anni dalla diagnosi</b>	24% negli uomini e 27% nelle donne
<b>Probabilità di vivere ulteriori 4 anni condizionata ad aver superato il primo anno dopo la diagnosi</b>	Stime non disponibili
<b>Prevalenza</b>	Sono 52.800 le persone viventi in Italia dopo una diagnosi di tumore del sistema nervoso centrale (uomini = 23.500; donne = 29.300)

Tabella 1: "I numeri del cancro in Italia 2021", AIOM. <sup>8</sup>

I tumori del sistema nervoso centrale sono tumori rari, soprattutto se comparati al tumore della mammella o del polmone. <sup>8</sup>

Il tasso di incidenza corretto sull'età dei tumori maligni è di 7.08 per 100.000, mentre quello dei tumori benigni è 16,71 per 100.000. <sup>9</sup>

Si stima che circa il 25-60% dei pazienti con tumore cerebrale sviluppi epilessia, sia come sintomo iniziale sia dopo la diagnosi di tumore, oppure può essere la manifestazione di una recidiva o di progressione di malattia. Infatti, l'epilessia può manifestarsi all'esordio in circa in 15-30% dei casi. <sup>10,11</sup>

Nei tumori primitivi cerebrali, l'incidenza dell'epilessia all'esordio è inversamente correlata al grado istologico del tumore e al grado di malignità, infatti l'incidenza maggiore si ha con i gliomi di basso grado (astrocitoma di grado I e II, oligodendroglioma e i meningiomi, WHO 2016) mentre l'incidenza più bassa si ha con i tumori maligni, soprattutto con il glioblastoma (Tabella 2). <sup>10,12</sup>

Tumor histology	Seizure frequency
Dysembryoblastic neuroepithelial tumor	100%
Ganglioglioma	80–90%
Low-grade astrocytoma	75%
Meningioma	29–60%
Oligodendroglioma	53%
Anaplastic astrocytoma	43%
Glioblastoma multiforme	29–49%
Ependymoma	25%
Metastasis	20–35%
Leptomeningeal tumor	10–15%
Primary CNS lymphoma	10%
Hemangioblastoma	0%
Medulloblastoma	0%
Schwannoma	0%

Tabella 2: correlazione tipo istologico del tumore e frequenza di crisi epilettiche <sup>13</sup>

## 2.2 Epilettogenesi nei tumori cerebrali, diagnosi, correlazioni cliniche

La fisiopatologia dell'epilessia correlata ai tumori cerebrali è un meccanismo molto complesso e ancora oggi non ben chiarito, considerando che molti meccanismi patogenetici sono alla base di entrambi i disturbi; infatti, vi è una interazione bidirezionale tra l'attività neuronale e la crescita tumorale.

Il tempo richiesto affinché si sviluppi il processo di epilettogenesi, quindi la creazione di un focolaio in grado di generare attività epilettiforme a partire da tessuto cerebrale sano, dipende dalle caratteristiche della lesione alla base. Infatti, il trauma cranico, lo stroke, la meningite o un tumore cerebrale inducono un danno cerebrale che può associarsi a fenomeni di gliosi, alterazioni della plasticità neuronale, infiammazione, perdita di neuroni, riorganizzazione molecolare ma anche variazioni nella trascrizione genica, tutte condizioni che favoriscono l'instaurarsi dell'epilessia.<sup>14</sup>

Nei tumori, lo sviluppo della Brain tumor-related epilepsy (BTRE) è soprattutto legato all'istologia, alla localizzazione, all'estensione topografica tumorale, al microambiente della barriera emato-encefalica, alle alterazioni dell'omeostasi dei neurotrasmettitori, come il glutammato ma anche gli ioni, come il potassio, e alle disregolazioni delle giunzioni cellulari.<sup>15</sup>

### *2.2.1 Istologia e localizzazione*

I tumori di basso grado che crescono lentamente e invadono il tessuto cerebrale sano circostante, come i tumori neuroepiteliali disembrionari (DNET) e gli astrocitomi di grado II, hanno un'incidenza maggiore di epilessia poiché dispongono di più tempo per creare un focolaio epilettogeno, che necessita di riorganizzazione neuronale, neovascolarizzazione e squilibri neurotrasmettitoriali.<sup>16,15</sup> Le lesioni di alto grado invece, come il glioblastoma multiforme, si associano meno frequentemente all'epilessia. In questi tipi di tumori si ipotizza che l'epilettogenesi sia legata al danno del tessuto sano dovuto alla necrosi e alla deposizione di emosiderina causati dal tumore.<sup>13,15</sup>

I meccanismi epilettogenici coinvolti nelle lesioni tumorali sono sicuramente multifattoriali, però non comprendono alterazioni fisiologiche solo delle cellule neoplastiche, ma anche del tessuto peritumorale. Infatti, quest'ultimo presenta caratteristiche diverse rispetto al tessuto sano, per esempio, vi può essere un ridotto livello di N-Acetil-aspartato, indice di densità neuronale e assonale, dimostrabile con la spettroscopia RM.<sup>17</sup>

Inoltre, la localizzazione tumorale rappresenta uno dei più importanti aspetti da considerare nell'epilettogenesi. I tumori corticali che coinvolgono la corteccia frontale, temporale, parietale si associano più frequentemente all'epilessia rispetto alle lesioni della regione infratentoriale, la regione suprasellare o il lobo occipitale.<sup>13,15</sup>

### 2.2.2 Ipossia, *ph*, forza ionica

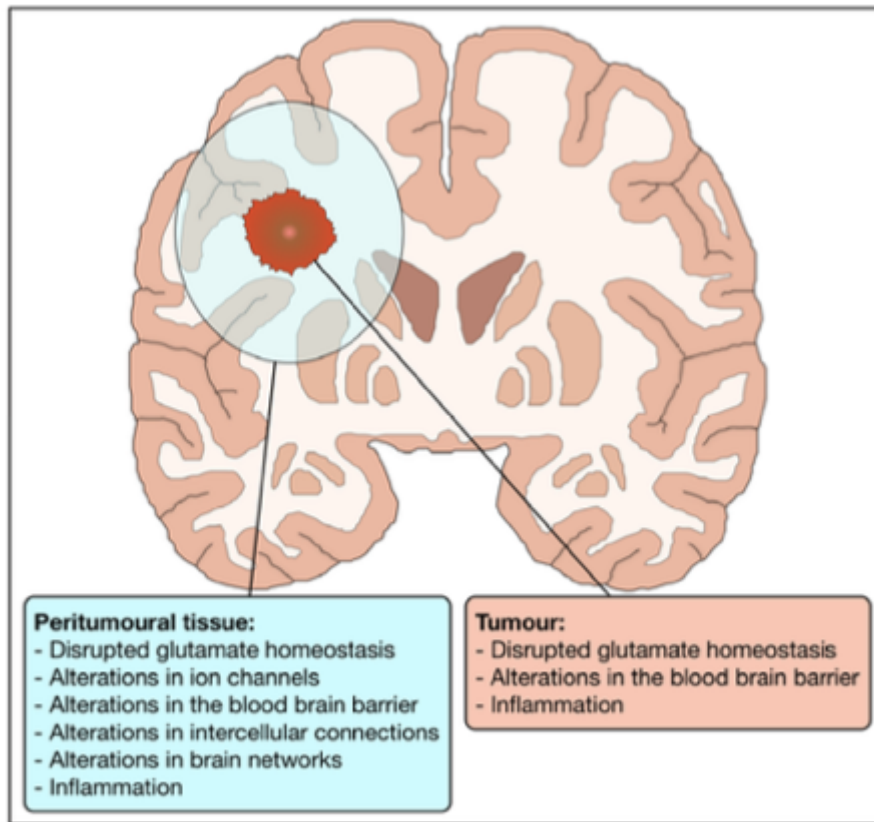


Figura 4: rappresentazione semplificata delle alterazioni che sviluppano a livello tumorale e nel tessuto peritumorale. <sup>22</sup>

L'ipossia tumorale insorge nel momento in cui l'apporto vascolare è insufficiente per la richiesta metabolica. Questo squilibrio comporta il catabolismo del glucosio con la conseguente produzione di acido lattico e quindi di una riduzione del pH soprattutto nei tessuti metabolicamente attivi. Gli astrocitomi di alto grado molto spesso hanno bassi livelli di mediatori molecolari del metabolismo ossidativo mentre possiedono una maggiore espressione costituzionale di enzimi glicolitici. <sup>18</sup>

L'ipossia e l'acidosi riscontrati negli astrocitomi non sono eventi fisiologici nel sistema nervoso e l'acidosi può estendersi all'ambiente peritumorale (Figura 4) favorendo l'insorgenza di uno stato edematoso delle cellule gliali. <sup>19</sup>

Inoltre, in condizioni di acidosi, le membrane delle cellule degli astrocitomi sono maggiormente suscettibili alle correnti in entrata di sodio, determinando l'attivazione dei canali del sodio (e dunque la depolarizzazione cellulare) che, in condizioni

fisiologiche, sono regolati allostericamente dalle isoforme  $\beta 1$  e  $\beta 2$  della proteina chinasi C negli astrociti, mentre nelle cellule maligne, queste proteine sono assenti.<sup>20</sup>

Le variazioni della concentrazione degli ioni e in particolare un aumento di sodio e calcio nella zona peritumorale, contribuiscono all'eccitabilità neuronale.<sup>13</sup>

Gli effetti dell'ipossia includono la formazione di radicali liberi, l'aumentata espressione del gene HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ) e il danno diretto al DNA. In particolare, si ha un'alterazione dei meccanismi di riparazione del danno.<sup>13</sup>

L'HIF regola diversi geni bersaglio, come quello del vascular endothelial growth factor (VEGF), dell'endotelina 1, dell'eritropoietina (EPO), della transferrina, della cicloossigenasi 1 (COX-1) e dei trasportatori 1 e 3 de glucosio. Il fattore più importante nella progressione da astrocitoma a glioblastoma sembra essere proprio il VEGF, la cui trascrizione aumenta notevolmente in condizione di ipossia. Inoltre, diversi pro-oncogeni, oncosoppressori, come PTEN e numerose vie di segnalazione intracellulare convergono per regolare lo stesso HIF e in particolare tra queste, vi è la via del PI3K (fosfatidilinositolo-3-chinasi), un enzima che favorisce un aumento dell'espressione di HIF (Figura 5).<sup>20</sup>

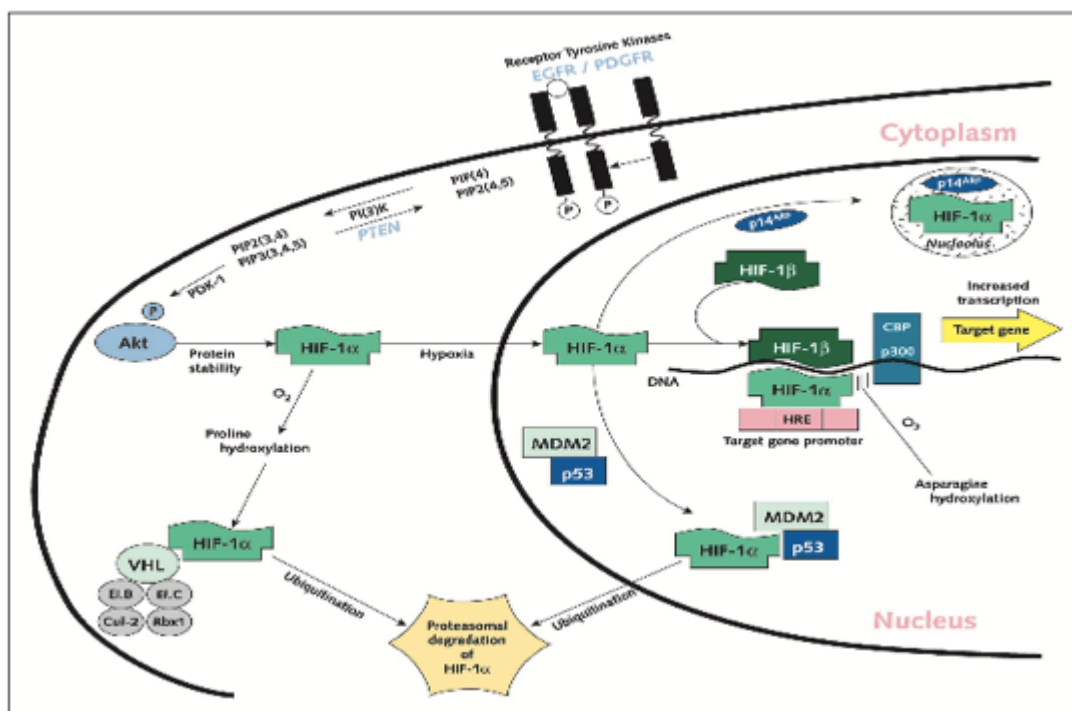


Figura 5: Rappresentazione schematica degli effetti di oncosoppressori, oncogeni, vie di segnalazione intracellulare sulla trascrizione del gene HIF nei gliomi maligni. In presenza di ossigeno, l'HIF-1 $\alpha$  viene idrossilato

a livello della prolina 564 e ciò favorisce l'ubiquitinazione mediata dalla proteina VHL (von Hippel-Lindau) e quindi la degradazione nel proteasoma di HIF-1 $\alpha$ . In condizioni di ipossia, HIF-1 $\alpha$  non viene eliminato, ma dimerizza con HIF-1 $\beta$ , si lega a HRE (hypoxia-responsive element) e promuove la trascrizione genica. PTEN, TP53, EGFR (epidermal growth factor receptor), PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) sono alterati durante la progressione a glioblastoma e permettono un'aumentata trascrizione dei geni target di HIF, come VEGF.<sup>20</sup>

Un altro ione da considerare nel processo dell'epilettogenesi è il ferro, il cui accumulo a livello extracellulare dovuto all'emorragia tumorale e la produzione di specie radicaliche dell'ossigeno, potrebbero causare un danno perossidativo e comportare una destabilizzazione della membrana neuronale. Inoltre, è già stato dimostrato che alterazioni nel metabolismo del ferro sono coinvolte nella patogenesi dell'epilessia del lobo temporale, della sclerosi ippocampale e dello stato epilettico.

21

Infine, nella BTRE, vi è anche un coinvolgimento del co-trasportatore potassio-cloro, il KCC2, che risulta essenziale nel mantenimento del gradiente di cloro fra i neuroni e nel regolare la funzione gabaergica. Nei gliomi si hanno delle alterazioni nell'espressione di questo canale, mentre nel tessuto peritumorale si può osservare una downregolazione di KCC2, che sembra essere una condizione favorente per le convulsioni spontanee. Quest'evenienza potrebbe essere dovuta al fatto che una ridotta espressione di KCC2 determina un aumento dei livelli del cloro intracellulare che altera la capacità inibitoria del GABA, favorendo quindi un aumento dell'eccitabilità neuronale e una riduzione della soglia epilettogena.<sup>22</sup>

### *2.2.3 Infiammazione e gliosi*

Numerosi studi hanno dimostrato che uno dei meccanismi alla base dell'epilessia è l'infiammazione. Infatti, le cellule gliali, come gli astrociti e la microglia, producono molecole pro-infiammatorie che contribuiscono anche a regolare l'eccitabilità neuronale. L'interleuchina 1 $\beta$ , fattori del complemento, i toll-like receptors sono iperespressi nell'epilessia del lobo temporale, nell'epilessia secondaria a displasia corticale, nella sclerosi tuberosa ma anche in patologie tumorali, come i gangliogliomi o i DNET.<sup>14,23</sup>

Inoltre, il rilascio di glutammato dagli astrociti è controllato dal tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e dalle prostaglandine, suggerendo che la comunicazione tra i neuroni e la

glia è sensibile ai cambiamenti nella produzione di mediatori dell'inflammatione che insorgono in condizioni patologiche, come nei tumori, ma anche nella malattia di Alzheimer, nell'AIDS dementia complex e nella sclerosi laterale amiotrofica. <sup>24</sup>

Uno studio del 2014 <sup>25</sup> ha dimostrato, utilizzando diverse tecniche come la real-time PCR, l'ELISA e l'immunoistochimica, che il glioblastoma produce enormi quantità di Interleuchina 1 (IL-1). Essa rappresenta uno dei più potenti induttori delle metalloproteinasi della matrice (MMPs), ossia fattori che favoriscono l'invasione e del VEGF, che invece promuove l'angiogenesi. Sempre a sostegno dell'ipotesi neuro-inflammatoria, è stato visto che i farmaci antinfiammatori non steroidei sono in grado di inibire la PGTS2 (Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2), riducendo così l'attivazione della via dei prostanoidi, della microglia, limitando l'infiltrazione leucocitaria, inibendo il rilascio di citochine proinfiammatorie e la neurodegenerazione. <sup>26</sup>

Per quanto riguarda invece la gliosi, ossia un processo riparativo che consegue alla distruzione delle cellule nervose, bisogna considerare che la sovraregolazione dei filamenti intermedi e in particolare della proteina acida fibrillare gliale (GFAP) è un fenomeno mediato dagli astrociti reattivi e dalla microglia attivata nelle aree lesionali ed epilettogene. La GFAP può quindi essere usata come marcatore dell'epilessia focale oltre che marcatore immunoistochimico dei tumori cerebrali. A prescindere dal tipo di lesione, gli astrociti reagiscono aumentando la sintesi di questa proteina e della vimentina, un altro marker astrocitario. <sup>14</sup>

#### 2.2.4 Neurotrasmettitori

Un neurotrasmettitore importante coinvolto nell'epilessia è il glutammato, un amminoacido eccitatorio che agisce sulle membrane post-sinaptiche interagendo sia con i recettori metabotropici che ionotropici. Alcuni studi hanno dimostrato che la quantità di glutammato presente nel tessuto epilettogeno è superiore rispetto a quella presente in condizioni fisiologiche.<sup>13</sup>

Nei terminali presinaptici dei neuroni glutammatergici, il glutammato viene prodotto a partire dalla glutammina tramite l'azione dell'enzima glutamminasi e poi viene veicolato da alcuni trasportatori (VGLUT) nelle vescicole sinaptiche. Dopo essere stato rilasciato dai neuroni glutammatergici, il glutammato viene rimosso dallo spazio intersinaptico dagli astrociti circostanti o dai neuroni presinaptici attraverso i trasportatori di amminoacidi eccitatori (EAATs) tramite un meccanismo ATP e sodio dipendente. Ciò che è interessante in questo contesto è che le cellule dei gliomi non effettuano un corretto re-uptake del glutammato nonostante alcune tipologie tumorali posseggano gli EAATs. Infatti, nei tumori di alto grado vi è proprio una carenza di questi trasportatori, in particolare del EAAT2, che è quello più efficiente, a differenza dei tumori di basso grado o degli astrociti sani. Inoltre, la presenza della glutammina sintetasi nelle cellule tumorali suggerisce che i gliomi possono produrre glutammina e usarla come fonte di energia per la necessità metaboliche.<sup>27</sup>

Sembra che la concentrazione aumentata di glutammato nel tessuto peritumorale sia dovuta all'attività del sistema X<sub>c</sub>, un trasportatore sodio indipendente glutammato-cisteina. Possiede una subunità catalitica (xCT) e una regolatoria (CD98), entrambe espresse anche dalle cellule tumorali. Fondamentalmente questo sistema importa la cisteina per la sintesi di glutatione, un antiossidante, scambiandola con il glutammato, che quindi viene rilasciato all'esterno delle cellule. Uno dei meccanismi alla base dell'ipereccitabilità neuronale peritumorale e della maggior propensione all'epilessia è proprio il rilascio massivo di glutammato dalle cellule gliomatose attraverso il sistema X<sub>c</sub> (Figura 6). Inoltre, è stato dimostrato che gli astrociti peritumorali che normalmente rimuovono e catabolizzano il glutammato extracellulare, sono sopraffatti dal glutammato prodotto dal tumore.<sup>28</sup>



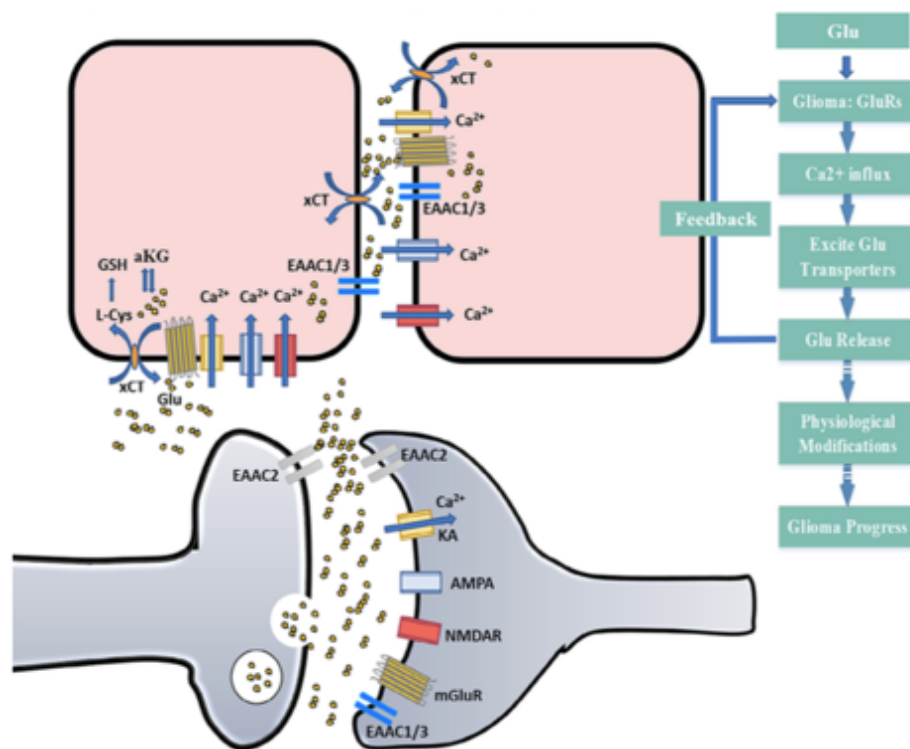


Figura 6: Ipotesi modello dell'attivazione conseguenziale indotta dal glutammato che verosimilmente stimola la crescita tumorale. <sup>27</sup>

I recettori del glutammato vengono suddivisi in due tipi principali. I primi sono i recettori glutammatergici ionotropici (iGluRs), che includono a loro volta i recettori NMDA, gli AMPA ed i recettori del kainato. I secondi sono quelli metabotropici (mGluRs), suddivisi in tre gruppi. L'attivazione sia dei iGluRs che mGluRs contribuisce non solo alla proliferazione gliale e all'astrogliosi, ma anche alla regolazione della proliferazione, migrazione, differenziazione e sopravvivenza delle cellule. Infatti, attraverso il rapido aumento del calcio intracellulare, i recettori del glutammato favoriscono la divisione cellulare e modifiche intracellulari sia in vitro che in vivo. <sup>29</sup>

In aggiunta alla capacità di promuovere l'oncogenesi e modificare il metabolismo delle cellule tumorali, questi recettori influenzano il microambiente tumorale per facilitare la progressione dei gliomi. Per esempio, è stato dimostrato che vi sono delle connessioni sinaptiche specifiche tra il glioma e i neuroni. Inoltre, è stato suggerito che i recettori AMPA, nelle cellule tumorali, permettano l'attivazione dei

microtubuli, rafforzando così la comunicazione con il tessuto circostante e quindi la crescita del tumore.<sup>27</sup>

Vista l'importanza che il glutammato e i suoi recettori rivestono nella BTRE, si è pensato di utilizzare dei farmaci specifici per limitare l'azione di questo neurotrasmettitore. Uno studio italiano del 2020 ha dimostrato che il Perampanel, un antagonista non competitivo selettivo del recettore ionotropico del glutammato AMPA sui neuroni post-sinaptici, è efficace nel ridurre le crisi nei pazienti tumorali ed è anche ben tollerato.<sup>30</sup> Inoltre, sembra che il Perampanel abbia un effetto sinergico con la Temozolomide, un agente alchilante usato come prima linea di terapia nei tumori di origine gliale, favorendo infatti l'inibizione della crescita e inducendo l'apoptosi delle cellule tumorali.<sup>31</sup>

In più, è stato scoperto che bassi livelli di mGluR3 nei pazienti con glioblastoma correlano con una migliore risposta alla Temozolomide perché questi recettori riducono la tossicità del chemioterapico inibendo la via fosfatidil-inositolo-3-chinasi (PI3K) / fattore-nucleare- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) che supporta l'espressione della MGMT (O-6 metilguanina-DNA transferasi), un enzima che conferisce resistenza contro gli agenti alchilanti il DNA.<sup>32</sup> Infatti, la temozolomide esplica la sua azione citotossica attraverso l'alchilazione della O6-guanina che comporta mutazioni intratumorali o il cross-linking del DNA e l'arresto del ciclo cellulare.<sup>33</sup>

Un altro fattore molto importante nell'epilettogenesi è il GABA (acido  $\gamma$ -amminobutirrico), uno dei principali neurotrasmettitori inibitori del sistema nervoso centrale. La tipologia più comune di recettore del GABA è il canale GABA-A, ossia un canale del cloro pentamerico ligando-dipendente che richiede la presenza della molecola inibitrice per aprirsi. Tutti i neuroni contengono i canali ionici GABA-A ma è stato scoperto che i vari sottotipi del recettore variano durante lo sviluppo cerebrale. Cambiano anche in base alla regione encefalica e al tipo differente di cellula nervosa. Inoltre, il GABA sembra essere coinvolto nella regolazione della crescita di diversi tipi di cellula, sia le cellule staminali nervose che anche quelle tumorali.<sup>34</sup>

Infatti, i recettori GABA-A si possono riscontrare nei gangliogliomi, ma anche in gliomi in cui la risposta al GABA è correlata con il grado di malignità del tumore,

ossia sembrerebbe che i recettori per questo neurotrasmettitore siano presenti solo nei tumori di basso grado (WHO 2016, grado II), mentre sono praticamente assenti nei glioblastomi, supportando quindi anche l'ipotesi che l'assenza degli stessi si associa a una crescita incontrollata del tumore.<sup>35</sup>

Uno studio francese del 2014 ha evidenziato un'altra caratteristica sorprendente del GABA. Valutando i networks, le cellule e le vie di segnalazione epilettogeniche su preparati istologici di tessuto peritumorale cerebrale, è emerso che l'attività interictale dipende sia dalla trasmissione mediata dai recettori AMPA glutammatergici che dal signaling gabaergico depolarizzante. Infatti, il GABA rilasciato dagli interneuroni depolarizza gran parte delle cellule piramidali, nelle quali l'omeostasi del cloro è alterata a causa dei cambiamenti nell'espressione dei cotrasportatori del cloro neuronali dovuti all'oncogenesi. Vi è pertanto una riduzione dei KCC2 (cotrasportatore potassio-cloro 2) e un aumento dell'espressione del NKCC1 (cotrasportatore sodio-potassio-cloro 1). Quindi, l'attività epilettica è sostenuta anche dagli effetti eccitatori che il GABA possiede nella neocorteccia peritumorale. Pertanto, il controllo della concentrazione del cloro nei neuroni e nelle cellule tumorali potrebbe rappresentare un target terapeutico per i pazienti con gliomi epilettogenici.<sup>36</sup>

#### *2.2.5 Comunicazione intercellulare e alterazioni della barriera emato-encefalica*

La comunicazione intercellulare tra cellule gliali adiacenti avviene grazie a emicanali costituiti da proteine transmembrana note come connesine (CX). Le giunzioni strette degli astrociti contengono le CX43, gli oligodendrociti esprimono le CX32 e i neuroni contengono le CX26 e le CX32. Queste molecole fondamentalmente permettono il passaggio di ioni e partecipano al mantenimento del potenziale di membrana.<sup>13</sup>

L'immunoreattività per la CX32 è stata osservata nella componente neuronale dei gliomi e in tutti gli oligodendrogliomi, indipendentemente dal grado di differenziazione. La CX43 è espressa anche negli astrocitomi e nella componente astrogliale dei gliomi. Inoltre, la corteccia perilesionale epilettogenica che circonda i

tumori di basso grado contiene astrociti reattivi che esprimono elevati livelli di CX43. Queste comunicazioni aberranti possono risultare deleterie perché, propagando l'onda di depolarizzazione mediata dal calcio, contribuiscono a diffondere l'attività epilettica a distanza.<sup>37</sup>

Inoltre, è interessante anche il fatto che i gliomi di alto grado si associano a una localizzazione intracitoplasmatica aberrante della CX43. Queste proteine giunzionali risultano non funzionanti e potrebbero rappresentare uno dei motivi per cui questi pazienti hanno un rischio minore di sviluppare epilessia rispetto a quelli con tumori di basso grado.<sup>13</sup>

Un'altra struttura coinvolta nei fenomeni di epilettogenesi è la barriera emato-encefalica (BEE), ossia un sistema endoteliale specializzato che protegge l'encefalo da sostanze tossiche, permette il trasporto di nutrienti per i neuroni e le cellule gliali e che rimuove componenti patogene immettendole nella circolazione ematica. L'interazione tra astrociti e cellule endoteliali mantiene l'integrità della barriera, grazie anche all'aiuto di elementi come il fattore neurotrofico derivato dalla glia, fattore di crescita trasformante beta (TGF $\beta$ ), il fattore di crescita fibroblastico e l'angiopoietina 1. La perdita di integrità della BEE favorisce l'epilessia ma rappresenta anche un danno dovuto a un'attività epilettica incontrollata.<sup>13</sup>

Inoltre, un'alterazione della BEE costituisce un marker di attivazione astrocitaria. Infatti, vi è una correlazione tra le variazioni della permeabilità di barriera durante la convulsione e la disregolazione degli astrociti. In particolare, l'influsso di albumina sierica da parte degli astrociti è seguito dalla sovraespressione della GFAP (proteina fibrillare acida della glia). La trasformazione di queste cellule nervose indotta dall'albumina è mediata soprattutto dal recettore 2 del TGF $\beta$ , la cui attivazione permette cambiamenti a livello trascrizionale che portano a una downregolazione dell'influsso di potassio attraverso il canale Kir 4.1 e anche dell'acquaporina 4 (AQP4). Di conseguenza, si avrà un edema degli astrociti con ridotta eliminazione di glutammato e potassio a livello extra-cellulare e quindi uno stato di aumentata eccitabilità.<sup>38</sup>

Vi sono anche delle alterazioni molecolari indotte dai tumori cerebrali che affliggono la BEE, come per esempio la riduzione dell'espressione di proteine giunzionali

transmembrana o un maggior rilascio di agenti vasoattivi come il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF). Questo mediatore della permeabilità microvascolare porta alla fosforilazione delle proteine giunzionali nei tumori di basso grado causando un importante cambiamento strutturale, l'apertura delle giunzioni strette e quindi una diffusione del tumore. Inoltre, la diffusione di VEGF nello spazio peritumorale può aggravare l'edema perilesionale.<sup>39,40</sup>

### 3 I tumori cerebrali

#### 3.1 classificazione WHO 2016

<b>Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours</b>	
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	9400/3
Gemistocytic astrocytoma, IDH-mutant	9411/3
<i>Diffuse astrocytoma, IDH-wildtype</i>	9400/3
Diffuse astrocytoma, NOS	9400/3
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	9401/3
<i>Anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype</i>	9401/3
Anaplastic astrocytoma, NOS	9401/3
Glioblastoma, IDH-wildtype	9440/3
Giant cell glioblastoma	9441/3
Gliosarcoma	9442/3
<i>Epithelioid glioblastoma</i>	9440/3
Glioblastoma, IDH-mutant	9445/3*
Glioblastoma, NOS	9440/3
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	9385/3*
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9450/3
Oligodendroglioma, NOS	9450/3
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9451/3
<i>Anaplastic oligodendroglioma, NOS</i>	9451/3
<i>Oligoastrocytoma, NOS</i>	9382/3
<i>Anaplastic oligoastrocytoma, NOS</i>	9382/3
<b>Other astrocytic tumours</b>	
Pilocytic astrocytoma	9421/1
Pilomyxoid astrocytoma	9425/3
Subependymal giant cell astrocytoma	9384/1
Pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3

Tabella 3: Classificazione dei tumori del Sistema Nervoso Centrale WHO 2016, in particolare sezione inerente ai tumori oligodendrogliali e astrocitici diffusi.<sup>41</sup>

La classificazione dei tumori del SNC WHO del 2016 (Tabella 3) fu la prima che iniziò a sottolineare l'importanza che ha il genotipo di un tumore, il quale andrebbe sempre comparato all'istologia, dando origine così alla prima classificazione isto-

molecolare del SNC. Il dato molecolare oggi è imprescindibile per una corretta classificazione delle varie entità nosologiche. Grazie a questa innovazione era stato possibile iniziare a differenziare l'oligoastrocitoma, una categoria diagnostica molto difficile da definire e spesso oggetto di disaccordo. Usando quindi sia il genotipo (presenza della mutazione dell'IDH e stato della codelezione 1p/19q) che il fenotipo, si poteva distinguere l'astrocitoma (IDH mutato, ATRX mutato, 1p/19q wild-type) dall'oligodendroglioma (IDH mutato, ATRX wild-type, codelezione 1p/19q).<sup>42</sup>

Questo sistema di fatto non ha permesso però di eliminare possibili risultati discordanti, come per esempio la presenza di un glioma diffuso che istologicamente sembra di origine astrocitaria ma esprime la mutazione IDH e la codelezione 1p/19q oppure un oligodendroglioma con mutazione di IDH, ATRX, 1p/19q wild-type. In questi casi, bisogna privilegiare il genotipo, anche se l'aspetto istologico non può essere tralasciato del tutto perché esistono appunto tumori che non riflettono totalmente i criteri immunoistochimici diagnostici.<sup>41</sup>

Per quanto riguarda la nomenclatura, nel 2016, si utilizzavano il nome istologico seguito dalle caratteristiche genetiche, per esempio "Astrocitoma diffuso, IDH-mutato", oppure anche le caratteristiche molecolari se fondamentali, come ad esempio "Oligodendroglioma, IDH mutato, con codelezione 1p/19q". Per i tumori con informazione insufficienti per essere assegnati a una specifica categoria o se mancanti di una mutazione diagnostica, si usava la designazione "NOS" (not otherwise specified). Inoltre, il grado veniva indicato con numeri romani (Tabella 4).

41

<b>Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours</b>	
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	II
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	III
Glioblastoma, IDH-wildtype	IV
Glioblastoma, IDH-mutant	IV
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	IV
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	II
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	III
<b>Other astrocytic tumours</b>	
Pilocytic astrocytoma	I
Subependymal giant cell astrocytoma	I
Pleomorphic xanthoastrocytoma	II
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	III

Tabella 4: Grading dei tumori oligodendrogliali e astrocitari, WHO 2016.

### *3.1.1 Gliomi Diffusi*

In passato, tutti i tumori astrocitari venivano raggruppati nella stessa categoria, mentre nel 2016 si è deciso di unire insieme tutti i gliomi diffusamente infiltranti (ossia tumori che invadono l'encefalo coinvolgendo tre o più lobi cerebrali, che hanno frequentemente una crescita bilaterale e anche un'estensione alle strutture infratentoriali), basandosi sul pattern di crescita, sul comportamento biologico del tumore ma soprattutto sulle mutazioni genetiche di IDH1 e IDH2. Questa scelta risulta fondamentale per avere una classificazione che comprenda sia il fenotipo che il genotipo, che permetta di assimilare tumori che esprimono marcatori prognostici simili e poi che consenta di guidare la terapia valutando la specie biologica e genetica. I gliomi diffusi comprendono gli astrocitomi di grado II e III, gli oligodendrogliomi di grado II e III e il glioblastoma di grado IV (Figura 8). Vengono pertanto separati quei tumori che hanno un pattern di crescita più circoscritto, come quelli con mutazione di BRAF (astrocitoma pilocitico, xantoastrocitoma pleomorfo) e con mutazione di TSC1/TSC2 (astrocitoma subependimale a cellule giganti).

### *3.1.2 Astrocitoma diffuso e astrocitoma anaplastico*

Gli astrocitomi diffusi di grado II e gli astrocitomi anaplastici di grado III vengono suddivisi ulteriormente in IDH mutati, IDH wild-type e NOS. La maggior parte di questi tumori risulta IDH mutato. Si considerano wild-type se l'immunoistochimica è negativa sia per il codone 132 di IDH1 che per il codone 172 di IDH2. A tal proposito, è importante considerare che gli astrocitomi diffusi IDH wild-type sono molto rari e in questi casi è fondamentale rivalutare il paziente perché in realtà potrebbe trattarsi di un tumore di basso grado, come un ganglioglioma, allo stesso modo per l'astrocitoma anaplastico IDH wild-type, che invece potrebbe essere un glioblastoma di IV grado.<sup>43</sup> Se la valutazione dell'IDH non fosse possibile o non potesse essere eseguita, per esempio per insufficiente quantità di materiale, la diagnosi finale sarà astrocitoma diffuso NOS o astrocitoma anaplastico NOS.

Per quanto riguarda la prognosi degli astrocitomi diffusi di grado II e di quelli anaplastici, questa risulta essere molto diversa. I primi presentano un tempo di sopravvivenza media di circa 5.6 anni, mentre i secondi 1.6 anni. <sup>44</sup>

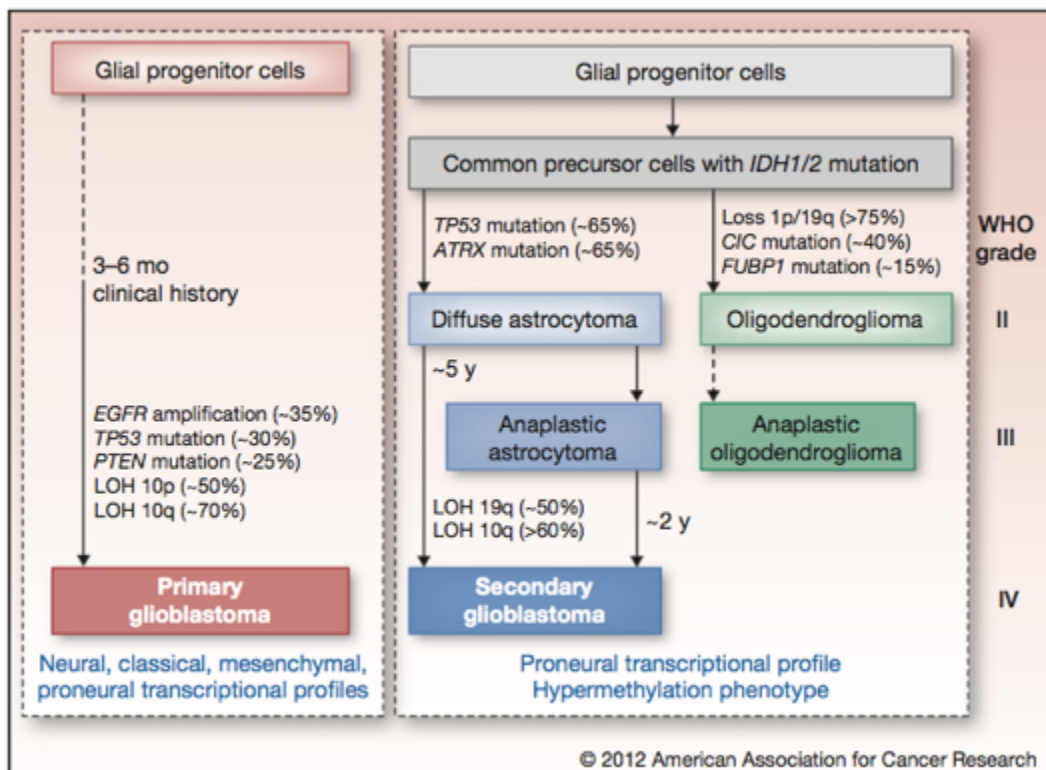
### *3.1.3 Oligodendroglioma*

La diagnosi di oligodendroglioma e oligodendroglioma anaplastico richiede sia la mutazione del gene della famiglia IDH, sia la perdita completa del braccio corto del cromosoma 1 (1p) che del braccio lungo del cromosoma 19 (19q). Anche in questo contesto risultano necessarie le indagini di immunohistochimica per la ricerca della positività del codone 132 di IDH1 o 172 di IDH2 e in assenza di queste mutazioni, soprattutto della codelezione, l'oligodendroglioma viene diagnosticato come NOS. In presenza di un oligodendroglioma anaplastico che non ha risultati genetici diagnostici, è necessario indagare ulteriormente il caso visto che potrebbe trattarsi di un glioblastoma. <sup>45</sup>

### *3.1.4 Glioblastoma*

La classificazione del 2016 suddivide il glioblastoma in tre categorie. La prima comprende il glioblastoma IDH wild-type (tipologia più frequente), che origina de novo per cui rappresenta la forma primaria ed è predominante nei pazienti con un'età media di 55 anni. La seconda categoria riguarda invece il glioblastoma IDH mutato (rappresenta circa il 10% dei casi), ossia la forma secondaria che deriva da un glioma diffuso di basso grado e solitamente colpisce soggetti più giovani. L'ultima categoria è quella del glioblastoma NOS, ossia quelle entità per cui una valutazione molecolare completa non è stata fatta (Figura 7). <sup>46</sup>





*Figura 7:* Differenza tra il glioblastoma primario e quello secondario. Il primario, IDH wild-type, insorge de novo, ha una frequenza del 90%, l'età media alla diagnosi è di circa 62 anni, presenta una OS (overall survival) di circa 15 mesi (per i pazienti che hanno fatto chirurgia, radioterapia e chemioterapia), solitamente ha localizzazione sopratentoriale, necrosi estensiva; si associa alla mutazione del promotore TERT (72% dei casi), della p53 (30%), ATRX (molto rara), amplificazione di EGFR (35%) e mutazione di PTEN (25%). Il glioblastoma secondario, IDH mutato, presenta come lesione precursore l'astrocitoma diffuso o quello anaplastico, ha una frequenza del 10%, l'età media alla diagnosi è di 44 anni, l'OS è di 31 mesi (per i pazienti che hanno fatto chirurgia, radioterapia e chemioterapia), solitamente ha localizzazione a livello del lobo frontale, presenta necrosi limitata; per quanto riguarda le mutazioni, vi sono quella del promotore TERT (26% dei casi), p53 (81%), ATRX (71%), amplificazione di EGFR e mutazioni di PTEN sono molto rare.<sup>41,46</sup>

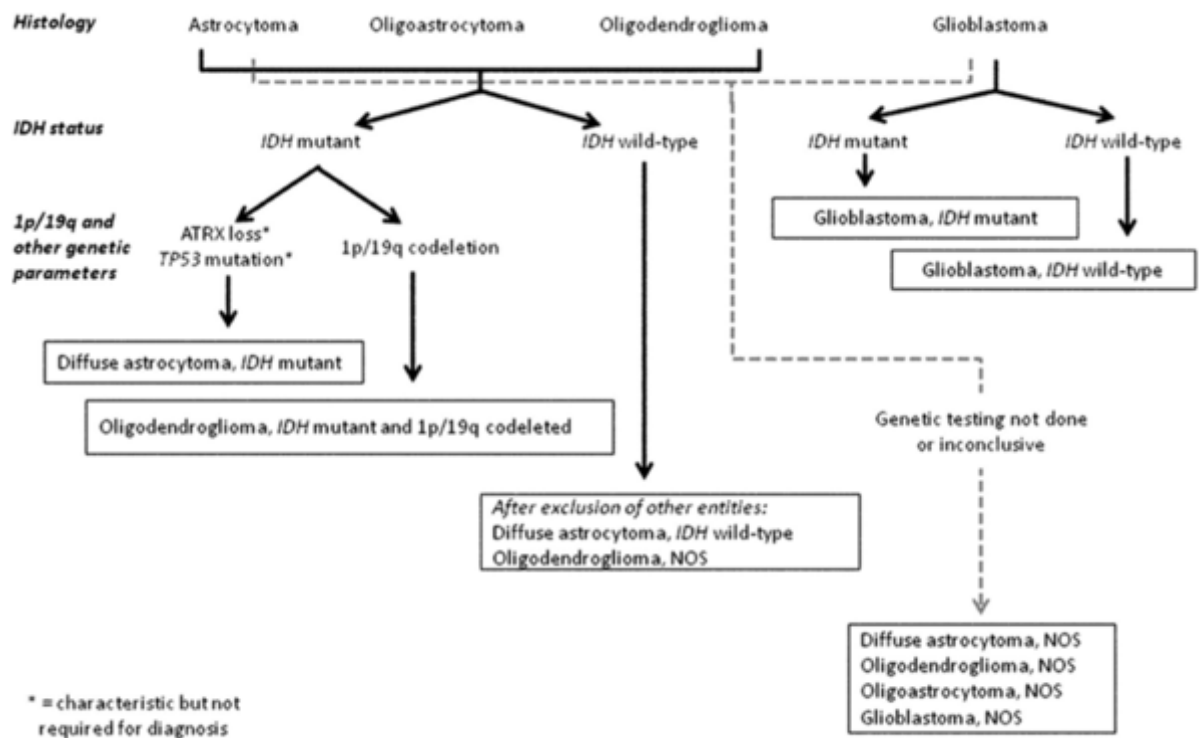


Figura 8: schema riassuntivo della classificazione dei gliomi diffusi basato sulle caratteristiche istologiche e genetiche. <sup>41</sup>

### 3.2 Classificazione WHO 2021

La quinta edizione della classificazione WHO dei Tumori del Sistema Nervoso Centrale, pubblicata nel 2021 (Tabella 5), introduce nuovi importanti cambiamenti soprattutto per quanto riguarda il ruolo della diagnostica molecolare, alla quale viene data maggiore evidenza rispetto alla precedente classificazione del 2016.

Innanzitutto, sono state apportate delle modifiche per quanto riguarda la terminologia: l'espressione "tipo" ha sostituito il precedente "entità" e "sottotipo" si usa al posto di "variante". Solamente i tipi vengono inclusi nella classificazione, mentre i sottotipi vengono descritti in sezioni apposite di istopatologia e/o patologia diagnostico-molecolare. <sup>47</sup>

In passato, alcuni tumori venivano definiti includendo il sito anatomico colpito (per esempio il glioma cordoide del terzo ventricolo), mentre altri no, pur avendo una localizzazione caratteristica (come il medulloblastoma). Lo stesso si evince anche per le caratteristiche genetiche. Per esempio, si aveva il glioblastoma IDH wild-type, mentre per il tumore rabdoide teratoide atipico non si menzionava la mutazione di

SMARCB1, pur essendo diagnostica. La nuova classificazione ha eliminato molti termini superflui per cercare di semplificare il più possibile la diagnosi, utilizzando solo quelli necessari. Un grosso cambiamento inoltre riguarda i gliomi diffusi poiché non si deve più utilizzare la dicitura “anaplastico” per indicare gli astrocitomi di III grado o gli oligodendrogliomi di III.

World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System, fifth edition
Gliomas, glioneuronal tumors, and neuronal tumors
Adult-type diffuse gliomas
Astrocytoma, IDH-mutant
Oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q-codeleted
Glioblastoma, IDH-wildtype
Pediatric-type diffuse low-grade gliomas
Diffuse astrocytoma, MYB- or MYBL1-altered
Angiocentric glioma
Polymorphous low-grade neuroepithelial tumor of the young
Diffuse low-grade glioma, MAPK pathway-altered
Pediatric-type diffuse high-grade gliomas
Diffuse midline glioma, H3 K27-altered
Diffuse hemispheric glioma, H3 G34-mutant
Diffuse pediatric-type high-grade glioma, H3-wildtype and IDH-wildtype
Infant-type hemispheric glioma
Circumscribed astrocytic gliomas
Pilocytic astrocytoma
High-grade astrocytoma with piloid features
Pleomorphic xanthoastrocytoma
Subependymal giant cell astrocytoma
Chordoid glioma
Astroblastoma, MN1-altered
Glioneuronal and neuronal tumors
Ganglioglioma
Desmoplastic infantile ganglioglioma / desmoplastic infantile astrocytoma
Dysembryoplastic neuroepithelial tumor
Diffuse glioneuronal tumor with oligodendroglioma-like features and nuclear clusters
Papillary glioneuronal tumor
Rosette-forming glioneuronal tumor
Myxoid glioneuronal tumor
Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor
Gangliocytoma
Multinodular and vacuolating neuronal tumor
Dysplastic cerebellar gangliocytoma (Lhermitte-Duclos disease)
Central neurocytoma
Extraventricular neurocytoma
Cerebellar liponeurocytoma

Tabella 5: classificazione dei tumori del Sistema Nervoso Centrale WHO 2021, in particolare sezione inerente ai gliomi, tumori glioneuronali e neuronali.

Il grading dei tumori cerebrali è sempre stato differente rispetto a quello dei tumori di altri apparati e uno dei tanti cambiamenti della nuova classificazione consiste proprio nell’eliminare questa discrepanza. Innanzitutto, la quinta edizione del Blue Book ha adottato, per il grading, l’utilizzo dei numeri arabi (Tabella 6) al posto di

quelli romani per uniformare la stadiazione e cercare di limitare eventuali errori le cui conseguenze poi impatterebbero sulla terapia.

Tradizionalmente, i tumori del sistema nervoso avevano un grado assegnato per ogni entità e i gradi venivano applicati a differenti entità, ossia, nella precedente classificazione, l'astrocitoma anaplastico, per esempio, veniva categorizzato in automatico in grado III. Non vi erano opzioni quindi per cui questo tumore potesse avere invece un grado I, II o IV. Aspetto ben più considerevole riguarda il fatto che anche il meningioma anaplastico (un altro tumore maligno) veniva stadiao come grado III, anche se la sopravvivenza differisce rispetto a un astrocitoma anaplastico di grado III, per cui risulta inadatto assimilare tumori con caratteristiche biologiche e prognostiche diverse nella stessa categoria. Sostanzialmente, queste innovazioni sono state fatte per fornire maggiore agevolezza nell'usare il grado correlando al tipo di tumore, per enfatizzare le similitudini biologiche all'interno del tipo tumorale piuttosto che il comportamento clinico approssimativo e infine per uniformare il grading dei tumori del sistema nervoso con quelli degli altri organi.<sup>48</sup>

CNS WHO Grades of Selected Types	
Astrocytoma, IDH-mutant	2, 3, 4
Oligodendroglioma, IDH-mutant, and 1p/19q-codeleted	2, 3
Glioblastoma, IDH-wildtype	4
Diffuse astrocytoma, MYB- or MYBL1-altered	1
Polymorphous low-grade neuroepithelial tumor of the young	1
Diffuse hemispheric glioma, H3 G34-mutant	4
Pleomorphic xanthoastrocytoma	2, 3
Multinodular and vacuolating neuronal tumor	1
Supratentorial ependymoma <sup>a</sup>	2, 3
Posterior fossa ependymoma <sup>a</sup>	2, 3
Myxopapillary ependymoma	2
Meningioma	1, 2, 3
Solitary fibrous tumor	1, 2, 3

Tabella 6: Grading WHO 2021, modello "grado all'interno dei tipi": i numeri arabi sostituiscono quelli romani, vengono eliminati i termini "diffuso" o "anaplastico", si sottolinea il fatto che esistono astrocitomi IDH mutati di 4 grado, eliminando così il precedente glioblastoma IDH mutato grado IV.

Oltre che determinare il grado in base all'istologia, bisogna considerare anche i marker molecolari poiché possono fornire importanti informazioni prognostiche. Per questo motivo, i parametri molecolari sono stati aggiunti come veri e propri biomarcatori al grading per stimare meglio la sopravvivenza di diversi tipi tumorali.

Per esempio, per l'astrocitoma IDH mutato si considera la delezione in omozigosi di CDKN2A/B, così come la mutazione del promotore TERT o l'amplificazione di EGFR per l'astrocitoma IDH wild-type.<sup>49</sup>

Come nella classificazione del 2016, si mantiene il termine NOS (not otherwise specified) per indicare che le informazioni necessarie ad attribuire una specifica diagnosi non sono disponibili, ma si aggiunge anche la dicitura NEC (not elsewhere classified) per quei tumori che possiedono questi dati fondamentali che però non consentono di fare lo stesso diagnosi. Si intende per esempio che vi si sono discrepanze tra le caratteristiche immunohistochimiche, cliniche, istologiche e/o genetiche.<sup>49</sup>

Per quanto riguarda i gliomi diffusi, la nuova classificazione prevede una netta distinzione fra le tipologie tipiche dell'età adulta e quelle pediatriche, poiché differiscono soprattutto per gli aspetti biologici e prognostici. Inoltre, non vi sono più quindici entità diverse di gliomi ma, più semplicemente, tre tipi: astrocitoma IDH mutato (WHO grado 2,3,4, NOS), oligodendroglioma IDH mutato e con codelezione 1p/19q (WHO grado 2,3, NOS) e il glioblastoma IDH wild-type (WHO grado 4, NOS).

Nel 2016, i tumori astrocitari diffusi IDH mutati erano suddivisi in tre tipi (astrocitoma diffuso, astrocitoma anaplastico e glioblastoma) in base all'istologia. Nella più attuale versione, tutti questi tumori vengono raggruppati in un solo tipo (astrocitoma IDH mutato) e variano per il grado 2, 3 o 4. Mentre per le forme wild-type, diversi studi hanno dimostrato che la presenza di uno o più di tre parametri (mutazione del promotore TERT, amplificazione di EGFR, la mutazione combinata con guadagno dell'intero cromosoma 7 e la perdita dell'intero cromosoma 10), è sufficiente per attribuire il grado più alto. Inoltre, questi tre parametri genetici sono anche criteri diagnostici per il glioblastoma IDH wild-type (Figura 9).<sup>50,51</sup>

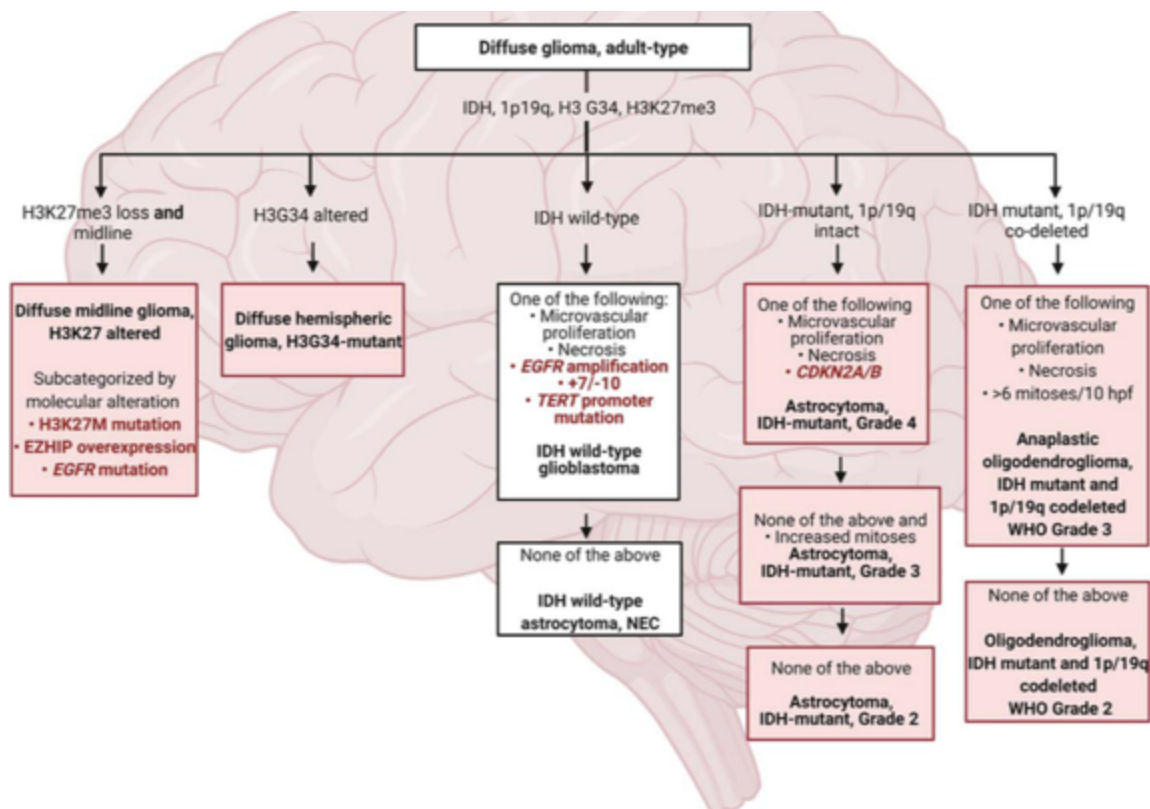


Figura 9: rappresentazione schematica della nuova classificazione WHO 2021 basata sulle caratteristiche molecolari.<sup>52</sup>

### 3.3 Marcatori immunoistochimici e molecolari

#### 3.3.1 Sinaptofisina

La sinaptofisina è una glicoproteina integrale di membrana che si trova a livello delle vescicole presinaptiche dei neuroni e nelle vescicole della midollare surrenalica.

Viene prodotta anche da diversi tumori neuronali e neuroendocrini (per esempio, il feocromocitoma o il paraganglioma) ed è espressa indipendentemente dal grado degli altri marcatori immunoistochimici, per cui rappresenta un utile marker di differenziazione tumorale.<sup>53</sup>

Inoltre, essa costituisce un complesso proteico insieme alla sinaptobrevina e queste due sono le proteine più abbondanti nelle vescicole sinaptiche.<sup>54</sup>

La sinaptobrevina appartiene anche al complesso SNARE (Soluble-N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment REceptors, ovvero recettori di adesione sensibili al fattore solubile della N-etilmaleimide) insieme alla syntaxina e alla proteina SNAP 25. Queste proteine permettono la fusione delle vescicole contenenti

neurotrasmettitori con la membrana plasmatica del neurone a livello del terminale presinaptico. Si ipotizza che la sinaptofisina controlli la disponibilità di sinaptobrevina nel complesso SNARE e che impedisca, una volta terminata l'esocitosi della vescicola, lo scorretto riarrangiamento della sinaptobrevina, che è una proteina estremamente reattiva, con la SNAP25 e la syntaxina a formare un complesso cis non funzionale che non permette la fusione vescicolare e il rilascio di neurotrasmettitori, soprattutto quando vi è una attività sinaptica ad alta frequenza.<sup>55</sup>

Inoltre, bisogna considerare che l'assenza della sinaptobrevina è incompatibile con la vita, a differenza della sinaptofisina, la cui mancanza non impatta sulla generazione di network neuronali funzionali.<sup>56</sup>

### 3.3.2 GFAP (proteina acida fibrillare gliale)

La GFAP, ossia l'unità proteica essenziale di cui sono costituiti i filamenti intermedi di tipo III degli astrociti, è un marker immunostochimico espresso dagli astrociti ma anche dai tumori di origine gliale. Alcuni studi hanno dimostrato che vi è una progressiva perdita dell'espressione di questa proteina all'aumentare del grado degli astrocitomi<sup>57</sup>. Si può attribuire questa correlazione alle cellule tumorali con alto indice mitotico, che di fatto rispondono meglio sia alla chemioterapia che alla radioterapia.<sup>58</sup>

Altri invece hanno dimostrato risultati differenti: uno studio del 2019 ha constatato che i pazienti affetti da glioblastoma con un'espressione della GFAP superiore al 75% presentano una sopravvivenza minore, indipendentemente da altri fattori prognostici importanti, come la mutazione IDH, lo stato di metilazione di MGMT e l'età.<sup>59</sup>

Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che il tumore favorisce la distruzione delle membrane cellulari e quindi il rilascio di GFAP.

### 3.3.3 Ki67 (%)

Il Ki67 rappresenta l'indice di proliferazione e quindi esprime, in percentuale, la frazione di crescita delle cellule tumorali rispetto al numero totale di cellule. Una

bassa percentuale del ki67 solitamente si riscontra nei tumori di basso grado e uno studio del 2021 ha dimostrato che queste caratteristiche (oltre che la negatività per ATRX) costituiscono un fattore indipendente per una maggiore incidenza di epilessia all'esordio nei pazienti con tumori gliali.<sup>60</sup>

Invece non vi è correlazione tra il Ki67 e la BTRE o la sopravvivenza nei pazienti affetti da glioblastoma.<sup>61</sup>

#### 3.3.4 ATRX

La mutazione del gene ATRX è responsabile della sindrome x-linked correlata al ritardo mentale e alla alpha talassemia. Si tratta di un gene importante per quanto riguarda il rimodellamento della cromatina, la metilazione del DNA e il mantenimento della stabilità dei telomeri.<sup>62</sup>

La proteina ATRX, codificata dall'omonimo gene, permette il mantenimento dei telomeri attraverso un processo indipendente dalla via delle telomerasi, noto come allungamento alternativo dei telomeri (ALT, alternative lengthening of telomeres) e quindi conferisce alle cellule neoplastiche la capacità di evitare la senescenza replicativa.<sup>63</sup> Spesso si associa alla mutazione di tp53 ed è caratteristica degli astrocitomi IDH-mutati ed è mutualmente esclusiva con la codelezione 1p/19q e con la mutazione del promotore del gene TERT.<sup>64</sup>

Sostanzialmente, i tumori IDH mutati e con la mutazione di ATRX hanno una prognosi migliore rispetto ai pazienti che non presentano queste due alterazioni.<sup>65</sup>

Quindi, l'ATRX rappresenta un marker prognostico utile nei pazienti adulti con gliomi maligni e potrebbe essere importante anche per definire quei gruppi di soggetti che, nonostante la presenza di un'astocitoma anaplastico, hanno un outcome migliore.

Non ci sono ancora dati comprovati sulla correlazione tra ATRX e BTRE. Solo uno studio ha dimostrato che esiste una correlazione statisticamente significativa negativa tra la mutazione di ATRX e l'epilessia e che quindi questo gene rappresenta un predittore indipendente per lo sviluppo di epilessia nei pazienti tumorali.<sup>60</sup>



### 3.3.5 TP53

Il gene TP53, localizzato sul cromosoma 17p13.1, codifica la proteina p53 che è anche detta il “guardiano del genoma” poiché favorisce l’arresto delle cellule che hanno subito un danno genetico nella fase G1 del ciclo cellulare, impedendo così che il danno al DNA si propaghi durante la mitosi. La maggior parte (circa il 50-60%) degli astrocitomi infiltranti di basso grado presenta una mutazione del gene TP53, suggerendo che questa alterazione sia un evento precoce nella tumorigenesi. La perdita della funzionalità fisiologica della proteina, infatti, porta a una divisione cellulare disregolata, instabilità genetica e anche all’immortalizzazione delle cellule, tutti eventi che sono alla base della trasformazione neoplastica.<sup>66</sup>

Inoltre, le mutazioni di TP53 nel glioblastoma sono solitamente alterazioni puntiformi con guadagno di funzione che determinano l’espressione di una variante oncogenica della p53, che promuove l’aggressività del tumore danneggiando tutti i fattori di trascrizione regolati dalla proteina normale.<sup>67</sup>

Per quanto riguarda la correlazione tra p53 e la BTRE, non ci sono ancora oggi dati che spieghino una possibile associazione. Vi sono risultati contrastanti in merito, infatti si è scoperto che neuroni danneggiati dall’ischemia e dall’epilessia presentano valori aumentati di p53 e che le cellule carenti di questa proteina risultano essere protette da un eventuale danno indotto dalle convulsioni.<sup>68</sup> Però è stato anche osservato che l’assenza di questa proteina può esacerbare un fenotipo epilettico (risultato ottenuto studiando modelli murini wild-type e deficienti per p53 nei quali è stato indotto uno stato epilettico tramite l’iniezione di acido kainico nell’amigdala).<sup>69</sup>

### 3.3.6 IDH1 e IDH2

L’isocitrato deidrogenasi 1 (IDH1) e 2 (IDH2) sono enzimi chiave per la regolazione epigenetica e il controllo dello stress ossidativo. Circa il 70% dei gliomi di grado II e dei glioblastomi secondari possiede una mutazione missenso eterozigote del gene che codifica per l’IDH1 citosolico che conferisce una nuova attività patologica all’enzima, che converte l’ $\alpha$ -ketoglutarato ( $\alpha$ KG) in D-2-idrossiglutarato (D-2HG).<sup>70</sup> Le mutazioni invece dell’isoenzima IDH2 mitocondriale sono molto più rare e mutualmente esclusive con quelle dell’IDH1. Le elevate concentrazioni di D-2HG,

che rappresenta quindi il maggior effettore intracellulare dei gliomi IDH1 mutati, è considerato un oncometabolita che determina alterazioni epigenetiche e favorisce la trasformazione maligna delle cellule.<sup>71</sup>

Recenti studi suggeriscono che l'enzima IDH1 è un potenziale target clinico per la terapia del glioblastoma. Il razionale consiste nel fatto che l'attività dell'IDH1 favorisce l'aumento del rapporto citoplasmatico NADPH/NADP<sup>+</sup>, il quale promuove la difesa cellulare contro lo stress ossidativo. Sopprimendo l'attività di IDH1 e quindi riducendo questo rapporto, le cellule tumorali diventano più sensibili allo stress ossidativo, potenziando l'effetto della radioterapia, utilizzata comunemente nel trattamento dei tumori cerebrali insieme alla chemioterapia, che va proprio ad indurre la morte delle cellule attraverso l'induzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e danni al DNA.<sup>72</sup>

Inoltre, è stato dimostrato che i tumori con la mutazione del gene che codifica per l'IDH1 crescono più lentamente e, solitamente, hanno una prognosi migliore rispetto ai tumori wild-type.<sup>73</sup>

Nonostante ciò, è comprovato il fatto che i glioblastomi con la mutazione sono in grado di riparare meglio i danni al DNA indotti dalle radiazioni.<sup>74</sup>

La questione rimane ancora oggi controversa, anche se sono stati proposti tre modelli per cercare di spiegare l'outcome paradossale che si ha nei tumori con la mutazione IDH1. La prima ipotesi riguarda l'aumentata resilienza allo stress che la mutazione conferisce al tumore, in particolare si ha una maggiore resistenza nei confronti di segnali dannosi al microambiente tumorale e si previene la differenziazione da una cellula progenitrice a un tipo più differenziato ma con minor capacità proliferativa. Tutto ciò è ancora da dimostrare definitivamente, anche perché risulta molto complesso dimostrare che la mutazione IDH1 sia in grado di bloccare la differenziazione nelle cellule neuronali.<sup>75</sup>

Il secondo modello riguarda l'evoluzione verso un fenotipo maligno attraverso la repressione epigenomica, ossia è stato visto che la mutazione di IDH1 fa sì che nel tempo si riduca l'espressione di oncosoppressori, rendendo la cellula tumorigenica.<sup>76</sup> Infine, l'ultima teoria si basa sul fatto che la mutazione IDH1 agisca come promotore

di altre mutazioni: ciò si è notato soprattutto studiando le recidive di tumori che presentavano nuove alterazioni. Le mutazioni del primo tumore non si riscontravano nel secondo però quella di IDH1 e di p53 erano sempre presenti. Questi risultati implicano che la mutazione IDH1 è la prima a verificarsi in corso di gliomagenesi ma è sufficiente a generare ulteriori alterazioni per creare una tumorigenesi multipla nell'arco della vita dei pazienti.<sup>75,77</sup>

Per quanto riguarda invece la BTRE, è stato scoperto che il D2-HG è strutturalmente simile al glutammato e i gliomi con la mutazione di IDH1 producono quantità notevoli di questa molecola, che è in grado di attivare i recettori NMDAR e gli AMPAR, favorendo così l'influsso di sodio, potassio e calcio e abbassando quindi la soglia del potenziale d'azione dei neuroni. Si viene quindi a determinare uno squilibrio tra eccitazione e inibizione nervosa che sfocia in attacchi convulsivi.<sup>78</sup>

L'incidenza di BTRE nei gliomi mutati per IDH1 è maggiore rispetto a quella dei wild-type.<sup>60</sup>

### 3.3.7 MGMT (O6-methylguanine-DNA methyltransferase)

Il gene MGMT codifica per una proteina che ripara il DNA rimuovendo i gruppi alchilici a livello della posizione O<sup>6</sup> della guanina, un importante sito di alchilazione del DNA. Inoltre, i pazienti che presentano il promotore di MGMT ipometilato, possiedono elevati livelli della proteina omonima e sono di conseguenza più resistenti alla terapia con agenti alchilanti, come la temozolomide (TMZ). Quindi lo stato di metilazione di MGMT rappresenta uno dei migliori fattori predittivi di risposta agli alchilanti e prognostici di sopravvivenza nei soggetti affetti soprattutto da glioblastoma.<sup>79</sup>

Comunque, bisogna considerare che lo stato di metilazione non sempre riflette l'espressione genica, infatti il meccanismo con cui la metilazione del promotore di MGMT migliora la risposta alla terapia non è ancora chiaro. Nonostante questo, è fondamentale avere queste informazioni per decidere il trattamento. Infatti, anche le linee guida europee (EANO, European Association for Neuro-Oncology) raccomandano la valutazione della metilazione del promotore di MGMT soprattutto

nei pazienti anziani, poiché, qualora ipometilato, risulta da preferire un trattamento con la radioterapia.<sup>80</sup>

Tutt'oggi però non vi è ancora un consenso generale su quale sia il valore cut-off e il metodo migliore per determinare la metilazione di MGMT, anche se la PCR specifica per la metilazione (MSP) e il pirosequenziamento (PSQ) risultano essere maggiormente informative in termini prognostici rispetto alla semplice immunohistochimica.<sup>80</sup>

Per quanto riguarda il ruolo di MGMT nella BTRE, ancora oggi i dati in letteratura sono molto carenti. Uno studio del 2021 ha dimostrato che MGMT è associato all'insorgenza di epilessia nei pazienti con glioma che hanno eseguito il protocollo STUPP (chirurgia, chemioterapia e radioterapia) e inoltre che questo gene rappresenta un fattore predittivo del rischio della comparsa di epilessia, anche se il meccanismo sottostante non sia ancora ben chiarito e potrebbe forse essere attribuibile al fatto che l'MGMT influenza l'effetto terapeutico della TMZ e promuove la recidiva di tumore.<sup>81</sup>

Un altro studio del 2021 ha dimostrato inoltre che i pazienti affetti da glioblastoma IDH mutato e con ipometilazione del promotore MGMT hanno un buon controllo delle crisi e che il Levetiracetam è il farmaco di scelta in questa tipologia selezionata di pazienti per la remissione dell'epilessia.<sup>82</sup>

### 3.3.8 Codelezione 1p/19q

La completa delezione sia del braccio corto del cromosoma 1 (1p) che del braccio lungo del cromosoma 19 (19q) è un'alterazione genica patognomica degli oligodendrogliomi. La codelezione è un evento precoce nella tumorigenesi e si pensa che sia il risultato di una traslocazione sbilanciata completa tra i cromosomi 1 e 19 con la conseguente perdita del cromosoma ibrido.<sup>83</sup>

Di conseguenza, si ha l'inattivazione di due geni oncosoppressori putativi, ossia CIC e FUBP1, localizzati rispettivamente in posizione 19q e 1p.<sup>84</sup>

CIC codifica per un repressore trascrizionale di geni coinvolti nella crescita e nel metabolismo cellulare, i quali sono attivati mediante il signaling del recettore per la tirosin-chinasi (RTK). La mutazione di CIC comporta una minore inibizione dell'espressione dei geni indotta dalla RTK, favorendo la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule tumorali.<sup>85</sup>

FUBP1 codifica per un regolatore chiave dello splicing alternativo sia di oncosoppressori che di protooncogeni e infatti la sua perdita comporta anomalie diffuse nello splicing dell'RNA.<sup>86</sup>

I tassi di incidenza delle mutazioni di CIC e FUBP1 negli oligodendrogliomi si attestano intorno al 60% e al 30% rispettivamente e si associano a una sopravvivenza minore e a una comparsa più veloce di recidiva tumorale.<sup>87</sup>

I tumori di basso grado che possiedono sia la mutazione di IDH1 che la codelezione 1p/19q, hanno una risposta migliore alla radio-chemioterapia e anche una sopravvivenza più lunga rispetto ai gliomi diffusi senza queste alterazioni.<sup>45,88</sup>

Per quanto riguarda una possibile associazione con la BTRE, i pareri in merito sono ancora molto contrastanti. Alcuni studi hanno dimostrato una correlazione tra la codelezione e l'insorgenza di epilessia nell'adulto<sup>89</sup>, mentre altri sostengono che non vi sia una connessione tra questa alterazione genica e l'insorgenza di convulsioni nel periodo preoperatorio nei tumori di basso grado.<sup>60,90,91</sup>

### 3.3.9 Promotore TERT

I telomeri sono delle ripetizioni in tandem di sequenze brevi di DNA che proteggono le terminazioni dei cromosomi e risolvono eventuali problemi di fine replicazione. Le telomerasi, ossia degli enzimi espressi soprattutto da selezionate cellule staminali, usano un primer di RNA per allungare i telomeri e permettere alle cellule di continuare a dividersi<sup>92</sup>. Questi enzimi sono in grado quindi di immortalizzare le cellule e ciò si riscontra in circa il 70% dei tumori<sup>52</sup>. Circa il 30% dei glioblastomi possiede una mutazione nel promotore della subunità catalitica del complesso della

telomerasi, ossia TERT (Telomerase reverse transcriptase). La mutazione di fatto favorisce un' aumentata espressione di telomerasi, per cui le cellule riescono a proliferare in maniera indefinita.

Questa alterazione si riscontra anche in alcuni oligodendrogliomi, nello xantoastrocitoma pleomorfo, nel medulloblastoma e raramente nei meningiomi anaplastici.<sup>93</sup>

La mutazione TERT è uno dei marker più specifici e sensibili per la diagnosi di glioblastoma IDH wild-type.<sup>52</sup>

Alcune evidenze sostengono inoltre che la mutazione di TERT, in particolare la C228T, conferisce resistenza alla radioterapia e quindi rappresenta un fattore prognostico negativo.<sup>94</sup>

I dati in merito a un possibile ruolo di TERT nell'epilettogenesi sono molto deficitari. Uno studio del 2020 ha dimostrato che non vi è una correlazione significativa tra la mutazione di TERT e l'insorgenza di convulsioni pre-operatorie glioma-relate.<sup>95</sup>

### 3.3.10 Cromosomi 7/10

I glioblastomi IDH wild-type presentano tipicamente un' aumentata aneuploidia che comprende sia eventi diffusi (a livello dei bracci dei cromosomi) che focali (a livello di geni). La più frequente e prognosticamente significativa alterazione è il guadagno di funzione a livello del cromosoma 7 e la perdita di funzione del cromosoma 10 (+7/-10), presente in circa il 60% di questi tumori. Questo specifico pattern si associa a una prognosi infausta il cui meccanismo però è ancora sconosciuto. Una delle tre possibili combinazioni (+7/-10, +7q/-10 e +7/-10q) è altamente specifica per la diagnosi di GBM IDH wild-type. Raramente queste alterazioni possono essere riscontrate anche nei gliomi IDH mutati e nello xantoastrocitoma pleomorfo.<sup>96</sup>

Non ci sono dati disponibili riguardo l'associazione tra i cromosomi 7/10 e la BTRE.

### 3.3.11 EGFR (Epidermal growth factor receptor)

Il recettore del fattore di crescita epidermico è iperespresso in circa la metà dei glioblastomi IDH wild-type.<sup>97</sup> Quando viene amplificato, l'aumento della densità

della proteina nella membrana plasmatica permette l'omo- e l'eterodimerizzazione di diversi recettori che portano all'attivazione del signaling cellulare, indipendentemente dalla presenza di ligandi e favoriscono l'inizio della tumorigenesi. Ha una specificità del 99.8% e una sensibilità del 36%.<sup>98</sup>

Gli anticorpi monoclonali anti-EGFR, utilizzati in altri tumori, sono inefficaci nei glioblastomi e ciò suggerisce il fatto che vi è un meccanismo sottostante all'attivazione di EGFR diverso. I pazienti che presentano un'amplificazione di EGFR hanno pertanto un outcome sfavorevole.<sup>99</sup>

### 3.3.12 CDKN2A/B (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B)

L'inibitore della chinasi ciclina-dipendente 2A/B è codificato da un gene collocato sul cromosoma 9 e studi recenti hanno dimostrato che una delezione omologa di questo gene rappresenta un marcatore statisticamente significativo di prognosi infausta nei pazienti con astrocitomi IDH mutati.<sup>100</sup>

Ciò è dovuto al fatto che il CDKN2A/B codifica per tre oncosoppressori (p16 INK4A, p14 ARF e p15 INK4B), per cui una sua delezione comporta una minore inibizione della proliferazione cellulare incontrollata tipica dei tumori. Talora questa alterazione può essere osservata anche negli oligodendrogliomi anaplastici.<sup>52</sup>

Di conseguenza, l'identificazione della delezione in omozigosi di CDKN2A/B è sufficiente per classificare un glioma IDH-mutato come WHO grado 4, indipendentemente dalle caratteristiche istologiche.<sup>84</sup>

I dati in merito alle conoscenze attuali sul ruolo prognostico e nella BTRE dei marcatori molecolari sono riassunti nella tabella 7.

	Ruolo prognostico oncologico	Ruolo nella BTRE
Sinaptofisina	Non vi sono ancora dati disponibili riguardo a un possibile ruolo prognostico della sinaptofisina	Non sono tutt'oggi note delle correlazioni tra la sinaptofisina e la BTRE
GFAP	Attualmente vi sono dati discordanti in merito al ruolo prognostico della GFAP	Non sono tutt'oggi note delle correlazioni tra la GFAP e la BTRE
Ki67%	L'indice di proliferazione Ki67 non influisce sulla progression free survival o sulla overall survival dei pazienti affetti da tumore cerebrale	Secondo alcuni studi, non vi è correlazione tra la BTRE e la percentuale del Ki67.
ATRX	La mutazione del gene ATRX correla con un outcome favorevole	Mancano ancora dati a supporto di una possibile correlazione fra l'ATRX e la BTRE
TP53	I tumori che presentano la mutazione di tp53 hanno una prognosi peggiore	Attualmente, vi sono solo dati discordanti riguardo alla correlazione tra p53 e BTRE
IDH1 e IDH2	I tumori che presentano la mutazione di questi geni hanno una prognosi migliore, anche se tale dato non è ancora stato dimostrato definitivamente	I tumori che hanno la mutazione di IDH1 si associano a una maggiore incidenza di epilessia.
MGMT	I soggetti che possiedono il promotore di MGMT ipometilato sono più resistenti alla chemioterapia e di conseguenza hanno una prognosi più infausta.	Secondo diversi studi, non vi è una correlazione significativa tra lo stato di metilazione di MGMT e l'epilessia.
Codelezione 1p/19q	La presenza di questa codelezione correla con una migliore risposta alla terapia oncologica e conferisce quindi un miglior outcome.	Attualmente i dati in merito alla correlazione con la BTRE appaiono contrastanti e per lo più tendenti a una mancanza di associazione con la BTRE.
Promotore TERT	La mutazione del gene TERT rappresenta un fattore prognostico negativo.	Alcuni dati sostengono che la mutazione di TERT non sia correlata all'epilessia ma questa evidenza non è stata ancora confermata.
Cromosomi 7/10	Il guadagno di funzione a livello del cromosoma 7 e la perdita di funzione del cromosoma 10 (+7/-10) si associano a una prognosi infausta.	Non ci sono ancora dati disponibili.
EGFR	L'amplificazione di EGFR determina una prognosi infausta.	Non ci sono ancora dati disponibili.
CDKN2A/B	La delezione omologa del gene CDKN2A/B rappresenta un fattore prognostico negativo.	Non ci sono ancora dati disponibili.

Tabella 7: rappresentazione schematica dei principali marcatori dei tumori cerebrali e possibili correlazioni con la BTRE.



#### ***4. Scopo dello studio***

Il presente studio retrospettivo si è basato sulla creazione di un database contenente dati di individui affetti da tumore cerebrale primitivo, in particolare quelli del sottotipo istologico oligodendrogliale e astrocitario diffuso.

Lo scopo dello studio consiste nell'individuare possibili associazioni tra le caratteristiche clinico-patologiche del tumore e lo sviluppo di epilessia al fine di poter categorizzare al meglio i pazienti, sia dal punto di vista prognostico che terapeutico, considerando soprattutto i marker molecolari (tabella 7) associati ai gliomi (GMMs, *glioma-associated molecular markers*).

In particolare, i quesiti che ci siamo posti all'inizio dello studio sono stati:

- 1) se ci sono delle associazioni tra le caratteristiche del tumore e quelle dell'epilessia;
- 2) se ci sono delle associazioni tra le caratteristiche del tumore e la frequenza delle crisi;
- 3) se esiste una correlazione tra la PFS (progression free survival) e le caratteristiche dell'epilessia.
- 4) se c'è un'associazione tra la PFS e la frequenza delle crisi;
- 5) se esiste un'associazione tra l'OS (overall survival) e l'epilessia;
- 6) se c'è una correlazione tra l'OS e la frequenza delle crisi.

Inoltre, abbiamo esplorato se, nella nostra casistica, si confermassero i dati di letteratura riguardanti la prognosi dei tumori cerebrali, in particolare:

- 1) se esiste una correlazione tra la PFS e le caratteristiche molecolari del tumore;
- 2) se esiste un'associazione tra l'OS e le caratteristiche del tumore.

## **5. Materiali e metodi**

### *5.1 Pazienti studiati*

Sono stati studiati pazienti affetti da tumore cerebrale primitivo, in particolare da gliomi diffusi e presi in carico dal DMT (disease management team) neuroncologico, comprendente l'oncologo, il neurochirurgo, il radioterapista, il neurologo e l'anatomopatologo, dal 2002 al 2021 presso l'IRCCS Ospedale Policlinico San Martino di Genova.

Il criterio di inclusione principale era: pazienti affetti da tumore primitivo gliale secondo la classificazione WHO 2016<sup>41</sup>.

I criteri di esclusione includevano: 1) pazienti affetti da lesioni occupanti spazio intracranici non appartenente alla categoria astrocitomi e oligodendrogliomi diffusi secondo la WHO 2016<sup>41</sup>; 2) pazienti mancanti di dati inerenti l'anatomia patologica.

### *5.2 Caratteristiche dei pazienti*

La diagnosi istopatologica è stata fatta secondo la classificazione dei gliomi della WHO 2016<sup>41</sup>, considerando quindi gli astrocitomi, gli oligodendrogliomi e i glioblastomi con le rispettive caratteristiche anatomo-patologiche. La GFAP, l>IDH1 e IDH2, ki67, l'MGMT, la sinaptofisina, l'ATRAX e la p53 sono state studiate mediante l'immunoistochimica.

I cutoff utilizzati per la GFAP, la sinaptofisina, l'ATRAX e la p53 sono: 5= diffusa positività, 4=prevalente positività, 3=focale positività, 2= rara positività, 1=negatività, 0=non valutabile.

Per il ki67 invece, i valori utilizzati sono: 5: superiore al 40%, 4: tra 40 e 20%, 3: tra 20 e 10%, 2: tra 10 e 5%, 1: tra 5 e 1%, 0: meno del 1%).

La ricerca di mutazioni somatiche nel gene IDH1 (codoni 105, 132) e IDH2 (codoni 140, 172) viene eseguita con il kit EasyPGX ready IDH1/2 CE-IVD con tecnologia real time pcr, la cui sensibilità si attesta al 0,5-5% e/o PCR e successivo sequenziamento nucleotidico degli amplificati mediante elettroforesi capillare su Genetic analyzer 3130, con sensibilità del 20% (test di diluizione DNA mutato in DNA wild-type).

Per quanto riguarda l'analisi molecolare per lo studio di metilazione del gene MGMT, prima di eseguire l'esame, il DNA estratto dal campione viene trattato con bisolfito per la conversione delle citosine non metilate in uracile. Le citosine metilate rimangono invariate durante il trattamento. Il DNA così convertito viene analizzato quantitativamente per il grado di metilazione di 10 isole CpG situate nella regione promotrice del gene MGMT (sequenza genomica sul cromosoma 10 da 131, 265, 507 a 131, 265, 556). L'analisi viene effettuata mediante MGMT plus kit IVD avvalendosi del sistema PyroMark Q96, con sensibilità del 5% (determinato con test di diluizione del DNA) e/o PCR con successivo sequenziamento automatico, la cui sensibilità è circa il 20%. Una percentuale media di metilazione <9% corrisponde ad un campione non metilato.<sup>101</sup> Una percentuale media di metilazione >9% corrisponde ad un campione metilato.<sup>101</sup>

La valutazione della codelezione delle regioni 1p e 19Q è stata eseguita con la Vysis 1p36/1q25 e 19q13/19p13 FISH probe kit.

Per quanto riguarda i pazienti che hanno sviluppato epilessia, sono state considerate le seguenti caratteristiche:

- 1) l'esordio, se con epilessia o no, specificando quali sintomi neurologici sono comparsi;
- 2) se l'epilessia è comparsa alla diagnosi oncologica o dopo il trattamento neurochirurgico;
- 3) il tipo di crisi, focale o generalizzata;
- 4) presenza/assenza di perdita di consapevolezza;
- 5) motoria o non motoria;
- 6) frequenza delle crisi all'esordio (rare, mensili, settimanali, quotidiane o pluriquotidiane);
- 7) presenza/assenza di evoluzione bilaterale tonico-clonica;
- 8) frequenza delle crisi all'ultima visita disponibile (seizure free, rare, mensili, settimanali, quotidiane o pluriquotidiane);

Infine, è stata calcolata per ogni paziente:

- la PFS, intesa come tempo trascorso (in mesi) dall'intervento neurochirurgico ad una eventuale recidiva, oppure all'ultima visita disponibile. I pazienti in cui il follow-up era inferiore ai 24 mesi sono stati esclusi dal calcolo del PFS.
- l'OS, intesa come tempo trascorso (in mesi) dall'intervento neurochirurgico all'eventuale decesso, oppure all'ultima visita disponibile. I pazienti in cui il follow-up era inferiore ai 12 mesi sono stati esclusi dal calcolo del PFS.

### *5.3 Follow-up*

I pazienti sono poi stati seguiti nel tempo con frequenza diversa a seconda della tipologia di tumore:

- i pazienti affetti da glioblastoma hanno eseguito durante il primo anno di follow-up una RM e una visita ogni 2-3 mesi e la stessa cadenza è stata poi mantenuta negli anni successivi;
- i pazienti affetti da gliomi anaplastici invece sono stati sottoposti a RM e visita oncologica ogni 3-4 mesi nel primo anno, mentre negli anni successivi ogni 6 mesi;
- infine, per i pazienti con gliomi di basso grado, la visita medica e la RM sono state fatte ogni 4 mesi durante il primo anno di FU e poi ogni 6 mesi.

Inoltre, i pazienti sono poi stati monitorati anche dal neurologo, con cadenza ogni 3-6 mesi a seconda dello stato clinico, mediante visita medica, EEG, valutazione tramite gli esami ematochimici dei controlli plasmatici dell'eventuale farmaco antiepilettico prescritto.

#### *5.4 Analisi statistica*

Le associazioni tra le caratteristiche del tumore (sede del tumore, tipo istologico, espressione della GFAP e della sinaptofisina, ki67, ATRX, p53, stato di IDH, metilazione del promotore del gene MGMT e 1p/19q) e le caratteristiche dell'epilessia (tipo di epilessia, focale o generalizzata, se motoria, con perdita di coscienza, frequenza delle crisi) sono state esaminate con il test chi quadro di Pearson. I dati inerenti alla PFS e alla OS invece sono stati studiati tramite l'analisi di sopravvivenza di Kaplan-Meier ed il modello di regressione di Cox. L'età è stata usata come variabile confondente. Le analisi statistiche sono state attuate con il software STATA 13. Per effettuare l'analisi statistica, i dati inerenti la GFAP, la sinaptofisina, l'ATRX e la p53 sono stati trasformati in variabili dicotomiche, indicando con 0 i marcatori negativi e non valutabili e con 1 quelli che presentano una positività rara, focale, prevalente e diffusa. Inoltre, sono state ricategorizzate come variabili dicotomiche anche la mutazione sul codone 132, 100 dell'IDH1 e sul 172 dell'IDH2, lo stato di metilazione di MGMT e la codelezione 1p/19q. Sono stati studiati come variabili ordinali invece il ki67 e la frequenza delle crisi. La PFS e la OS sono state considerate come variabile continue mentre l'emisfero e la sede del tumore come variabili nominali multicotomiche.

## 6. Risultati

La presente tesi è stata condotta su 149 pazienti affetti da glioma, di cui 94 uomini e 55 donne. L'età media della coorte all'esordio dei sintomi è di 56 anni, con una Deviazione Standard (DS) di 14.25. Di questi pazienti, 90 (61.2%) soffrono di BTRE. Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte nella tabella 8.

<b>Numero totale dei pazienti 149</b>	
<b>Sesso (Maschi/ Femmine)</b>	94 (63%) / 55 (37%)
<b>Età all'esordio</b>	56 anni (DS: 14.25)
<b>Pazienti affetti da BTRE</b>	90 (61.2%)
<b>Tipo di epilessia</b>	
<i>Focali con consapevolezza preservata</i>	44 (49%)
<i>Focali con perdita della consapevolezza</i>	2 (2%)
<i>Generalizzate</i>	44 (49%)
<b>Crisi epilettiche motorie</b>	60 (67%)
<i>Crisi epilettiche non motorie</i>	30 (33%)
<b>Esordio epilessia</b>	
<i>Comparsa di crisi alla diagnosi</i>	74 (82%)
<i>Comparsa di crisi dopo la diagnosi o l'inizio della terapia</i>	16 (18%)
<b>Frequenza delle crisi all'esordio</b>	
<i>Rare</i>	75 (84%)
<i>Mensili</i>	7 (8%)
<i>Settimanali</i>	3 (3%)
<i>Quotidiane</i>	4 (5%)
<b>Frequenza delle crisi all'ultima visita</b>	
<i>Seizure free</i>	56 (64%)
<i>Rare</i>	23 (27%)
<i>Mensili</i>	6 (7%)
<i>Settimanali</i>	2 (2%)
<b>Tempo di follow-up (mesi)</b>	Media 55.2 ± 71.3

Tabella 8: schema riassuntivo delle principali caratteristiche inerenti l'epilessia dei nostri pazienti.

Nella tabella 9 è mostrata la terapia farmacologica dei pazienti.

## Trattamento antiepilettico

<b>Monoterapia</b>	95
	86 LEV
	3 CBZ
	2 LCM
	1 TPM
	1 VPA
	1 PRM
	1 PER
<b>Politerapia</b>	36
	13 VPA+LEV
	5 LEV+LCS
	2 VPA+LCS
	1 LEV+CBZ
	1 CBZ+LTG
	1 LEV+LTG
	1 LEV+OXC
	1 VPA+TPM
	1 CBZ+PHT
	1 LEV+ESL
	1 LEV+TPM
	1 LCM+BRIV
	1 PHT+LEV
	1 PHT+PB
	1 LEV+ PB
	1 LEV+LCM+VPA
	1 VPA+LTG+PHT
	1 VPA+LCS+PHT
	1 LCM+ BRIV+ PER

Tabella 9: Terapia antiepilettica disponibile all'ultima visita. LEV=levetiracetam, VPA= acido valproico, LCS= lacosamide, PHT=fenitoina, LTG= lamotrigina, PER= perampanel, CBZ= carbamazepina, ESL=eslicarbazepina, OXC= oxcarbazepina, TPM=topiramato, BRIV= brivaracetam, PRM= primidone.

<b>Sede</b>	
<i>Frontale</i> 52 (35%)	<i>Temporale</i> 32 (21%)
<i>Parietale</i> 20 (13%)	<i>Occipitale</i> 0 (0%)
<i>Multilobare</i> 38 (26%)	<i>Multifocale</i> 7 (5%)
<b>Emisfero</b>	
<i>Sinistro</i> 69 (46%)	<i>Destro</i> 75 (50%)
<i>Bilaterale</i>	5 (4%)
<b>Tipo istologico</b>	
<i>Astrocitoma diffuso</i>	17 (11%)
<i>Astrocitoma anaplastico</i>	12 (8%)
<i>Glioblastoma</i>	100 (68%)
<i>Oligodendroglioma diffuso</i>	11 (7%)
<i>Oligodendroglioma anaplastico</i>	7 (4%)
<i>Ganglioglioma</i>	1 (1%)
<i>Ependimoma anaplastico</i>	1 (1%)
<b>GFAP</b> (Negativa / Positiva)	5 (3%) / 144 (97%)
<b>Sinaptofisina</b> (Negativa/ Positiva)	88 (60%) / 61 (40%)
<b>Ki67</b>	
<1%: 4 (3%)	1-5%: 19 (13%)
5-10%: 19 (13%)	10-20%: 33 (22%)
20-40%: 40 (27%)	>40%: 34 (22%)
<b>ATRX</b> (Negativo/ Positivo)	79 (53%) / 70 (47%)
<b>P53</b> (Negativo/ positivo)	36 (25%) / 113 (75%)
<b>IDH1 codone 132</b> (Negativo/ Positivo)	105 (70%) / 44 (30%)
<b>IDH1 codone 100</b> (Negativo/ Positivo)	149 (100%) / 0 (0%)
<b>IDH2 codone 172</b> (Negativo/ Positivo)	130 (87%) / 19 (13%)
<b>MGMT</b> (Non metilato/ Metilato)	74 (50%) / 74 (50%)
<b>1p/19q</b> (Negativa/ Codelezione)	133 (88%) / 18 (12%)
<b>PFS (mesi)</b>	29.7 ± 52.6
<b>OS (mesi)</b>	35.8 ± 57.9

Tabella 10: caratteristiche oncologiche dei pazienti. GFAP= proteina acida fibrillare gliale, ATRX=  $\alpha$  thalassemia/ mental retardation syndrome X-linked, IDH= isocitrato deidrogenasi, MGMT= O6-methylguanine-DNA methyltransferase, PFS= progression free survival, OS= overall survival.



La tabella 10 comprende la sede in cui è localizzato il tumore, l'emisfero colpito, il tipo istologico e i principali marcatori molecolari studiati. Nel nostro studio, la sede più colpita è risultata essere quella frontale e il tumore più frequente il glioblastoma.

### *6.1 Associazione tra marcatori tumorali ed epilessia.*

Nel nostro studio, la sinaptofisina negativa è risultata associata in maniera statisticamente significativa ( $p=0.02$ ) all'epilessia. Nessun altro parametro tumorale è risultato significativamente associato all'epilessia. Tuttavia, nei pazienti BTRE, l'assenza di mutazione ATRX è risultata significativamente associata ( $p=0.012$ ) all'esordio di epilessia concomitante alla diagnosi, mentre i pazienti BTRE con presenza della mutazione ATRX hanno avuto spesso (nel 40% dei casi) l'esordio di epilessia dopo l'intervento neurochirurgico. Analogamente, nei pazienti BTRE, l'assenza di mutazione p53 è risultata significativamente associata ( $p=0.022$ ) all'esordio di epilessia concomitante alla diagnosi, mentre i pazienti BTRE con presenza della mutazione p53 hanno avuto spesso (nel 30% dei casi) l'esordio di epilessia dopo l'intervento neurochirurgico.

### *6.2 Risposta alla terapia*

È interessante notare come i pazienti affetti da BTRE, nel nostro studio, abbiano una bassa frequenza di crisi sia all'esordio di malattia (84.3% dei pazienti con crisi rare), che all'ultimo follow-up disponibile (64.4% dei pazienti seizure free e 26.4% con crisi rare). Tuttavia, nel nostro gruppo di studio non vi è nessun parametro legato alle caratteristiche topografiche o neuropatologiche del tumore, né caratteristiche cliniche epilettologiche, che sia in grado di predire la risposta alla terapia anticomiziale. L'unico parametro significativamente associato alla frequenza di crisi al follow-up è la frequenza di crisi all'esordio ( $p=0.026$ ), dove i pazienti con basse crisi all'esordio, rispondono meglio alla terapia anticomiziale.

### 6.3 Prognosi: PFS ed OS

Nel nostro studio, abbiamo studiato i possibili predittori di PFS ed OS.

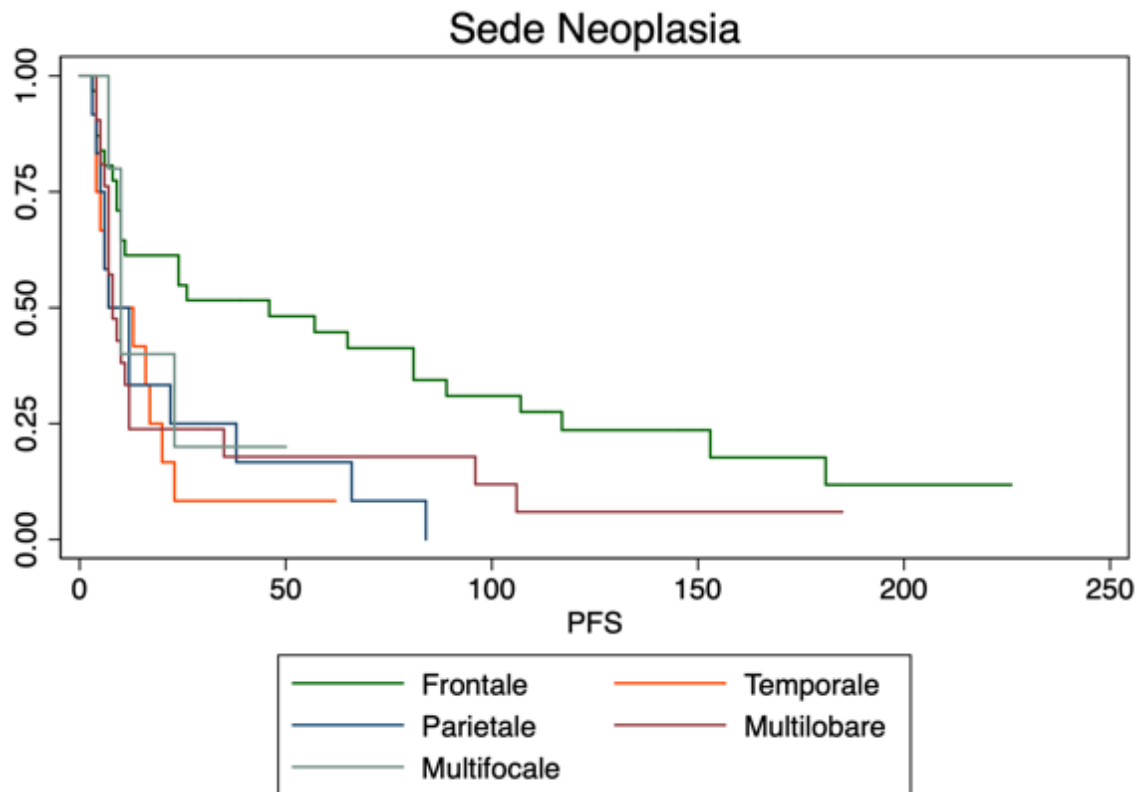


Figura 10: curva di Kaplan-Meier, analisi della sopravvivenza considerando la PFS e la sede del tumore.

Dalla figura 10 si evince che la sede del tumore è un predittore statisticamente significativo della PFS ( $p=0.0053$ ). In particolare, i tumori che hanno sede temporale (Hazard Ratio, HR 2.29, Intervallo di confidenza 95%, IC 1.07-4.91), ed i tumori multilobari (HR 2.11, IC 1.14-3.91) hanno una PFS peggiore, correggendo per età.

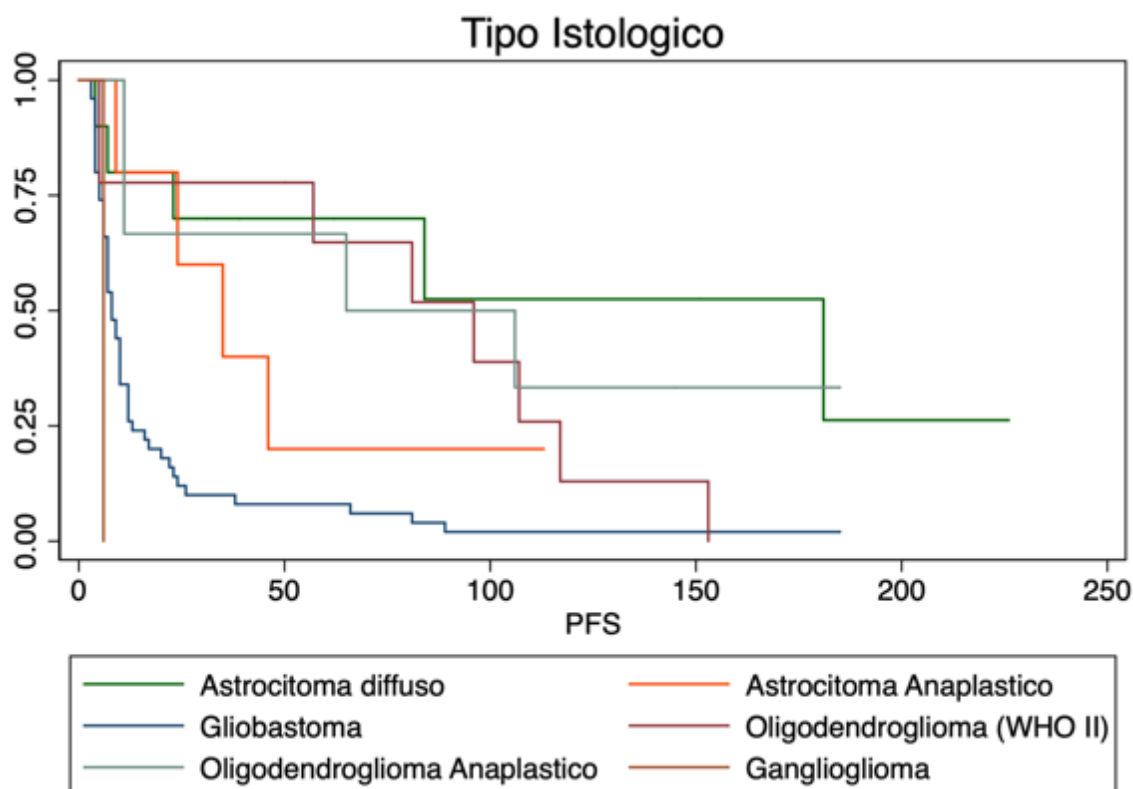


Figura 11: curva di Kaplan-Meier, analisi della sopravvivenza considerando la PFS e il tipo istologico del tumore.

Nella figura 11 vengono mostrate le curve che descrivono la PFS e la sua associazione con il tipo istologico del tumore ( $p < 0.0001$ ), correggendo l'analisi per l'età. In particolare, il glioblastoma è quello associato ad una prognosi peggiore (HR 4.95, IC 1.90 – 12.90). Per quanto riguarda il ganglioglioma e l'ependimoma, i campioni sono troppo esigui per studiarne correttamente la PFS.

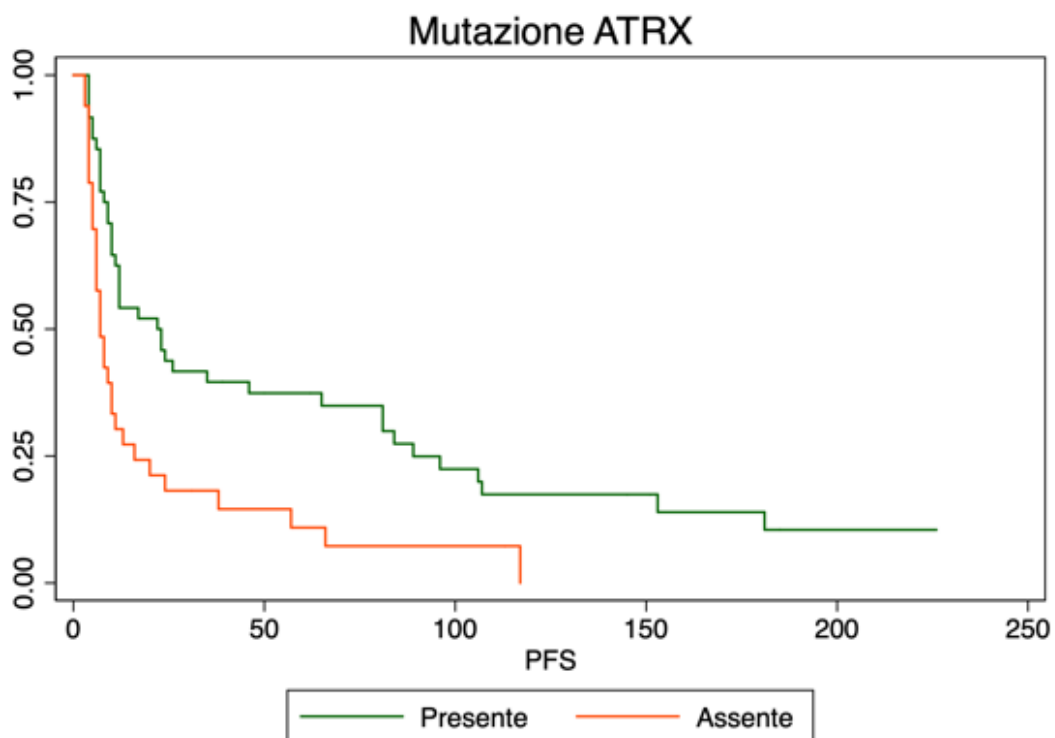


Figura 12: curva di Kaplan-Meier, analisi della sopravvivenza considerando la PFS e la presenza o assenza della mutazione ATRX.

L'assenza della mutazione ATRX si associa a una prognosi peggiore, con una PFS più sfavorevole rispetto ai tumori che la presentano ( $p=0.0004$ ; HR 2.01, IC 1.23 – 3.30).

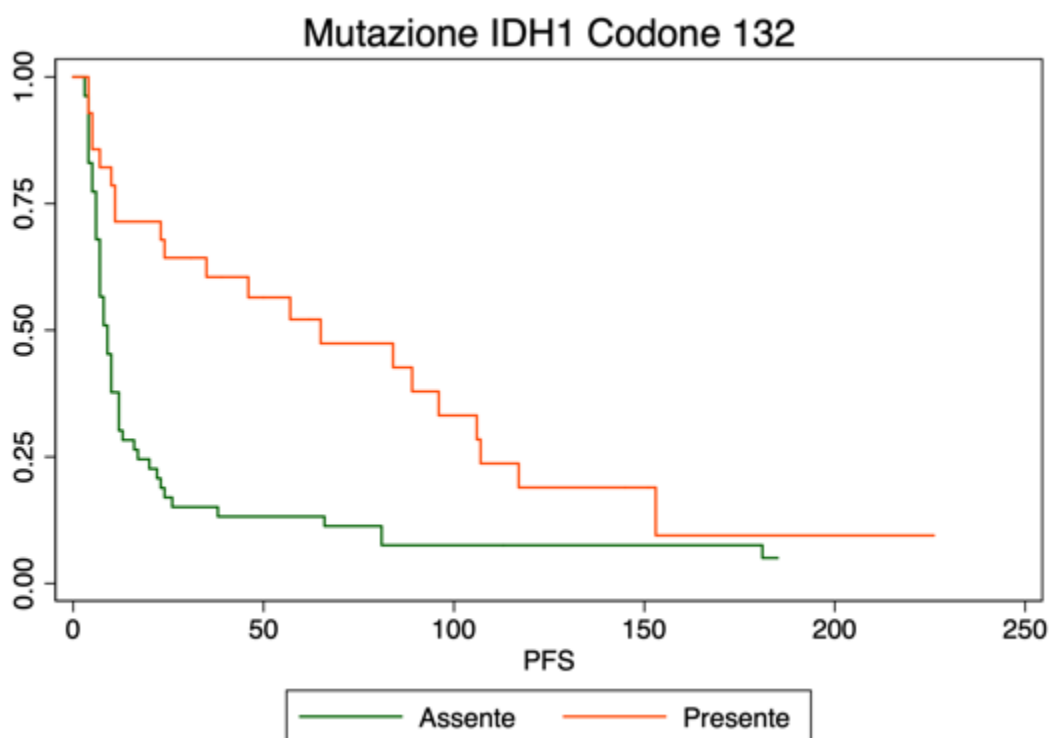


Figura 13: curva di Kaplan-Meier: associazione tra la PFS e la presenza o assenza della mutazione IDH1 sul codone 132.

Dalla figura 13 emerge che i tumori che presentano la mutazione di IDH1 sul codone 132 hanno una PFS migliore rispetto ai tumori che non la presentano ( $p=0.0012$ , HR 0.52, IC 0.29 – 0.92), correggendo per l'età.

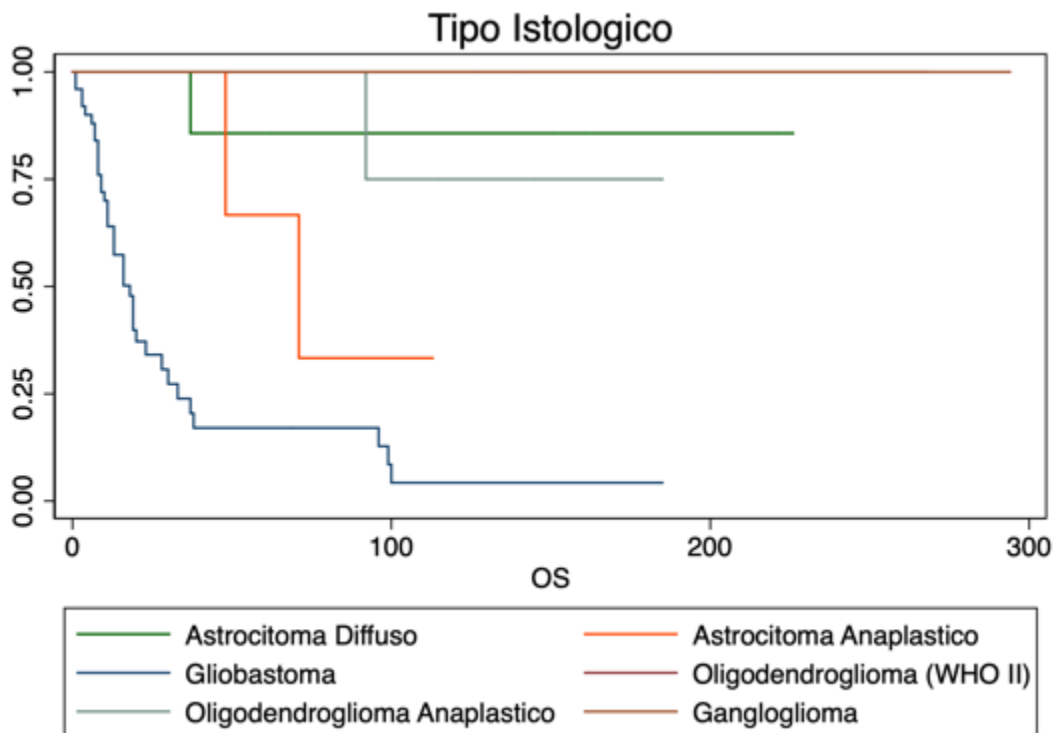


Figura 14: curva di Kaplan-Meier, analisi della sopravvivenza considerando l'OS e il tipo istologico del tumore.

Nella figura 14 abbiamo analizzato l'OS e la sua associazione con il tipo istologico ( $p < 0.0001$ ). Anche in questo caso il glioblastoma è quello associato ad una prognosi peggiore (HR 17.38, IC 2.35 – 128.40). Per il ganglioglioma e l'ependimoma permane la stessa problematica inerente al numero limitati di dati.

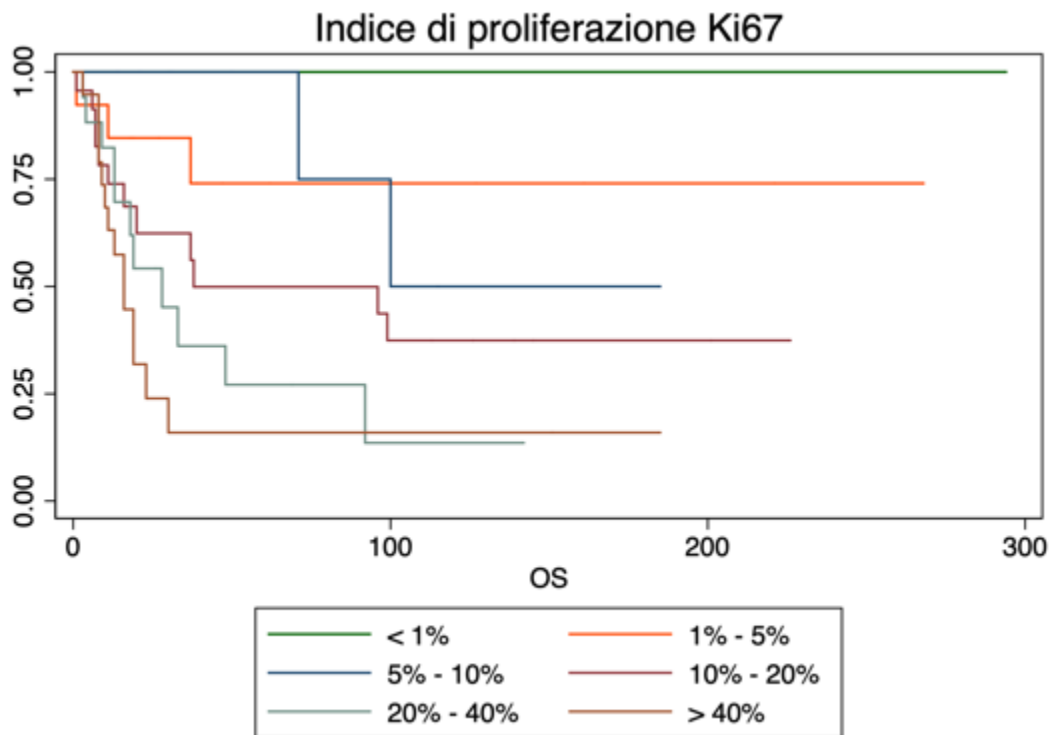


Figura 15: curva di Kaplan-Meier che mostra l'associazione tra il valore dell'indice di proliferazione ki67 e l'OS.

Dalla figura 15 si nota come all'aumentare del valore in percentuale del ki67, diminuisce l'OS dei pazienti affetti da tumore ( $p < 0.0001$ ), correggendo per età.

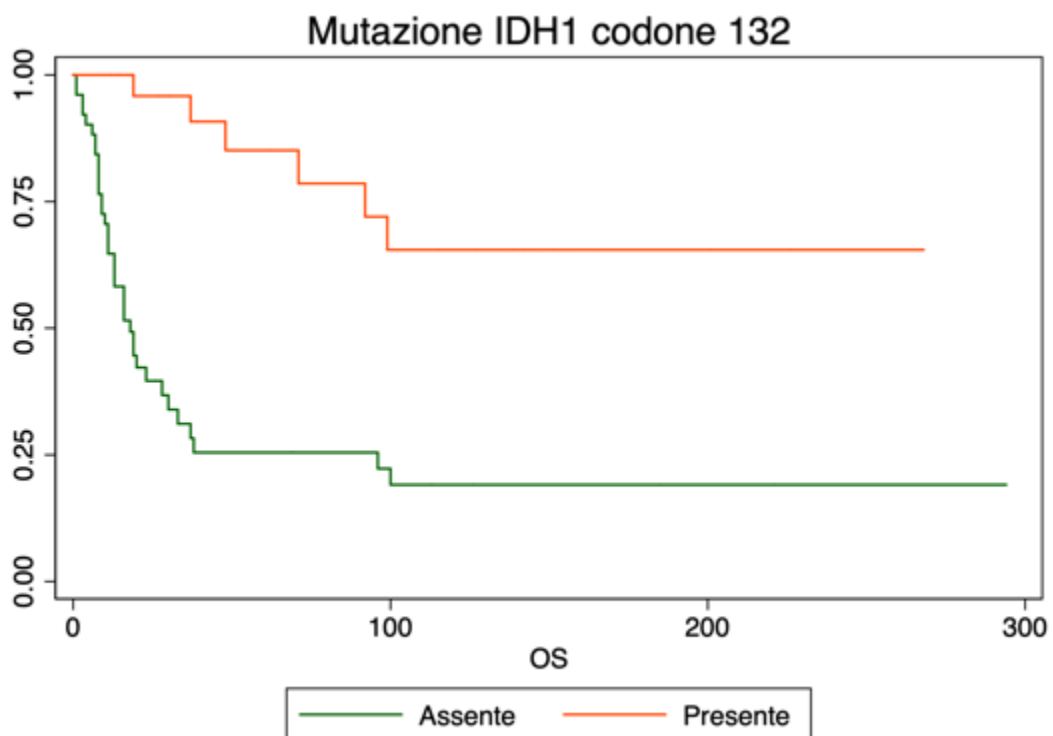


Figura 16: curva di Kaplan-Meier che mostra l'associazione tra l'OS e la presenza o assenza della mutazione IDH1 sul codone 132.

Nella figura 16 si è dimostrato che i pazienti affetti da tumore cerebrale con mutazione di IDH1 sul codone 132 hanno una OS più favorevole rispetto ai pazienti con tumore wild-type ( $p < 0.0001$ ; HR 0.23, IC 0.09 – 0.56).



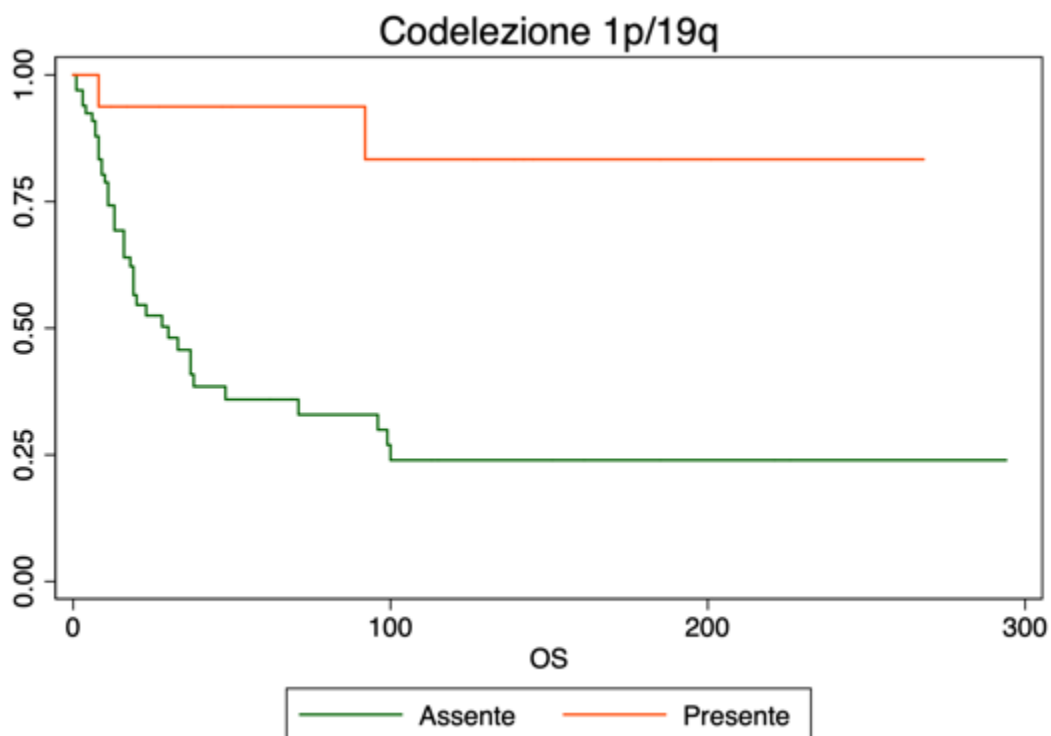


Figura 17: curva di Kaplan-Meier raffigurante l'associazione tra l'OS e la presenza o assenza della codelezione 1p/19q.

Infine, nella figura 17 si è dimostrato che nella nostra coorte, i pazienti affetti da tumore cerebrale con codelezione 1p/19q, hanno una OS migliore rispetto ai pazienti che non la presentano ( $p < 0.0001$ , HR 0.16, IC 0.04 – 0.67).

Nessun parametro epilettologico è risultato significativamente associato alla prognosi tumorale.

## ***7. Discussione***

La gestione dei pazienti affetti da epilessia tumorale sintomatica rappresenta ancora oggi una importante sfida. Infatti, si tratta di individui che presentano due patologie simultaneamente, ossia un tumore cerebrale e l'epilessia, le quali però richiedono iter diagnostici complessi, ricorso alla chirurgia, radioterapia nonché una polifarmacoterapia che agisca contro il tumore e le crisi epilettiche. A tal proposito è necessario che i pazienti vengano seguiti nel corso del tempo da un team multidisciplinare, in modo da gestire ogni singolo aspetto di questa patologia altamente invalidante.

La fisiopatologia dell'epilessia correlata ai tumori cerebrali non è del tutto definita, sarebbe quindi importante capire quali meccanismi ne determinino l'insorgenza, al fine di poter meglio predire e controllare di conseguenza l'epilessia. Non è in effetti chiaro ad oggi, se la comparsa di BTRE possa dipendere dall'istologia, dalla localizzazione, dall'estensione topografica del tumore, dal microambiente della barriera emato-encefalica, dalle alterazioni dell'omeostasi dei neurotrasmettitori, come il glutammato ma anche degli ioni, come il potassio, e dalle disregolazioni delle giunzioni cellulari.

Attualmente, vi è una forte carenza di lavori basati sulla ricerca dei fenomeni patologici, soprattutto molecolari, coinvolti nella BTRE.<sup>102</sup> Il nostro studio si è prefissato l'obiettivo di ricercare possibili correlazioni tra i markers biomolecolari dei tumori cerebrali, sia di alto che di basso grado, e l'epilessia sintomatica ad essi associate, per capire come queste due patologie si influenzino reciprocamente, sia dal punto di vista diagnostico che prognostico.

Da questo lavoro, condotto su 149 pazienti consecutivi, è emerso che oltre il 60% dei pazienti soffre di BTRE, e che la maggior parte di essi la sviluppa in concomitanza alla diagnosi radiologica del tumore. Un dato interessante emerso nel nostro gruppo di studio è che la sinaptofisina negativa è associata in maniera statisticamente significativa all'epilessia. Inoltre, l'assenza di mutazione di ATRX è risultata significativamente associata all'esordio di epilessia concomitante alla diagnosi. Anche l'assenza della mutazione di p53 si associa in maniera statisticamente significativa all'esordio con epilessia. La presenza di queste due mutazioni si associa

alla comparsa di eventi parossistici dopo l'inizio del trattamento neurochirurgico e/o radio-chemioterapico.

La sinaptofisina è una glicoproteina che costituisce un complesso proteico insieme alla sinaptobrevina e di fatto sono le proteine più abbondanti delle vescicole sinaptiche.<sup>54</sup> La sinaptofisina è un marker relativamente affidabile della differenziazione neuronale ed è tipicamente riscontrata soprattutto nei tumori neuronali primitivi, come il medulloblastoma. Insieme alla cromogranina, è utile per sottolineare la presenza di cellule, sia normali che neoplastiche, dei gangli, così come quelle dei tumori neuroendocrini, come l'adenoma pituitario, i carcinoidi e i paragangliomi.<sup>103</sup> Alcuni studi hanno dimostrato che la mutazione del gene che codifica per la sinaptofisina si associa alla disabilità intellettiva X-linked, all'epilessia e alla demenza frontotemporale.<sup>104,105</sup> Fondamentalmente, il suo ruolo consiste nel controllare che il rilascio neurotrasmettitoriale, controllato soprattutto dalla sinaptobrevina, avvenga correttamente.<sup>54</sup> Dal nostro studio è emerso che la sinaptofisina negativa, studiata mediante indagini di immunoistochimica, si associa alla presenza di epilessia nei pazienti affetti da tumore cerebrale. Questo è un dato nuovo in letteratura e pertanto, se confermato in studi indipendenti, potrebbe aprire ad importanti considerazioni circa i meccanismi della BTRE.

Per quanto concerne la prognosi epilettologica, non è emerso alcun parametro che possa predire la risposta alla terapia farmacologica. Tuttavia, dal nostro studio è emerso che i pazienti con una bassa frequenza di crisi all'esordio hanno una migliore risposta alla terapia anticomiziale.

Dall'analisi invece riguardante la prognosi dei pazienti, è emerso che i tumori localizzati nel lobo temporale, ed i tumori multilobari, il glioblastoma, l'assenza della mutazione di ATRX e di IDH1 sul codone 132 sono tutte caratteristiche neuroncologiche che si associano a una PFS peggiore. Inoltre, il glioblastoma, l'assenza della codelezione 1p/19q e di mutazione di IDH1, ed alti valori in percentuale del ki67 correlano significativamente con un OS più sfavorevole.

Diversi studi osservazionali hanno dimostrato che l'esordio con epilessia rappresenta un fattore prognostico favorevole associato a una sopravvivenza prolungata.<sup>91,106-108</sup> Tale dato non è emerso nel nostro gruppo di studio, dove nessuna caratteristica epilettologica è risultata significativamente associata alla prognosi oncologica. Sono pertanto necessari ulteriori studi per chiarire questo dato controverso.

Per quanto riguarda gli altri marcatori molecolari, alcuni studi sostengono che la presenza della mutazione di IDH1 si associ più frequentemente alla presenza di epilessia.<sup>109-112</sup> Secondo altri invece, non vi sarebbe una correlazione statisticamente significativa.<sup>90, 113</sup> Dal nostro studio non è emersa un'associazione tra la BTRE e l'IDH1. Ciò può essere attribuito al fatto che nella popolazione analizzata, i pazienti senza la mutazione di IDH1 sono circa il 70%, per cui vi è un importante squilibrio tra i pazienti con e senza questa anomalia e inoltre, il tumore più frequente è di alto grado e quindi si associa meno frequentemente alla mutazione. Nonostante questo, si è osservata una prognosi significativamente migliore nei pazienti con la mutazione nella presente coorte, dato ormai acclarato in letteratura.<sup>73,84,91</sup>

La metilazione del promotore del gene MGMT è un fattore prognostico favorevole<sup>80,84</sup> e nel nostro studio, comparando lo stato della metilazione con la PFS, non si è raggiunta però la significatività statistica che lo dimostrasse. Per quanto concerne la correlazione con la BTRE, dal nostro lavoro non si evince una correlazione significativa con l'MGMT e in letteratura i dati sembrano essere contrastanti. Secondo uno studio del 2016, i pazienti che hanno una bassa espressione della proteina MGMT sviluppano l'epilessia soprattutto dopo l'intervento chirurgico.<sup>114</sup> In contrasto a questa evidenza, un altro studio del 2019 ha dimostrato che la metilazione del gene del promotore di MGMT si associa a un migliore controllo delle crisi nel post-operatorio.<sup>112</sup> Un ulteriore lavoro, più recente, smentisce quest'ultimo, dimostrando che si ha una buona gestione delle crisi nei pazienti affetti da tumore con mutazione di IDH1 e MGMT ipometilato.<sup>82</sup> Infine, una meta-analisi del 2021 ha riscontrato che non vi è una associazione statisticamente significativa tra il tasso di metilazione di MGMT e l'epilessia perioperatoria.<sup>91</sup> I dati del nostro studio sembrano confermare il riscontro di questa meta-analisi.

I tumori che presentano sia la mutazione di IDH1 che la codelezione 1p/19q hanno una prognosi migliore.<sup>45,47,84,88</sup> Tale dato è stato confermato anche nel presente studio, nonostante la limitata rappresentazione degli oligodendrogliomi nel nostro campione, che in totale sono 18.

I dati disponibili in letteratura propendono per l'assenza di una correlazione tra la codelezione 1p/19q e l'epilessia.<sup>60,90,112</sup> Anche dalla meta-analisi precedentemente citata si è dimostrata l'assenza di una correlazione tra la codelezione e l'epilessia perioperatoria<sup>91</sup> mentre pochi studi invece hanno mostrato una possibile associazione.<sup>89</sup> Nel presente lavoro, non è stata riscontrata una associazione statisticamente significativa tra la codelezione 1p/19q e l'insorgenza di epilessia.

Il gene p53 è un oncosoppressore coinvolto nell'induzione dell'apoptosi e nella regolazione del ciclo cellulare ed è ormai comprovato che i tumori che presentano la mutazione di tp53 hanno una prognosi peggiore.<sup>67</sup> Tuttavia, il ruolo di p53 nell'epilettogenesi tumorale non è ancora stato chiarito definitivamente, infatti secondo alcuni studi l'espressione di p53 aumenta notevolmente nei neuroni di modelli murini danneggiati dall'epilessia e dall'ischemia<sup>68</sup>, mentre secondo altri la sua assenza si assocerebbe alla presenza di stato epilettico.<sup>69</sup> Altri autori hanno scoperto, attraverso studi mirati sull'epilessia tumorale, che i pazienti di età inferiore ai sessant'anni che presentano un'overespressione di p53, più frequentemente hanno un glioblastoma e hanno una sopravvivenza maggiore rispetto a pazienti di età superiore e senza l'aumentata espressione di p53.<sup>61</sup> Uno studio del 2020 ha dimostrato invece che la mutazione di p53 potrebbe rappresentare uno dei meccanismi sottostanti l'epilessia resistente alla terapia nei pazienti affetti da astrocitomi e oligodendrogliomi. Tuttavia, sempre nello stesso lavoro, la mutazione di ATRX invece si associava a un miglior controllo delle crisi, suggerendo l'ipotesi che la resistenza farmacologica sia dovuta a una via di signaling cellulare diversa dalla p53-ATRX.<sup>115</sup> Nel presente studio, è interessante notare come l'assenza di tali mutazioni, nei pazienti con BTRE, identifichi quei pazienti con crisi alla diagnosi oncologica, mentre la presenza di tali mutazioni è più frequentemente presente nei pazienti BTRE che sviluppano crisi dopo terapia.

I tumori IDH mutati e con la mutazione di ATRX hanno una prognosi migliore rispetto ai pazienti che non presentano queste due alterazioni<sup>65</sup>, però non è ancora stato stabilito se la sola mutazione di ATRX possa avere lo stesso risvolto clinico. I dati in letteratura riguardo alla funzione che questo gene svolge nella BTRE sono estremamente carenti. Solo uno studio del 2021, analizzando l'età dei pazienti, il grado secondo la classificazione WHO 2016, la mutazione di IDH1, i livelli di ATRX, ki67, ha dimostrato che questi ultimi due marcatori, quando sono mancanti o hanno una bassa espressione, rispettivamente, sono fattori indipendenti per la presenza di epilessia preoperatoria nei soggetti con glioma.<sup>60</sup>

L'indice di proliferazione, secondo uno studio del 2012, quando altamente espresso, gioca un ruolo fondamentale nell'aver crisi ricorrenti durante il decorso clinico postoperatorio nei pazienti affetti da glioma di basso grado e quindi potrebbe essere importante anche per predire la progressione tumorale che spesso si manifesta con epilessia.<sup>116</sup> Nel presente studio è emerso che valori maggiori dell'indice di proliferazione si associano a una riduzione della OS. Questo dato concorda con la letteratura, anche se alcuni studi hanno dimostrato che la relazione tra la percentuale di ki67 e la PFS e la OS esiste ed è consistente solo in analisi univariate.<sup>117,118</sup>

La proteina acida fibrillare gliale (GFAP), ossia l'unità proteica essenziale di cui sono costituiti i filamenti intermedi di tipo III degli astrociti, viene utilizzata comunemente per la diagnosi dei tumori cerebrali. La sua espressione varia in base alla istologia della neoplasia, ma come per gli altri marcatori, non è stato definito un cutoff preciso per poter identificare la OS o la PFS. Secondo alcuni autori, vi è una perdita progressiva della produzione della GFAP all'aumentare della malignità negli astrocitomi.<sup>58</sup> La GFAP, essendo un marker degli astrocitomi, è stata ampiamente usata in passato per determinare la differenziazione gliale, che si associa a una minore malignità tumorale. Nonostante ciò, questa proteina non è espressa solo dagli astrociti maturi ma anche dalle cellule della glia radiale durante lo sviluppo dell'encefalo e dalle cellule staminali nervose nel cervello adulto. Uno studio del 2018 ha ipotizzato che l'espressione della GFAP negli astrocitomi non costituisce una indicazione diretta alla differenziazione gliale e quindi non si associa a un fenotipo meno maligno. La GFAP è eterogeneamente espressa negli astrocitomi e di conseguenza è difficile stabilire una relazione tra la sua espressione e il grado del

tumore. Inoltre, esistendo diversi sottotipi di questa proteina, con morfologia e funzioni diverse, è riduttivo definirla solamente come un marker di differenziazione astrocitaria. Sarebbe opportuno, in studi futuri, iniziare a studiare separatamente le diverse isoforme, per esempio la GFAP  $\delta$  e la GFAP  $\alpha$ , per comprendere meglio il loro ruolo nella crescita e maturazione dei tumori astrocitari.<sup>119</sup> Anche un altro studio del 2019 ha supportato questa teoria, ossia che il grado di espressione di GFAP non rilevante per definire il grado di malignità degli astrocitomi.<sup>120</sup> Infine, un lavoro del 2019 ha studiato l'espressione della GFAP nei glioblastomi primari e dai risultati è emerso che i tumori con un'alta percentuale (75%) della proteina hanno una prognosi più sfavorevole rispetto a quelli con una minore espressione. Questa ipotesi fornisce comunque un punto di vista diverso visto che ha trattato tumori di alto grado, mentre quasi tutti gli studi presenti in letteratura che hanno analizzato la GFAP si sono focalizzati sui bassi gradi.<sup>59</sup> Dal nostro lavoro non emergono particolari correlazioni tra la GFAP e la PFS o la OS e nemmeno una qualche associazione con l'epilessia sintomatica. Pertanto, i nostri dati suggeriscono che tale proteina, seppur utilizzata per la diagnosi oncologica, non sia utile né da un punto di vista prognostico, né per quanto riguarda la BTRE.

Per quanto riguarda aspetti non inerenti ai biomarcatori molecolari, bisogna considerare la localizzazione tumorale. La localizzazione del tumore e la sua correlazione con la BTRE risulta controversa. Infatti, i gliomi possono insorgere in qualsiasi parte del cervello, così come l'epilessia. I dati della letteratura riportano che le sedi che più frequentemente si associano all'insorgenza di epilessia sono il lobo frontale, temporale e parietale.<sup>121</sup> Tuttavia, questi sono i lobi più frequentemente sede di neoplasia, e tale dato è confermato anche nel presente studio dove la sede di neoplasia era il lobo frontale nel 34.9% dei casi, il temporale nel 21.5% ed il parietale nel 13.4%. Nella nostra casistica, non vi è però una associazione statisticamente significativa tra sede della neoplasia e presenza/assenza di epilessia

Infine, una problematica tutt'oggi molto rilevante riguarda la scelta di introdurre la terapia anticomiziale e la sua sospensione. Infatti, nel nostro studio ci sono 90 pazienti su 149 affetti da BTRE, ma sono 131 quelli ad aver mantenuto la terapia antiepilettica anche durante il follow-up, sebbene alcuni non abbiano mai avuto una

crisi epilettica. A tal proposito, le linee guida dell'Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM)<sup>122</sup> e quelle della società europea di neurooncologia (EANO, European Association of Neuro-Oncology)<sup>123</sup> sostengono che nei pazienti con tumore cerebrale primitivo o metastatico senza storia di crisi epilettiche, una terapia antiepilettica profilattica non deve essere presa in considerazione. Questa evidenza, che sottende una forte raccomandazione, si basa su 3 metanalisi, che hanno dimostrato la mancanza di efficacia della terapia anticomiziale nel prevenire le crisi e invece hanno constatato in taluni casi un aumento degli eventi avversi della terapia.<sup>124-127</sup> Tale dato deve aumentare la sensibilità del team multidisciplinare neurooncologico su questo tema, e sottolinea l'importanza che un neurologo epilettologo sia parte del team per una migliore gestione della terapia anticomiziale.

### *7.1 Limiti dello studio*

I limiti di questo studio sono diversi. Innanzitutto, la popolazione studiata è composta in prevalenza da soggetti affetti da tumori di alto grado, come i glioblastomi, gli astrocitomi, oligodendrogliomi anaplastici. Essendo un gruppo di studio naturalistico, consecutivo, dal punto di vista epidemiologico questa incidenza risulta corretta. Tuttavia, questa discrepanza ha verosimilmente fatto sì che non emergesse un importante dato ormai comprovato in letteratura, ossia che l'epilessia sintomatica si associa soprattutto ai tumori di basso grado.<sup>128,129</sup> Inoltre, lo studio è stato effettuato in maniera retrospettiva, e la raccolta dati non era stata fatta con lo scopo esplicito di studiare la BTRE. È attualmente in corso una raccolta dati prospettica che, negli anni a venire, tenderà di sopperire a tali limiti.

Inoltre, un altro limite è dato dal fatto che i pazienti di questo studio retrospettivo non presentano tutti la stessa durata al follow-up. Ciò impatta soprattutto dal punto di vista dell'analisi della sopravvivenza, poiché i pazienti introdotti per ultimi hanno una PFS e una OS più brevi non per le caratteristiche del tumore ma più che altro per le tempistiche con cui sono stati raccolti i dati. Quindi, ci sono pazienti che hanno una PFS o OS realmente di pochi mesi perché effettivamente hanno avuto rapidamente recidiva o decesso e poi ci sono altri soggetti che hanno questi parametri di sopravvivenza inficiati dal fatto di esser stati reclutati per ultimi.



I risultati emersi da questo studio sicuramente dovranno essere confermati anche da altre evidenze, basandosi sull'analisi dei marcatori per i quali i dati disponibili sono ancora carenti ed associandoli possibilmente anche con le caratteristiche cliniche dei pazienti, valutando per esempio la qualità di vita con la scala di Karnofsky o quelle oncologiche, comparando la radioterapia e la chemioterapia alla terapia antiepilettica per ricercare possibili interazioni e risvolti sui pazienti.

## ***8. Conclusioni***

L'epilessia sintomatica tumorale è una patologia molto complessa e altamente impattante sulla qualità di vita dei pazienti affetti, poiché consta della copresenza di due malattie in simultanea, ossia l'epilessia e i tumori cerebrali. Alla base di questo fenomeno vi sono diversi meccanismi intercellulari, neurotrasmettitoriali e anche molecolari. Il nostro studio ha ricercato possibili associazioni soprattutto tra i biomarcatori molecolari e l'epilessia, facendo emergere che la negatività della sinaptofisina si associa alla BTRE, mentre altri markers, come l'MGMT, l>IDH1, la codelezione 1p/19q non presentano altrettanto. Inoltre, le mutazioni di ATRX e p53 sono risultate essere correlata ad un fenotipo epilettico specifico.

Vista l'importanza notevole che questi marcatori rivestono nella patogenesi tumorale, come anche sottolineato dalla WHO che nel 2021 ha prodotto una nuova classificazione incentrandosi proprio su questi aspetti, servono in futuro altri studi mirati alla ricerca di possibili fattori implicati sia nell'epilettogenesi che nella tumorigenesi, al fine di poter meglio diagnosticare, stadiare le patologie e trattare i pazienti.

## 9. Bibliografia

1. Beghi, E., de Maria, G., Gobbi, G. & Veneselli, E. Diagnosis and treatment of the first epileptic seizure: Guidelines of the Italian League against Epilepsy. in *Epilepsia* vol. 47 2–8 (2006).
2. Fisher, R. S. *et al.* *Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE)*. *Epilepsia* vol. 46 (2005).
3. Scheffer, I. E. *et al.* ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* **58**, 512–521 (2017).
4. Fazio, C. & Loeb, C. *Neurologia*. vol. 2 (Società Editrice Universo , 2019).
5. Guerrini, R., Marini, C. & Barba, C. Generalized epilepsies. in *Handbook of Clinical Neurology* vol. 161 3–15 (Elsevier B.V., 2019).
6. Li, B., Jiang, S., Zhang, G. & Zhang, J. Correlation of Brain Tumor-related Epilepsy With Clinicopathological Factors in Gliomas. (2021) doi:10.21203/rs.3.rs-542204/v1.
7. Patel, A. P. *et al.* Global, regional, and national burden of brain and other CNS cancer, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology* **18**, 376–393 (2019).
8. Giuseppe Lombardi, V. Z. e A. W. G. i numeri del cancro in Italia 2021. *Intermedia Editore* 77–78 [https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2021/10/2021\\_NumeriCancro\\_web.pdf](https://www.aiom.it/wp-content/uploads/2021/10/2021_NumeriCancro_web.pdf).
9. Ostrom, Q. T. *et al.* CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro-Oncology* **22**, IV1–IV96 (2020).
10. Maschio, M. & Newton, H. B. Brain Tumor-Related Epilepsy: Introduction and Overview. in *Epilepsy and Brain Tumors* 1–9 (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/B978-0-12-417043-8.00001-8.
11. Chen, D. Y., Chen, C. C., Crawford, J. R. & Wang, S. G. Tumor-related epilepsy: epidemiology, pathogenesis and management. *Journal of Neuro-Oncology* vol. 139 13–21 (2018).
12. Lote, K., Stenwig, A. E., Skullerud, K. & Hirschberg, H. *Original Paper Prevalence and Prognostic Significance of Epilepsy in Patients with Gliomas*. *Eur J Cancer* vol. 34 (1998).
13. Shamji, M. F., Fric-Shamji, E. C. & Benoit, B. G. Brain tumors and epilepsy: Pathophysiology of peritumoral changes. *Neurosurgical Review* vol. 32 274–284 (2009).
14. de Curtis, M., Librizzi, L. & Avanzini, G. Mechanisms of Focal Epileptogenesis. in *Epilepsy and Brain Tumors* 101–109 (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/B978-0-12-417043-8.00006-7.

15. Adhikari, S., Walker, B. C. & Mittal, S. Pathogenesis and Management of Brain Tumor-Related Epilepsy. in *Gliomas* 199–210 (Exon Publications, 2021). doi:10.36255/exonpublications.gliomas.2021.chapter12.
16. Cascino, G. D. *Epilepsy and Brain Tumors: Implications for Treatment. Epilepsia* vol. 3 (1990).
17. Chernov, M. F. *et al.* Proton MRS of the peritumoral brain. *Journal of the Neurological Sciences* **228**, 137–142 (2005).
18. Zagzag, D. *et al.* Geldanamycin inhibits migration of glioma cells in vitro: A potential role for hypoxia-inducible factor (HIF-1 $\alpha$ ) in glioma cell invasion. *Journal of Cellular Physiology* **196**, 394–402 (2003).
19. Staub, F., Jansen, M., Schodel, F. & Baethmann, A. *Glial Swelling During Extracellular Acidosis In Vitro*. <http://ahajournals.org>.
20. Brat, D. J. & Mapstone, T. B. *Malignant Glioma Physiology: Cellular Response to Hypoxia and Its Role in Tumor Progression*. [www.annals.org](http://www.annals.org) (2003).
21. Zimmer, T. S. *et al.* Seizure-mediated iron accumulation and dysregulated iron metabolism after status epilepticus and in temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathologica* **142**, 729–759 (2021).
22. Stone, T. J., Rowell, R., Jayasekera, B. A. P., Cunningham, M. O. & Jacques, T. S. Review: Molecular characteristics of long-term epilepsy-associated tumours (LEATs) and mechanisms for tumour-related epilepsy (TRE). *Neuropathology and Applied Neurobiology* vol. 44 56–69 (2018).
23. Aronica, E. *et al.* Gene expression profile analysis of epilepsy-associated gangliogliomas. *Neuroscience* **151**, 272–292 (2008).
24. Rossi, D. & Volterra, A. Astrocytic dysfunction: Insights on the role in neurodegeneration. *Brain Research Bulletin* vol. 80 224–232 (2009).
25. Tarassishin, L., Casper, D. & Lee, S. C. Aberrant expression of interleukin-1 $\beta$  and inflammasome activation in human malignant gliomas. *PLoS ONE* **9**, (2014).
26. Weischer, M., Röcken, M. & Berneburg, M. Calcineurin inhibitors and rapamycin: Cancer protection or promotion? *Experimental Dermatology* vol. 16 385–393 (2007).
27. Pei, Z., Lee, K. C., Khan, A., Erisnor, G. & Wang, H. Y. Pathway analysis of glutamate-mediated, calcium-related signaling in glioma progression. *Biochemical Pharmacology* vol. 176 (2020).
28. Buckingham, S. C. & Robel, S. Glutamate and tumor-associated epilepsy: Glial cell dysfunction in the peritumoral environment. *Neurochemistry International* vol. 63 696–701 (2013).
29. Hachem, L. D., Mothe, A. J. & Tator, C. H. *Glutamate increases in vitro survival and proliferation and attenuates oxidative stress-induced cell death in adult spinal cord-*

*derived neural stem/progenitor cells via non-NMDA ionotropic glutamate receptors*  
Running Title: *Effect of glutamate on adult spinal cord NSPCs.*

30. Coppola, A. *et al.* Perampanel Confirms to Be Effective and Well-Tolerated as an Add-On Treatment in Patients With Brain Tumor-Related Epilepsy (PERADET Study). *Frontiers in Neurology* **11**, (2020).
31. Salmaggi, A. *et al.* Synergistic effect of perampanel and temozolomide in human glioma cell lines. *Journal of Personalized Medicine* **11**, (2021).
32. Ciceroni, C. *et al.* Type-3 metabotropic glutamate receptors regulate chemoresistance in glioma stem cells, and their levels are inversely related to survival in patients with malignant gliomas. *Cell Death and Differentiation* **20**, 396–407 (2013).
33. Cucchiara, F., Pasqualetti, F., Giorgi, F. S., Danesi, R. & Bocci, G. Epileptogenesis and oncogenesis: An antineoplastic role for antiepileptic drugs in brain tumours? *Pharmacological Research* vol. 156 (2020).
34. Smits, A. *et al.* GABA-a channel subunit expression in human glioma correlates with tumor histology and clinical outcome. *PLoS ONE* **7**, (2012).
35. Jussofie, A., Reinhardt, V. & Kalff, R. *Journal of Neural Transmission GABA binding sites: their density, their affinity to muscimol and their behaviour against neuroactive steroids in human gliomas of different degrees of malignancy. J Neural Transm* vol. 96 (1994).
36. Pallud, J. *et al.* *Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma.* [www.ScienceTranslationalMedicine.org](http://www.ScienceTranslationalMedicine.org).
37. Eleonora Aronica, J. A. G. G. H. J. S. L. B. Y. & D. T. Expression of connexin 43 and connexin 32 gap-junction proteins in epilepsy-associated brain tumors and in the perilesional epileptic cortex. *Acta Neuropathologica* 449–459 (2001).
38. David, Y. *et al.* Astrocytic dysfunction in epileptogenesis: Consequence of altered potassium and glutamate homeostasis? *Journal of Neuroscience* **29**, 10588–10599 (2009).
39. Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme.
40. Papadopoulos, M. C., Saadoun, S., Davies, D. C. & Bell, B. A. Emerging molecular mechanisms of brain tumour oedema. *British Journal of Neurosurgery* **15**, 101–108 (2001).
41. Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* vol. 131 803–820 (2016).
42. Huse, J. T., Diamond, E. L., Wang, L. & Rosenblum, M. K. Mixed glioma with molecular features of composite oligodendroglioma and astrocytoma: A true “Oligoastrocytoma”? *Acta Neuropathologica* vol. 129 151–153 (2015).

43. Reuss, D. E. *et al.* Adult IDH wild type astrocytomas biologically and clinically resolve into other tumor entities. *Acta Neuropathologica* **130**, 407–417 (2015).
44. Ohgaki, H. & Kleihues, P. *Population-Based Studies on Incidence, Survival Rates, and Genetic Alterations in Astrocytic and Oligodendroglial Gliomas.* *J Neuropathol Exp Neurol* vol. 64 <https://academic.oup.com/jnen/article/64/6/479/2916600> (2005).
45. Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *New England Journal of Medicine* **372**, 2481–2498 (2015).
46. Ohgaki, H. & Kleihues, P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clinical Cancer Research* vol. 19 764–772 (2013).
47. Louis, D. N. *et al.* The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Neuro-Oncology* **23**, 1231–1251 (2021).
48. Louis, D. N. & von Deimling, A. Grading of diffuse astrocytic gliomas: Broders, Kernohan, Zülch, the WHO... and Shakespeare. *Acta Neuropathologica* **134**, 517–520 (2017).
49. Louis, D. N. *et al.* International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. in *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* vol. 24 429–435 (2014).
50. Brat, D. J. *et al.* cIMPACT-NOW update 5: recommended grading criteria and terminologies for IDH-mutant astrocytomas. *Acta Neuropathologica* **139**, 603–608 (2020).
51. Brat, D. J. *et al.* cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for “Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV.” *Acta Neuropathologica* vol. 136 805–810 (2018).
52. Pinarbasi, E. & Pratt, D. *The Evolving Molecular Landscape of High-Grade Gliomas.* [www.journalppo.com](http://www.journalppo.com) (2021).
53. Wiedenmann, B., Franke, W. W., Kuhn, C., Moll, R. & Gould, V. E. *Synaptophysin: A marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms (synaptic vesicles/neurosecretory granules/pancreatic islets/carcinoids/tumor diagnosis).* *Medical Sciences* vol. 83 <https://www.pnas.org> (1986).
54. Cousin, M. A. Synaptophysin-dependent synaptobrevin-2 trafficking at the presynapse-Mechanism and function. *Journal of Neurochemistry* vol. 159 78–89 (2021).
55. Hinz, B. *et al.* *Activity-dependent changes of the presynaptic synaptophysin-synaptobrevin complex in adult rat brain.* [www.urbanfischer.de/journals/ejcb](http://www.urbanfischer.de/journals/ejcb).
56. McMahon, H. T. *et al.* *Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release.* *Neurobiology* vol. 93 (1996).
57. Duffy, P. E., Huang, Y.-Y., Rapport, M. M. & Graf, L. *Glial Fibrillary Acidic Protein in Giant Cell Tumors of Brain and Other Gliomas\* A Possible Relationship to*

*Malignancy, Differentiation, and Pleomorphism of Glia. Acta Neuropathol (Berl)* vol. 52 (1980).

58. Rutka, J. T. *et al.* Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review \* glial filament \* glial fibrillary acidic protein \* cytoskeleton \* intermediate filament \* phosphorylation \* kinase \* astrocyte.
59. Ahmadipour, Y., Gembruch, O., Pierscianek, D., Sure, U. & Jabbarli, R. Does the expression of glial fibrillary acid protein (GFAP) stain in glioblastoma tissue have a prognostic impact on survival? *Neurochirurgie* **66**, 150–154 (2020).
60. Li, B., Jiang, S., Zhang, G. & Zhang, J. Correlation of Brain Tumor-related Epilepsy With Clinicopathological Factors in Gliomas. (2021) doi:10.21203/rs.3.rs-542204/v1.
61. Toledo, M. *et al.* Epileptic features and survival in glioblastomas presenting with seizures. *Epilepsy Research* **130**, 1–6 (2017).
62. Schenkel, L. C. *et al.* Identification of epigenetic signature associated with alpha thalassemia/mental retardation X-linked syndrome. *Epigenetics and Chromatin* **10**, (2017).
63. Heaphy, C. M. *et al.* Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science* vol. 333 425 (2011).
64. Haberler, C. & Wöhrer, A. Clinical Neuropathology practice news 2-2014: ATRX, a new candidate biomarker in gliomas. *Clinical Neuropathology* **33**, 108–111 (2014).
65. Ebrahimi, A. *et al.* ATRX immunostaining predicts IDH and H3F3A status in gliomas. *Acta Neuropathol Commun* **4**, 60 (2016).
66. Brat, D. J. & Mapstone, T. B. *Malignant Glioma Physiology: Cellular Response to Hypoxia and Its Role in Tumor Progression.* www.annals.org (2003).
67. Zhang, Y. *et al.* The p53 pathway in glioblastoma. *Cancers* vol. 10 (2018).
68. Xiang, H. *et al.* Evidence for p53-Mediated Modulation of Neuronal Viability. (1996).
69. Engel, T. *et al.* Loss of p53 results in protracted electrographic seizures and development of an aggravated epileptic phenotype following status epilepticus. *Cell Death and Disease* **1**, (2010).
70. Dang, L. *et al.* Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* **462**, 739–744 (2009).
71. Flavahan, W. A. *et al.* Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas. *Nature* **529**, 110–114 (2016).
72. Bergaggio, E. & Piva, R. Wild-type idh enzymes as actionable targets for cancer therapy. *Cancers (Basel)* **11**, (2019).
73. Shi, J. *et al.* An IDH1 mutation inhibits growth of glioma cells via GSH depletion and ROS generation. *Neurological Sciences* **35**, 839–845 (2014).

74. Kofuji, S. *et al.* IMP dehydrogenase-2 drives aberrant nucleolar activity and promotes tumorigenesis in glioblastoma. *Nature Cell Biology* **21**, 1003–1014 (2019).
75. Garrett, M. *et al.* Emerging Roles of Wild-type and Mutant IDH1 in Growth, Metabolism and Therapeutics of Glioma. in *Gliomas* 61–78 (Exon Publications, 2021). doi:10.36255/exonpublications.gliomas.2021.chapter4.
76. Turcan, S. *et al.* IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* **483**, 479–483 (2012).
77. Johnson, B. E. *et al.* Mutational analysis reveals the origin and therapy-driven evolution of recurrent glioma. *Science (1979)* **343**, 189–193 (2014).
78. Chen, H. *et al.* *Mutant IDH1 and seizures in patients with glioma.* (2017).
79. Lauko, A., Lo, A., Ahluwalia, M. S. & Lathia, J. D. Cancer cell heterogeneity & plasticity in glioblastoma and brain tumors. *Seminars in Cancer Biology* (2021) doi:10.1016/j.semcancer.2021.02.014.
80. Brandner, S. *et al.* MGMT promoter methylation testing to predict overall survival in people with glioblastoma treated with temozolomide: A comprehensive meta-analysis based on a Cochrane Systematic Review. *Neuro-Oncology* **23**, 1457–1469 (2021).
81. Pan, S. P. *et al.* A novel nomogram for predicting the risk of epilepsy occurrence after operative in gliomas patients without preoperative epilepsy history. *Epilepsy Research* **174**, (2021).
82. Kurdi, M. *et al.* The Potential Effect of the IDH1 Mutation and MGMT Gene Promotor Methylation on the Control of Glioblastoma-Associated Epilepsy in Patients Receiving Anti-Epileptic Agents and Chemotherapies. doi:10.21203/rs.3.rs-314962/v1.
83. Pinkham, M. B. *et al.* FISHing Tips: What Every Clinician Should Know About 1p19q Analysis in Gliomas Using Fluorescence in situ Hybridisation. *Clinical Oncology* **27**, 445–453 (2015).
84. Whitfield, B. T. & Huse, J. T. Classification of adult-type diffuse gliomas: Impact of the World Health Organization 2021 update. *Brain Pathology* (2022) doi:10.1111/bpa.13062.
85. Astigarraga, S. *et al.* A MAPK docking site is critical for downregulation of Capicua by Torso and EGFR RTK signaling. *EMBO Journal* **26**, 668–677 (2007).
86. Elman, J. S. *et al.* Identification of FUBP1 as a Long Tail Cancer Driver and Widespread Regulator of Tumor Suppressor and Oncogene Alternative Splicing. *Cell Reports* **28**, 3435–3449.e5 (2019).
87. Chan, A. K. Y. *et al.* Loss of CIC and FUBP1 expressions are potential markers of shorter time to recurrence in oligodendroglial tumors. *Modern Pathology* **27**, 332–342 (2014).



88. van den Bent, M. J. *et al.* Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy in newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma: Long-term follow-up of EORTC brain tumor group study 26951. *Journal of Clinical Oncology* **31**, 344–350 (2013).
89. Mirsattari, S. M. *et al.* Do epileptic seizures predict outcome in patients with oligodendroglioma? *Epilepsy Research* **94**, 39–44 (2011).
90. Mulligan, L. *et al.* Genetic features of oligodendrogliomas and presence of seizures: The relationship of seizures and genetics in LGOs. *Clinical Neuropathology* **33**, 292–298 (2014).
91. Song, L., Quan, X., Chen, C., Chen, L. & Zhou, J. Correlation Between Tumor Molecular Markers and Perioperative Epilepsy in Patients With Glioma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Neurology* vol. 12 (2021).
92. Blackburn, E. H. *Review Switching and Signaling at the Telomere.* *Cell* vol. 106 (2001).
93. Ceccarelli, M. *et al.* Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell* **164**, 550–563 (2016).
94. Gao, K. *et al.* *TERT promoter mutations and long telomere length predict poor survival and radiotherapy resistance in gliomas* *These authors have contributed equally to this work.* vol. 7 [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget).
95. Shen, S. *et al.* Correlation of preoperative seizures with a wide range of tumor molecular markers in gliomas: An analysis of 442 glioma patients from China. *Epilepsy Research* **166**, (2020).
96. Stichel, D. *et al.* Distribution of EGFR amplification, combined chromosome 7 gain and chromosome 10 loss, and TERT promoter mutation in brain tumors and their potential for the reclassification of IDHwt astrocytoma to glioblastoma. *Acta Neuropathologica* **136**, 793–803 (2018).
97. Brennan, C. W. *et al.* The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* **155**, 462 (2013).
98. Lee, M., Kang, S. Y. & Suh, Y.-L. *Genetic Alterations of Epidermal Growth Factor Receptor in Glioblastoma: The Usefulness of Immunohistochemistry.* [www.appliedimmunohist.com](http://www.appliedimmunohist.com) (2018).
99. Liu, Y. *et al.* Rolling-translated EGFR variants sustain EGFR signaling and promote glioblastoma tumorigenicity. *Neuro-Oncology* **23**, 743–756 (2021).
100. Appay, R. *et al.* CDKN2A homozygous deletion is a strong adverse prognosis factor in diffuse malignant IDH-mutant gliomas. *Neuro-Oncology* **21**, 1519–1528 (2019).
101. Dunn, J. *et al.* Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *British Journal of Cancer* **101**, 124–131 (2009).

102. You, G., Sha, Z. & Jiang, T. The pathogenesis of tumor-related epilepsy and its implications for clinical treatment. *Seizure* vol. 21 153–159 (2012).
103. Jankovic, J., Mazziotta, J. C., Newman, N. J. & Pomeroy, S. L. *Bradley and Daroff's Neurology in Clinical Practice*. (2021).
104. Prota, J. *et al.* Slowly progressive behavioral frontotemporal dementia syndrome in a family co-segregating the C9orf72 expansion and a Synaptophysin mutation. *Alzheimer's and Dementia* **18**, 523–528 (2022).
105. Harper, C. B., Mancini, G. M. S., van Slegtenhorst, M. & Cousin, M. A. Altered synaptobrevin-II trafficking in neurons expressing a synaptophysin mutation associated with a severe neurodevelopmental disorder. *Neurobiology of Disease* **108**, 298–306 (2017).
106. Rudà, R. & Soffietti, R. What is New in the Management of Epilepsy in Gliomas? *Current Treatment Options in Neurology* vol. 17 (2015).
107. Pallud, J. *et al.* Epileptic seizures in diffuse low-grade gliomas in adults. *Brain* **137**, 449–462 (2014).
108. Huberfeld, G. & Vecht, C. J. Seizures and gliomas - Towards a single therapeutic approach. *Nature Reviews Neurology* vol. 12 204–216 (2016).
109. Liang, R., Fan, Y., Wang, X., Mao, Q. & Liu, Y. The significance of IDH1 mutations in tumor-associated seizure in 60 Chinese patients with low-grade gliomas. *The Scientific World Journal* **2013**, (2013).
110. Stockhammer, F. *et al.* IDH1/2 mutations in WHO grade II astrocytomas associated with localization and seizure as the initial symptom. *Seizure* **21**, 194–197 (2012).
111. Duan, W. C. *et al.* IDH mutations but not TERTp mutations are associated with seizures in lower-grade gliomas. *Medicine (United States)* **97**, (2018).
112. Feyissa, A. M. *et al.* Potential influence of IDH1 mutation and MGMT gene promoter methylation on glioma-related preoperative seizures and postoperative seizure control. *Seizure* **69**, 283–289 (2019).
113. Liubinas, S. v. *et al.* IDH1 mutation is associated with seizures and protoplasmic subtype in patients with low-grade gliomas. *Epilepsia* **55**, 1438–1443 (2014).
114. Yang, Y. *et al.* An analysis of 170 glioma patients and systematic review to investigate the association between IDH-1 mutations and preoperative glioma-related epilepsy. *Journal of Clinical Neuroscience* **31**, 56–62 (2016).
115. Suzuki, H. *et al.* Molecular aberrations associated with seizure control in diffuse astrocytic and oligodendroglial tumors. *Neurologia Medico-Chirurgica* **60**, 147–155 (2020).
116. You, G. *et al.* Seizure characteristics and outcomes in 508 Chinese adult patients undergoing primary resection of low-grade gliomas: A clinicopathological study. *Neuro-Oncology* **14**, 230–241 (2012).

117. Preusser, M. *et al.* Prognostic value of Ki67 index in anaplastic oligodendroglial tumours - a translational study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Histopathology* **60**, 885–894 (2012).
118. Pouget, C. *et al.* Ki-67 and MCM6 labeling indices are correlated with overall survival in anaplastic oligodendroglioma, IDH1-mutant and 1p/19q-codeleted: a multicenter study from the French POLA network. *Brain Pathology* **30**, 465–478 (2020).
119. van Bodegraven, E. J., van Asperen, J. v., Robe, P. A. J. & Hol, E. M. Importance of GFAP isoform-specific analyses in astrocytoma. *GLIA* vol. 67 1417–1433 (2019).
120. Berendsen, S. *et al.* Adverse prognosis of glioblastoma contacting the subventricular zone: Biological correlates. *PLoS ONE* **14**, (2019).
121. Chen, D. Y., Chen, C. C., Crawford, J. R. & Wang, S. G. Tumor-related epilepsy: epidemiology, pathogenesis and management. *Journal of Neuro-Oncology* vol. 139 13–21 (2018).
122. *Linee guida NEOPLASIE CEREBRALI Edizione 2021 AIOM.*
123. Weller, M. *et al.* EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. *Nature Reviews Clinical Oncology* **18**, 170–186 (2021).
124. Mirian, C., Møller Pedersen, M., Sabers, A. & Mathiesen, T. Antiepileptic drugs as prophylaxis for de novo brain tumour-related epilepsy after craniotomy: A systematic review and meta-analysis of harm and benefits. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* **90**, 599–607 (2019).
125. Sirven, J. I., Wingerchuk, D. M., Dratzkowski, J. F., Lyons, M. K. & Zimmerman, R. S. Seizure prophylaxis in patients with brain tumors: A meta-analysis. *Mayo Clinic Proceedings* **79**, 1489–1494 (2004).
126. Mikkelsen, T. *et al.* The role of prophylactic anticonvulsants in the management of brain metastases: A systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *Journal of Neuro-Oncology* vol. 96 97–102 (2010).
127. Tremont-Lukats, I., Ratilal, B. O., Armstrong, T. & Gilbert, M. R. Antiepileptic drugs for preventing seizures in people with brain tumors. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2008) doi:10.1002/14651858.CD004424.pub2.
128. Pallud, J. & McKhann, G. M. Diffuse Low-Grade Glioma-Related Epilepsy. *Neurosurgery Clinics of North America* vol. 30 43–54 (2019).
129. van Breemen, M. S. M., Wilms, E. B. & Vecht, C. J. *Review Epilepsy in patients with brain tumours: epidemiology, mechanisms, and management.* <http://neurology.thelancet.com> (2007).

## **10. Ringraziamenti**

Vorrei ringraziare innanzitutto il mio relatore, il professor Dario Arnaldi, per la disponibilità e la gentilezza che ha avuto durante la stesura del lavoro e per avermi trasmesso l'entusiasmo e la dedizione che servono per fare ricerca, spero un giorno di poter fare altrettanto.

Ringrazio anche Andrea per avermi aiutato fin dall'inizio della raccolta dei dati e per avermi fatto appassionare ulteriormente al mondo della neurologia con i suoi insegnamenti.

Ringrazio poi tutta la mia famiglia, anche chi purtroppo non è più con me, per il sostegno costante e per essere i miei modelli di riferimento, anche se dico spesso, scherzando, che siete strani o pazzi, vi ammiro molto.

Un grazie va poi a miei amici, che mi hanno sopportato in questi sei anni, o più, come nel caso di Erica Olga, che mi è sempre rimasta vicina nonostante la distanza. In particolare, grazie a Benni Rischio, per avermi fatto da compagna di esplorazioni, consigliere, psicoanalista, parrucchiere e molte altre professioni, sei un mito. E poi, grazie anche agli altri componenti della gang, siete delle rocce!