



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

SCUOLA DI MEDICINA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA TRASLAZIONALE

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Medicina e Chirurgia

Tesi di Laurea

**VALUTAZIONE DELLO STATUS DI
METILAZIONE DEL PROMOTORE GENICO
DELLA O⁶ - METILGUANINA
METILTRANSFERASI (MGMT) QUALE
MARCATORE PROGNOSTICO PREDITTIVO IN
UNA CASISTICA DI GLIOBLASTOMI DEL
SISTEMA NERVOSO CENTRALE**

Relatore:

Chiar.mo Prof. Renzo Luciano BOLDORINI

Candidato:

Marco PETRICCIONE

Matricola 20022228



Firmato digitalmente da Renzo Luciano
Boldorini
Data: 01.03.2024 15:26:37 CET
Organizzazione: UNIVERSITA' DEGLI STUDI
DEL PIEMONTE ORIENTALE/01943490027

Anno Accademico 2022/2023

INDICE

1. Introduzione	3
1.1 Epidemiologia	3
1.2 Fattori di rischio	7
1.2.1 Fattori di rischio genetici.....	7
1.2.2 Radiazioni.....	7
1.3 Classificazione WHO	9
1.4 Presentazione clinica	13
1.4.1 Sintomi	13
1.4.2 Segni.....	14
1.5 Anatomia patologica	15
1.5.1 Aspetto macroscopico	15
1.5.2 Istopatologia	15
1.5.3 Patologia molecolare	17
1.5.3.1 IDH	17
1.5.3.2 MGMT	18
1.5.3.3 EGFR	20
1.6 Diagnosi	22
1.7 Trattamento	26
1.7.1 Approccio chirurgico.....	27
1.7.2 Approccio radioterapico	28
1.7.3 Approccio chemioterapico.....	29
1.7.4 Ulteriori approcci terapeutici.....	32
1.7.4.1 Wafer di carmustina.....	32
1.7.4.2 Bevacizumab.....	32
1.7.4.3 Tumor Treating Fields (TTF)	32
1.7.5 Prospettive future.....	34
1.7.6 Cure palliative	35
2. Obiettivo dello studio	36

3. Materiali e metodi	37
3.1 Materiali	37
3.1.1 Strumenti	37
3.1.2 Kit	37
3.1.3 Software.....	38
3.2 Metodi	38
3.2.1 Criteri di selezione dei pazienti	38
3.2.2 Allestimento dei materiali	39
3.2.3 Estrazione del DNA.....	40
3.2.4 Sequenziamento Sanger.....	40
3.2.5 Next Generation Sequencing (NGS)	41
3.2.6 Valutazione epigenetica del gene MGMT.....	41
4. Risultati	44
4.1 Curve di sopravvivenza	55
5. Discussione	62
6. Conclusioni	68
7. Bibliografia	69

1. Introduzione

I tumori del sistema nervoso centrale (SNC) sono costituiti da un gruppo eterogeneo per morfologia, sede di insorgenza, aspetti biologici, clinici e prognostici, che hanno origine dalle componenti cellulari specifiche di questo distretto anatomico.¹

1.1 Epidemiologia

I tumori primitivi del sistema nervoso centrale sono relativamente rari rispetto a tumori di altri siti, infatti rappresentano l'1,6% dei tumori diagnosticati a livello globale nel 2020, classificandosi al 21° posto per frequenza. Rappresentano però il 2,5% delle cause di nuovi decessi (13° posto), ma soprattutto, nello stesso periodo considerato, sono il 5° tumore per letalità dopo pancreas, esofago, fegato e polmone e il 3° per mortalità nella popolazione più giovane dopo leucemia e carcinoma mammario.²

L'incidenza media aggiustata per età di tutti i tumori cerebrali e del sistema nervoso centrale è di 24,83 per 100.000 abitanti, di cui 17,88 per 100.000 abitanti per i tumori non maligni e 6,94 per 100.000 abitanti per i tumori maligni.³

Ne risulta che i tumori non maligni (72,1%) sono più del doppio dei tumori maligni (27,9%) in termini di frequenza. (**Figura 1**)

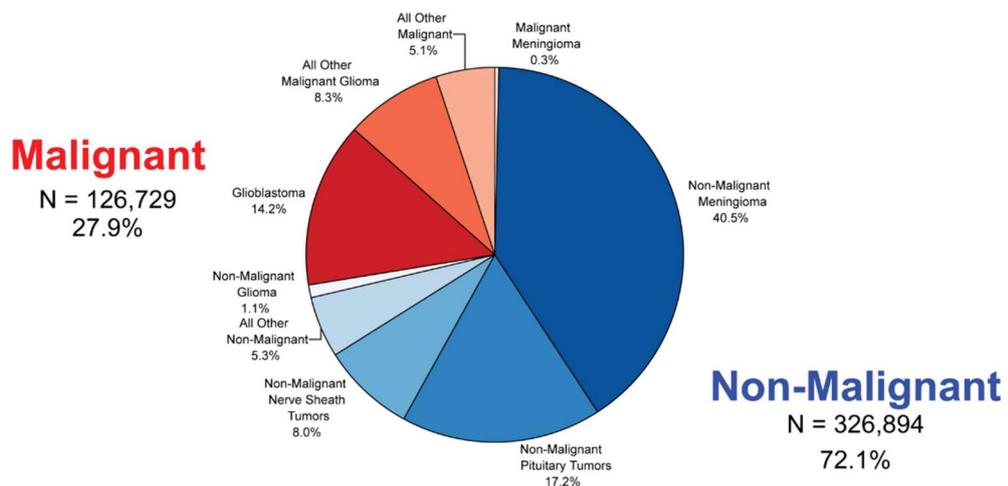


Figura 1. Incidenza media dei tumori cerebrali e del sistema nervoso centrale maligni e non maligni.³

La prevalenza dei pazienti con diagnosi di tumore primitivo al cervello o di altri tumori del sistema nervoso centrale, secondo il Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS) nel 2019, è di 1.323.121 pazienti, di cui 141.446 con una diagnosi di glioma, pari a circa l'11% del totale. ³

In Italia nel 2022, sono state stimate circa 6.300 nuove diagnosi di tumore del sistema nervoso centrale (uomini = 3.600; donne = 2.700).

Per quanto riguarda la prevalenza, sono 52.800 le persone viventi in Italia dopo una diagnosi di tumore del sistema nervoso centrale (uomini = 23.500; donne = 29.300). **(Figura 2)** ¹

SISTEMA NERVOSO CENTRALE	
Incidenza	Nel 2022, sono state stimate circa 6.300 nuove diagnosi (uomini = 3.600; donne = 2.700).
Mortalità	Nel 2022, sono stimati 4.800 decessi (uomini = 2.800; donne = 2.000).
Sopravvivenza netta a 5 anni dalla diagnosi	24% negli uomini e 27% nelle donne
Prevalenza	Sono 52.800 le persone viventi in Italia dopo una diagnosi di tumore del sistema nervoso centrale (uomini = 23.500; donne = 29.300)

Figura 2. Dati epidemiologici tumori del sistema nervoso centrale in Italia nel 2022. ¹

È presente una variabilità considerevole nelle diverse aree geografiche. Le regioni con un'alta incidenza sono prevalentemente situate in Europa. La più bassa incidenza è stata riscontrata nell'Africa Centrale. ⁴

Il livello di sviluppo umano (HDI) sembra correlato positivamente con l'incidenza del cancro al SNC, poiché le popolazioni con HDI molto elevato hanno un'incidenza di 5 volte maggiore rispetto alle popolazioni con HDI basso. ⁴

I due sessi sono interessati da una incidenza leggermente diversa con gli uomini che presentano un tasso di incidenza circa il 30% più alto rispetto alle donne. ⁴

I gliomi rappresentano il 26,3% di tutti i tumori primitivi del sistema nervoso centrale e i glioblastomi sono il 60,2% di essi, rendendoli la patologia tumorale cerebrale maligna più comune, con un'incidenza di 3,27 su una popolazione di 100,000 individui. **(Figura 3)**³ Il picco di incidenza è nei pazienti tra i 55 e gli 85 anni.⁵

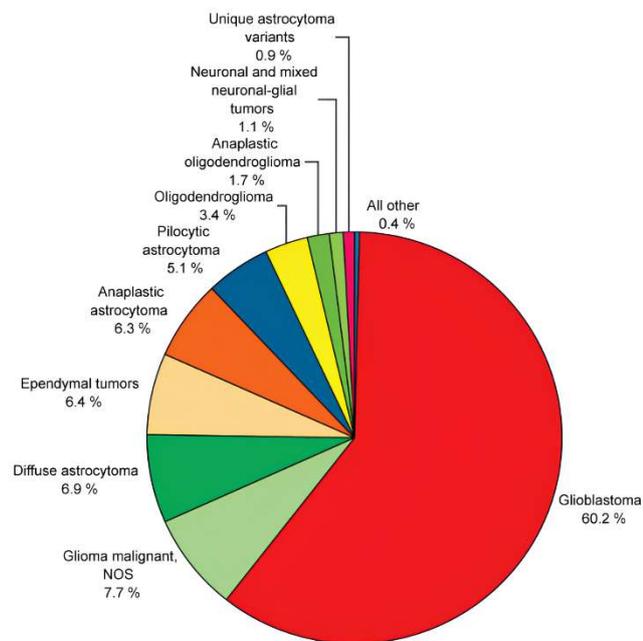


Figura 3. Distribuzione dei tumori gliali.³

L'incidenza, essendo al di sotto della soglia fissata dal progetto di sorveglianza dei tumori rari RARE-CARE, (6 casi per 100.000 abitanti/anno), fa sì che i glioblastomi siano classificati come tumori rari.⁶

La sopravvivenza globale dei tumori maligni del SNC, si assesta a 60,4% a 1 anno, 35,7% a 5 anni e 30,6% a 10 anni, con minime differenze tra il sesso femminile e maschile, con il primo ad avere prognosi migliore.

Tuttavia, è presente una grande variabilità in funzione dell'istologia; la sopravvivenza a 5 anni passa infatti dal 94,6% degli astrocitomi pilocitici al 6,7% dei glioblastomi.

In linea generale, la mortalità aumenta con l'avanzare dell'età alla diagnosi, bambini e giovani adulti presentano una prognosi migliore per la maggior parte degli istotipi.³

La mediana della sopravvivenza globale, ovvero l'overall survival (OS), varia tra 12 e 18 mesi.⁷

Il glioblastoma nella maggior parte dei pazienti tende a recidivare ed è caratterizzato da una prognosi peggiore con una sopravvivenza libera da progressione della malattia (PFS) di 1,5 - 6 mesi e una sopravvivenza globale (OS) di 2-9 mesi.⁸

1.2 Fattori di rischio

Identificare i fattori di rischio per lo sviluppo dei gliomi potrebbe dimostrarsi estremamente vantaggioso per la diagnosi precoce e per implementare efficaci misure di prevenzione. Tuttavia, finora, i dati in merito appaiono controversi, con solo pochi fattori di rischio accettati e confermati.⁹

1.2.1 Fattori di rischio genetici

La maggior parte dei gliomi si sviluppa senza una storia familiare, una modesta percentuale (5%) può essere classificata come familiare, con una percentuale ancora più ridotta (1-2%) che segue uno schema mendeliano o fa parte di sindromi ereditarie.

Sindromi come la Li-Fraumeni, la Turcot e la neurofibromatosi di tipo 1 sono ormai note per essere associate ad un rischio aumentato di sviluppare un glioma.

Numerosi studi hanno esplorato la presenza di varianti genomiche legate a un aumento del rischio di sviluppare tumori cerebrali, soprattutto gliomi. Attualmente sono note 25 varianti genomiche di suscettibilità per i gliomi negli adulti, tra cui diversi polimorfismi di singoli nucleotidi come TERT (5p11.33), EGFR (8Q25.21) e CDKN2A/CDKN2B (9P21.3), ma circa il 70% del rischio genetico rimanente è ancora sconosciuto.^{10,11}

1.2.2 Radiazioni

L'esposizione moderata o elevata alle radiazioni ionizzanti rappresenta finora l'unico fattore di rischio ambientale accertato correlato all'insorgenza di gliomi. Tuttavia, questa associazione è riscontrabile solo in una percentuale ridotta di pazienti.¹²

Tutti gli studi concordano sul fatto che il rischio di sviluppare un tumore cerebrale aumenta con la quantità di radiazione somministrata e con la minore età del paziente sottoposto a radioterapia.¹⁰

Per quanto riguarda l'esposizione alle radiazioni non ionizzanti, la correlazione tra lo sviluppo dei tumori cerebrali e l'esposizione derivante dall'uso dei telefoni cellulari non è ancora stata confermata in modo definitivo a causa di studi contrastanti e di differenze nelle selezioni e nei criteri metodologici.

L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC/OMS) ha classificato i campi elettromagnetici a radiofrequenza (RF-EMF) come "possibilmente cancerogeni" (2B), ovvero agenti per i quali vi è una limitata prova di cancerogenicità negli esseri umani e un'insufficiente prova di cancerogenicità in animali di laboratorio.¹³

1.3 Classificazione WHO

I gliomi diffusi sono i tumori cerebrali primitivi più comuni, con un decorso clinico che, per la maggior parte dei casi, rimane inevitabilmente fatale.

La classificazione WHO del 2016 dei tumori del sistema nervoso centrale ha integrato, per la prima volta, le caratteristiche istopatologiche con quelle molecolari, segnando un importante cambio di paradigma nella classificazione dei gliomi.¹⁴

La classificazione WHO del 2021 incorpora ulteriori conoscenze provenienti da studi genomici, apportando diverse modifiche ai principi diagnostici e alla nomenclatura dei gliomi diffusi, con importanti implicazioni per la pratica clinica.⁵

Gli algoritmi classificativi sono schematizzati in **Figura 4** e in **Figura 5**.

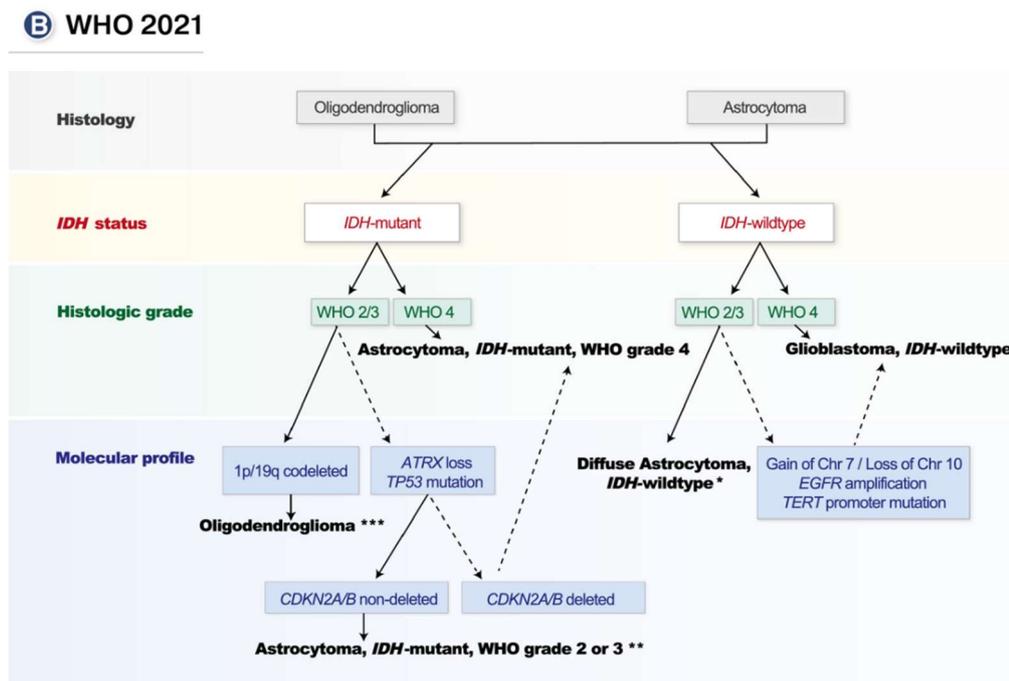


Figura 4. Algoritmo classificativo WHO 2021.¹⁵

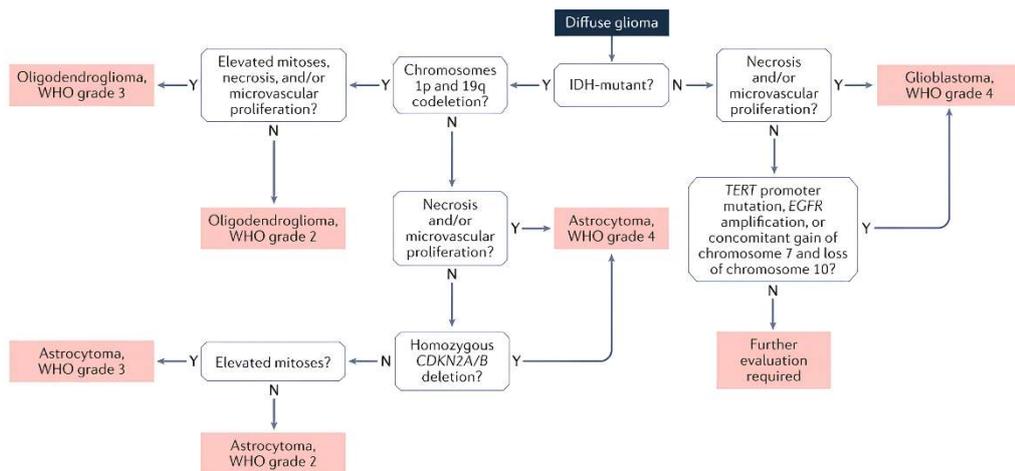


Figura 5. Algoritmo classificativo (WHO 2021) che integra criteri istologici e molecolari. Y: Sì; N: No.¹⁶

Cambiamenti clinicamente significativi includono l'aggiunta di criteri molecolari per la diagnosi di glioblastoma IDH-wildtype, o astrocitomi IDH-mutati di grado IV anche in assenza di elementi istopatologici caratterizzanti le lesioni di alto grado come la necrosi o la proliferazione microvascolare.¹⁷

La nuova classificazione WHO del 2021 è più intuitiva e chiarisce la distinzione tra astrocitomi di basso grado e il glioblastoma.

È più chiara poiché l'assenza della mutazione del gene IDH (IDH-wildtype) permette di escludere un astrocitoma di basso grado e orientare la diagnosi verso un tumore di alto grado della serie gliale.¹⁸

I gliomi diffusi, secondo la classificazione WHO del 2021, sono schematizzati nella **Tabella 1**.

Tabella 1. Estratto della classificazione WHO 2021 dei tumori del sistema nervoso centrale relativo ai gliomi diffusi. ¹⁹

Diffuse Gliomas (CNS tumors WHO classification, 5th edition, 2021)

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 tumour of the young
 - Diffuse low-grade glioma, MAPK pathway-altered
-

Pediatric-type diffuse high-grade gliomas

- Diffuse midline glioma, H3K27-altered
 - Diffuse hemispheric glioma, H3 G34-mutant
 - Diffuse pediatric-type high-grade glioma, H3-wildtype and IDH-wildtype
 - Infant-type hemispheric glioma
-

Le sottocategorie aggiornate dei gliomi diffusi dell'adulto sono le seguenti: ⁵

- Astrocitoma, IDH-mutato;
- Oligodendroglioma, IDH mutato e 1p/19q codeleto;
- Glioblastoma, IDH-wildtype.

La diagnosi di astrocitoma, IDH-mutato di grado II si basa sulla presenza di una neoplasia gliale della serie astrocitaria infiltrante che, a livello istopatologico, si presenta ben differenziata, con una attività mitotica limitata o assente, senza proliferazione microvascolare o necrosi. ²⁰

La diagnosi di astrocitoma, IDH-mutato di grado III si basa sulla presenza di una neoplasia gliale della serie astrocitaria infiltrante che, a livello istopatologico è scarsamente differenziata, con un'attività mitotica elevata, senza proliferazione microvascolare o necrosi. ²⁰

L'astrocitoma, IDH-mutato è classificato direttamente di grado IV quando ha una delle seguenti caratteristiche:

- A livello istopatologico, la presenza di proliferazione microvascolare o necrosi;
- A livello molecolare, la delezione del gene CDKN2A/B in omozigosi codificante per gli oncosoppressori p16 e p14ARF. ²⁰

La diagnosi di oligodendroglioma si basa sulla presenza di una neoplasia gliale IDH-mutata e con una codelezione 1p/19q, il grading varia a seconda della presenza o meno di atipie cellulari o nucleari e numero di mitosi, come per gli astrocitomi IDH-mutati di grado II-III. ²⁰

La diagnosi di glioblastoma IDH-wildtype, si basa sulla presenza di una neoplasia gliale astrocitaria con IDH-wildtype e almeno una delle seguenti caratteristiche:

- A livello istopatologico, la presenza di proliferazione microvascolare o necrosi;
- A livello molecolare, la mutazione del promotore del gene TERT, amplificazione del gene EGFR o contemporaneo guadagno di un cromosoma 7 aggiuntivo e delezione completa del cromosoma 10. ²⁰

Se un glioma è IDH-wildtype e non presenta né elementi istologici né molecolari caratteristici di un glioblastoma, è necessario considerare altri tipi di tumori (ad esempio, gliomi pediatrici diffusi, gliomi circoscritti, tumori glioneurali, ependimomi). È necessario inoltre condurre ulteriori valutazioni molecolari per una corretta classificazione. ¹⁶

1.4 Presentazione clinica

La presentazione clinica nei pazienti affetti da glioblastoma è eterogenea, in quanto è differente sulla base della localizzazione della massa tumorale e dalla sua invasività locale, ma anche dell'effetto di compressione che la neoplasia esercita sulle strutture adiacenti. ²¹

1.4.1 Sintomi

I seguenti sono i principali sintomi riferiti dal paziente o dai familiari:

- Cefalea, presente in meno del 30% dei casi, è descritta come un dolore gravativo, tensivo, più intensa di notte o al risveglio a causa dell'ipoventilazione notturna, spesso associata a nausea, vomito e aggravata da tosse e sforzi fisici; ²¹
- Crisi epilettica, prevalentemente focale, spesso (24-68%) è la prima manifestazione della malattia e nel 19-38% dei pazienti si verificherà durante il decorso clinico. Come sintomo iniziale, l'epilessia è associata a una maggior sopravvivenza, probabilmente a causa dell'associazione tipica con minor un'età dei pazienti interessati, nonché con una posizione più corticale e una dimensione tumorale minore favorendo così una migliore resezione chirurgica; ²¹
- Alterazioni dello stato di coscienza e della vigilanza, come apatia, sopore, confusione e depressione; a volte sottovalutati perché scambiati per fisiologiche manifestazioni dell'invecchiamento o sintomi di patologie neurodegenerative concomitanti, portano ad un ritardo della diagnosi con un peggioramento della prognosi; ²¹
- Sintomi da aumento della pressione intracranica, come nausea ed emesi; si verificano a causa dell'effetto compressivo del tumore sulle strutture circostanti, per lo sviluppo di edema cerebrale o per ostacolo alla circolazione. ²¹

1.4.2 Segni

I segni raccolti in un esame obiettivo sono tipicamente deficit di una o più funzioni neurologiche, possono avere una graduale progressione e sono anch'essi variabili in rapporto alla sede coinvolta:

- Lobo frontale: è la sede più interessata dall'insorgenza di glioblastomi (25,8%), i segni clinici più rappresentativi sono aprassia, emiparesi o disfasia in caso di coinvolgimento dell'emisfero dominante;²¹
- Lobo temporale (19,7%): i segni clinici più rappresentativi sono allucinazioni uditive e olfattorie, déjà vu, alterazioni mnesiche e quadrantopsia superiore controlaterale durante l'esame del campo visivo;²¹
- Lobo parietale (12,2%): i segni clinici più rappresentativi sono deficit motori o sensitivi controlaterali, emianopsia omonima, agnosia e aprassia;²¹
- Lobo occipitale (3,2%): i segni clinici più rappresentativi sono deficit controlaterali del campo visivo e alessia;²¹
- Cervelletto (2,9%): i segni clinici più rappresentativi sono atassia, dismetria, tremore intenzionale, nistagmo e vertigini.²¹

1.5 Anatomia patologica

1.5.1 Aspetto macroscopico

I glioblastomi sono spesso di grandi dimensioni alla presentazione e possono occupare gran parte di un lobo.

Solitamente sono unilaterali, ma possono attraversare il corpo calloso ed essere bilaterali (lesione a farfalla).¹⁹

La maggior parte dei glioblastomi emisferici è intraparenchimale ed è localizzata nella sostanza bianca. Raramente, i glioblastomi sono superficiali a contatto con le meningi, talvolta simulando una metastasi o un meningioma.¹⁹

I glioblastomi sono poco definiti; la superficie di taglio è di colore variabile, con masse periferiche dal grigiastro al rosa e aree centrali di necrosi giallastra. In alcune aree, il tessuto necrotico può anche confinare con le strutture cerebrali adiacenti, senza una zona intermedia di tumore macroscopicamente rilevabile.¹⁹

La necrosi centrale può occupare fino all'80% del tumore totale. I glioblastomi sono spesso punteggiati da focolai di emorragia recente e remota.¹⁹

1.5.2 Istopatologia

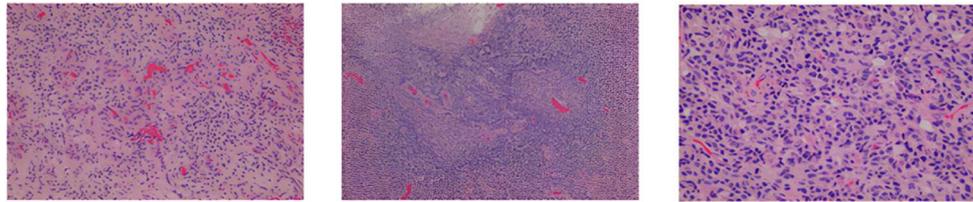
Il glioblastoma IDH-wildtype è un glioma altamente cellulato e infiltrante che origina da cellule tumorali astrocitarie scarsamente differenziate, che presentano atipie nucleari, un marcato pleomorfismo ed una intensa attività mitotica.

La proliferazione microvascolare e la necrosi, con o senza palizzata perinecrotica, sono caratteristiche diagnostiche distintive.

Nei campioni provenienti da pazienti trattati, la necrosi indotta dalla terapia, in particolare la radionecrosi, deve essere distinta dalla necrosi tumorale innata.¹⁹

Come suggerisce il termine obsoleto "glioblastoma multiforme", l'istopatologia di questo tumore è altamente variabile, il che rende, a volte, difficile la diagnosi istopatologica sui campioni ottenuti mediante agobiopsia stereotassica.¹⁹

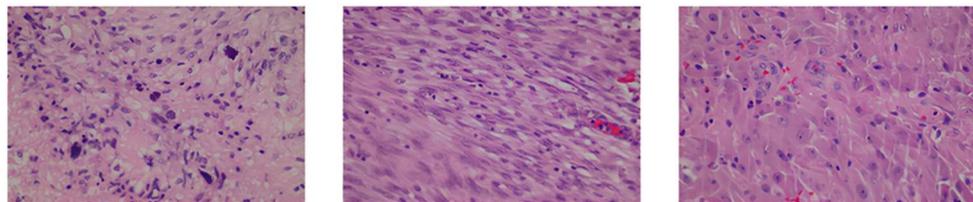
Le caratteristiche istopatologiche tipiche dei glioblastomi sono rappresentate nella **Figura 6**.



*Figura 6. Caratteristiche istopatologiche tipiche del glioblastoma;²²
(A) Proliferazione microvascolare; (B) Necrosi a palizzata; (C) Pleomorfismo cellulare.*

A livello morfologico, secondo la classificazione WHO del 2021, il glioblastoma IDH-wildtype può avere tre sottotipi istologici: (**Figura 7**)⁵

- Glioblastoma a cellule giganti;
- Gliosarcoma;
- Glioblastoma epitelioide.



*Figura 7. Sottotipi istologici del glioblastoma IDH-Wildtype;²²
(A) Glioblastoma a cellule giganti; (B) Gliosarcoma; (C) Glioblastoma epitelioide.*

1.5.3 Patologia molecolare

Gli studi molecolari sui glioblastomi hanno reso possibile nel corso degli anni una più elevata accuratezza e uniformità diagnostica, nonché hanno fornito marcatori per valutare la prognosi oncologica e il valore predittivo di alcune terapie, sia convenzionali che target.

1.5.3.1 IDH

L'isocitrato deidrogenasi I (IDH1) e l'isocitrato deidrogenasi II (IDH2) sono due isoforme di un enzima che converte l'isocitrato in α -ketoglutarato, con conseguente riduzione del NADP a NADPH.

Nei glioblastomi sono state riscontrate mutazioni puntiformi che coinvolgono sia l'isoforma citosolica codificata dal gene IDH1, che l'isoforma mitocondriale, codificata dal gene IDH2.²³

Le mutazioni, mutualmente esclusive, tipiche dei geni che codificano per questi enzimi, sono le seguenti:

- Per IDH1 si verifica la sostituzione di un residuo di arginina nel codone 132 con un'istidina (R132), una cisteina (R132C) o una lisina (R132K);
- Per IDH2 si verificano mutazioni nei codoni R140 e R172.

Le mutazioni di IDH1 e IDH2 portano alla perdita della normale attività catalitica della decarbossilazione ossidativa dell'isocitrato in α -ketoglutarato e NADPH.

Tutti i pazienti con IDH1 o IDH2 mutato hanno mostrato una maggiore sopravvivenza rispetto ai pazienti con IDH-wildtype, probabilmente a causa della sensibilizzazione delle cellule di glioma alla chemioterapia o alla radioterapia generata dalla riduzione dei pool intracellulari di NADPH.²⁴⁻²⁶

Pertanto, la presenza delle mutazioni IDH1 e IDH2 può essere considerata come il principale fattore prognostico favorevole per la sopravvivenza nei gliomi.²⁵

La mutazione di IDH1 R132H è quella più frequentemente riscontrata nella pratica clinica attraverso una valutazione immunohistochimica con un anticorpo specifico per questa mutazione. ²⁷

1.5.3.2 MGMT

Il gene della O⁶ - metilguanina metiltransferasi (MGMT) è localizzato sul cromosoma 10q26.3. È composto da cinque esoni, di cui il primo e il promotore sono associati ad un'isola CpG di 762 paia di basi che include 98 dinucleotidi CpG. ²⁸

Nel caso di una modificazione epigenetica, come la metilazione delle isole CpG e quindi del promotore del gene MGMT, si verifica una eterocromatizzazione dei cromosomi e un mascheramento dei siti trascrizionali, rendendo così impossibile la trascrizione e portando ad un silenziamento genico. ²⁹

Le alterazioni epigenetiche, come la metilazione delle isole CpG, sono sempre state considerate eventi precoci e frequenti in diversi tipi di tumori, svolgendo un ruolo fondamentale nella tumorigenesi e nella progressione tumorale. ²⁹

Se correttamente trascritta, MGMT, attraverso un meccanismo “suicida”, catalizza la reazione di rimozione degli addotti metilici, in posizione O⁶ della guanina, causati da agenti alchilanti a livello del DNA, trasferendo il gruppo metilico dall'O⁶ - metilguanina alla stessa proteina MGMT, mantenendo così la stabilità genomica e difendendo la cellula di insulti mutazionali. (**Figura 8**) ³⁰

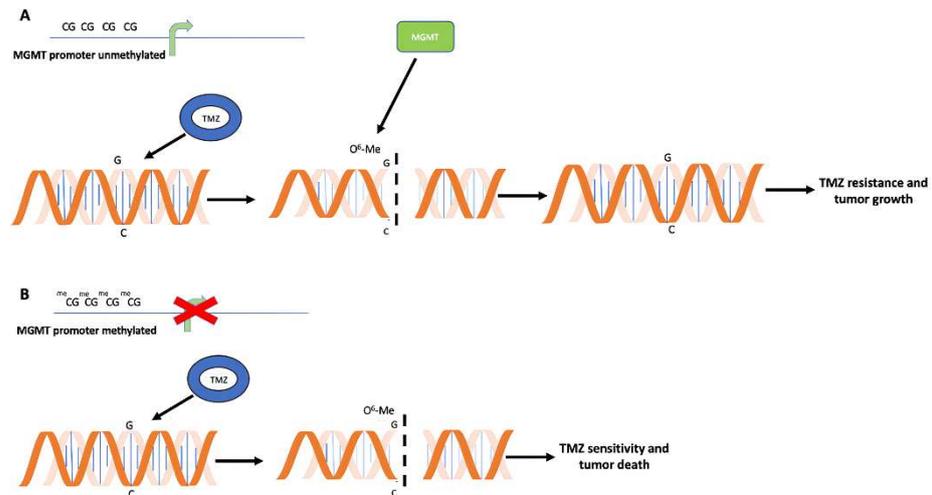


Figura 8. Meccanismo di riparazione del DNA da parte di MGMT nella cellula tumorale. A) MGMT non metilato; B) MGMT non metilato. ³⁰

Questo meccanismo di riparazione del DNA però assume un significato completamente opposto se mantenuto dalla cellula tumorale: infatti, la corretta funzionalità della metiltransferasi, rende resistenti le cellule neoplastiche ai farmaci alchilanti utilizzati nella chemioterapia come il più usato temozolomide o la meno proposta fotemustina. ³¹

Il meccanismo d'azione di questi chemioterapici alchilanti comporta la metilazione del DNA e l'induzione di un conseguente danno cellulare; se però, attraverso i suoi meccanismi riparatori, la cellula è in grado di demetilare il DNA, il farmaco non sarà efficace e il tumore viene detto resistente. ²⁸

Al contrario però, lo status di metilazione del promotore del gene MGMT determina una loss of function dell'enzima metiltransferasi e sensibilizza le cellule tumorali al danno del chemioterapico alchilante, permettendo a temozolomide di indurre citotossicità e apoptosi delle cellule neoplastiche. ^{28,31}

Lo status di metilazione del promotore di MGMT è presente nel 50% dei glioblastomi, ed è emerso come uno dei potenziali principali determinanti della prognosi e un predittore della risposta a temozolomide nei pazienti con glioblastoma primitivo, ma diversi studi hanno dimostrato che è anche prognostica per il glioblastoma ricorrente, con una sopravvivenza maggiore di circa 3-4 mesi. ⁸

Tuttavia, il suo status non è completamente dirimente nella scelta delle opzioni terapeutiche per via delle limitate possibilità. Inoltre, sono presenti talvolta delle discrepanze tra lo status di metilazione del promotore di MGMT, la sua espressione proteica e l'outcome del paziente.³²

Ciò suggerisce la necessità di valutare ulteriori parametri in combinazione allo status di metilazione di MGMT per migliorare la previsione dell'outcome del paziente.³²

1.5.3.3 EGFR

Il gene che codifica per il recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR), noto anche come HER1 o ErbB1, è localizzato sul braccio corto del cromosoma 7.

È un recettore trans-membrana appartenente alla famiglia dei recettori tirosin-chinasici che svolge un ruolo significativo nella regolazione della mitosi, della differenziazione, della sopravvivenza cellulare e dell'apoptosi.

Nel glioblastoma, l'amplificazione del gene EGFR è la mutazione più frequente, poiché è presente in circa il 40% dei glioblastomi primari.³³

Tuttavia, l'amplificazione è spesso associata alla presenza della variante di EGFR mutata, nota come EGFRvIII, che è caratterizzata da una delezione in-frame di 267 aminoacidi degli esoni 2-7 nel dominio extracellulare di EGFR, che si traduce in un recettore costitutivamente attivo, capace di trasmettere segnali di crescita anche senza il legame con il suo ligando.³³

L'amplificazione di EGFR e la presenza della variante mutata EGFRvIII, quindi, favoriscono la natura aggressiva del glioblastoma promuovendo l'invasività locale e l'angiogenesi microvascolare.

Quindi, la presenza di alterazioni a carico di EGFR è un fattore prognostico sfavorevole, ma mutazioni specifiche possono avere un valore predittivo positivo, in quanto attualmente sono oggetto di ricerca e di studio anticorpi monoclonali mirati.^{34,35}

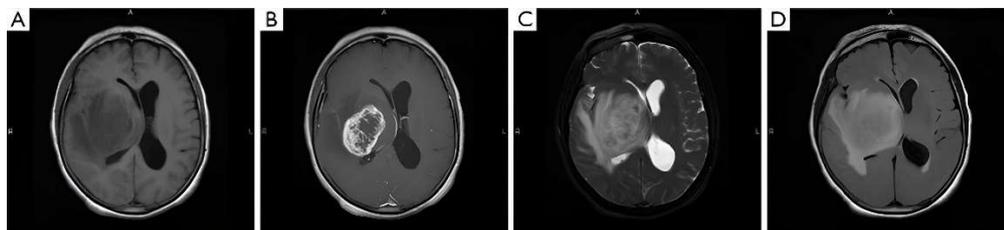
1.6 Diagnosi

Le crisi epilettiche di recente insorgenza, la manifestazione di un nuovo deficit neurologico o una cefalea non responsiva a terapia medica sono solitamente indagate con un esame radiologico di primo livello come una tomografia computerizzata (TC).²¹

Con l'introduzione di un mezzo di contrasto, il glioblastoma appare come una lesione con un core ipodenso e un anello periferico eterogeneo iperdenso.

Mentre la TC può fornire le prime informazioni circa la presenza di una lesione cerebrale espansiva, il gold standard (GS) è la risonanza magnetica (RM) con mezzo di contrasto (MDC).

Nella RM (**Figura 9**) i glioblastomi appaiono come masse con un enhancement lungo i margini per rottura della barriera emato-encefalica, presentano ipointensità centrale legato alla necrosi e iperintensità perifocale irregolare nelle sequenze T2. È possibile valutare inoltre la presenza dell'edema perilesionale e di eventuali micro-emorragie intratumorali.²¹



*Figura 9. RM encefalo. (A) Immagine assiale senza mdc; (B) Immagine assiale con mdc che mostra una lesione basale destra captante contrasto in modo eterogeneo, con un core centrale necrotico ipointenso; (C) Immagine T2 che mostra, insieme all'immagine (D) FLAIR, l'edema perilesionale.*³⁶

La risonanza magnetica con imaging a diffusione (RM-DWI) viene utilizzata per distinguere i glioblastomi, dai gliomi a basso grado; nei tumori ad alto grado, la diffusione è generalmente ridotta a causa dell'aumentata cellularità, mentre nei tumori gliali a basso grado si osserva un aumento del coefficiente di diffusione. Questa differenziazione è fondamentale per una valutazione più precisa della natura e della gravità della neoplasia.³⁶

La spettroscopia RM (MRS) (**Figura 10**) è una modalità in grado di fornire informazioni metaboliche in vivo del tessuto cerebrale in esame registrando segnali in funzione della specificità molecolare. Il grafico che si ottiene (spettro) è funzione della presenza e della distribuzione quantitativa di metaboliti idrogenati d'interesse quali l'N-acetilaspargato (NAA), un marker neuro-assonale, elevato nel tessuto sano e della colina, marker di turnover cellulare, elevato nei tessuti tumorali.

La MRS è pertanto utile nel monitoraggio della crescita neoplastica e della risposta alla chemioterapia e radioterapia, ma anche per un riscontro precoce delle recidive, oppure per la diagnosi differenziale fra recidiva o progressione di malattia tumorale e radionecrosi.³⁷

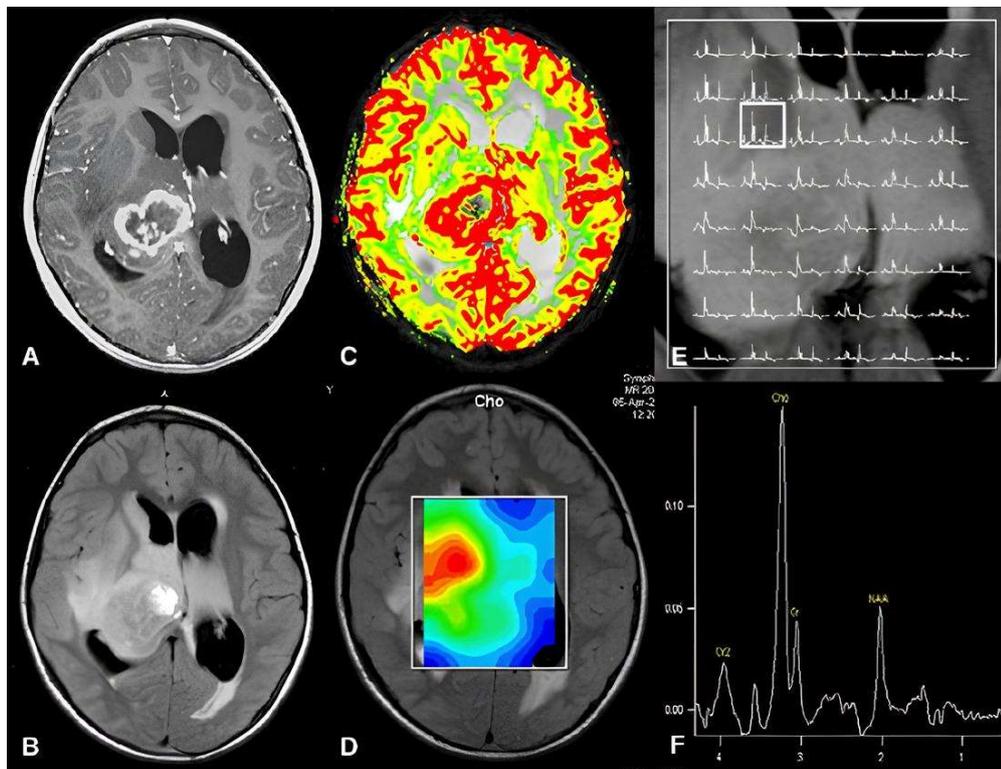
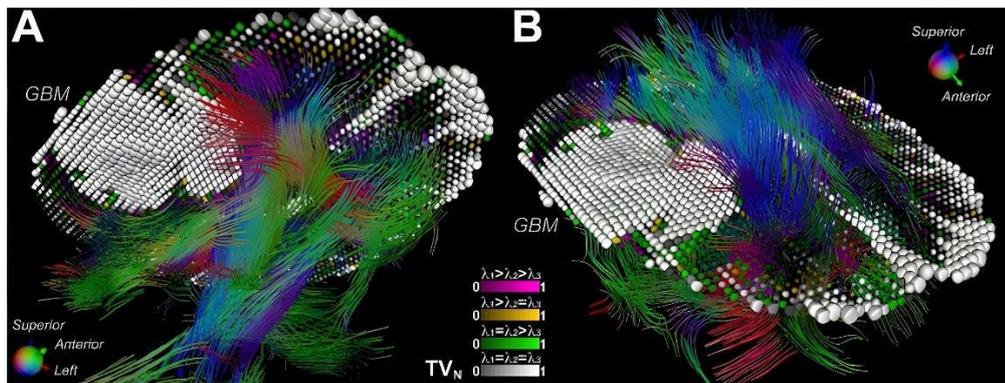


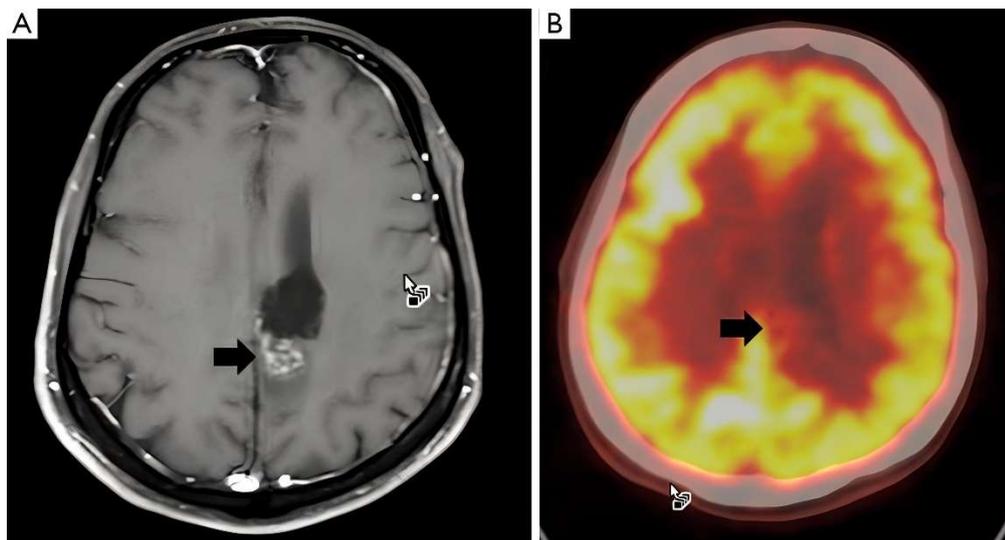
Figura 10. (A) Immagine assiale T1-pesata con MDC (gadolinio), mostra una lesione in regione talamica destra, con una presa di contrasto centrale eterogenea, presa di contrasto periferica, con un'area necrotica/cistica centrale; (B) Immagine assiale FLAIR in T2, circondata da edema perilesionale. La paziente presenta inoltre idrocefalo ed edema periventricolare; (C) Gradient-echo axial DSC MRI, con rCBV color overlay map, mostra un elevato rCBV di 3.70 compatibile con glioma ad alto grado; (D) Cho color overlay metabolite map: mostra una regione con un incremento di Cho; (E) Spectral map: mostra regioni con anomalie di segnale a carico dell'area infiltrata dal tumore; (F) Spettroscopia (TE=144 ms) della regione peritumorale: mostra un aumento dei livelli di Cho, rispetto a Cr e NAA, indicando la presenza di infiltrazione tumorale.³⁸

La risonanza magnetica con tensore di diffusione (**Figura 11**) permette, attraverso la trattografia, di delineare i volumi tumorali e riconoscere, con maggiore precisione, le connessioni neuronali. Ciò ricopre un importante ruolo in prospettiva di un intervento chirurgico poiché permette di eseguire una resezione tumorale macroscopicamente radicale e preservare il tessuto sano.³⁹



*Figura 11. L'immagine mostra l'effetto massa esercitato da un GBM, ricostruita attraverso la trattografia: la diffusione attraverso la sostanza bianca è alterata e la traiettoria della stessa viene modificata a causa della crescita tumorale.*⁴⁰

Un ulteriore strumento di approfondimento radiologico preoperatorio è la PET con il fluorodesossiglucosio (^{18}F -FDG) (**Figura 12**). Infatti, è stata dimostrata un'associazione lineare, tra il livello di captazione del radiofarmaco e il successivo grading istopatologico del glioma.³⁹



*Figura 12. A) RM con mezzo di contrasto, mostra una lesione captante contrasto a livello profondo della linea mediana, a sinistra rispetto all'area motoria; B) La stessa immagine, ma in PET, mostra un aumento del metabolismo, evidenziato attraverso un incremento della captazione del FDG.*³⁹

Complessivamente, le varie tecniche radiologiche hanno affinato la diagnostica radiologica consentendo una discriminazione più affidabile del glioblastoma rispetto ad altre lesioni con enhancement del contrasto, compresi ascessi, linfomi primari del sistema nervoso centrale e metastasi.⁴¹

Tuttavia, l'imaging del glioblastoma può variare considerevolmente, quindi la diagnosi istopatologica e molecolare basata sul tessuto è indispensabile.⁴²

1.7 Trattamento

Nonostante la prognosi inevitabilmente fatale del glioblastoma, qualsiasi delle opzioni di trattamento standard, può mantenere stabile o addirittura migliorare la qualità di vita e le funzioni cognitive, anche nella popolazione anziana particolarmente compromessa.⁴³

I protocolli terapeutici, schematizzati in **Figura 13** e in **Figura 14** e in **Figura 17**, per i pazienti con diagnosi di glioblastoma, considerano strategie terapeutiche integrate che devono essere personalizzate in base alle condizioni di ciascun paziente, tenendo conto della loro età, del loro performance status, degli esami di imaging, della velocità di progressione della malattia e della diagnosi clinica, istopatologica e molecolare.⁴⁴

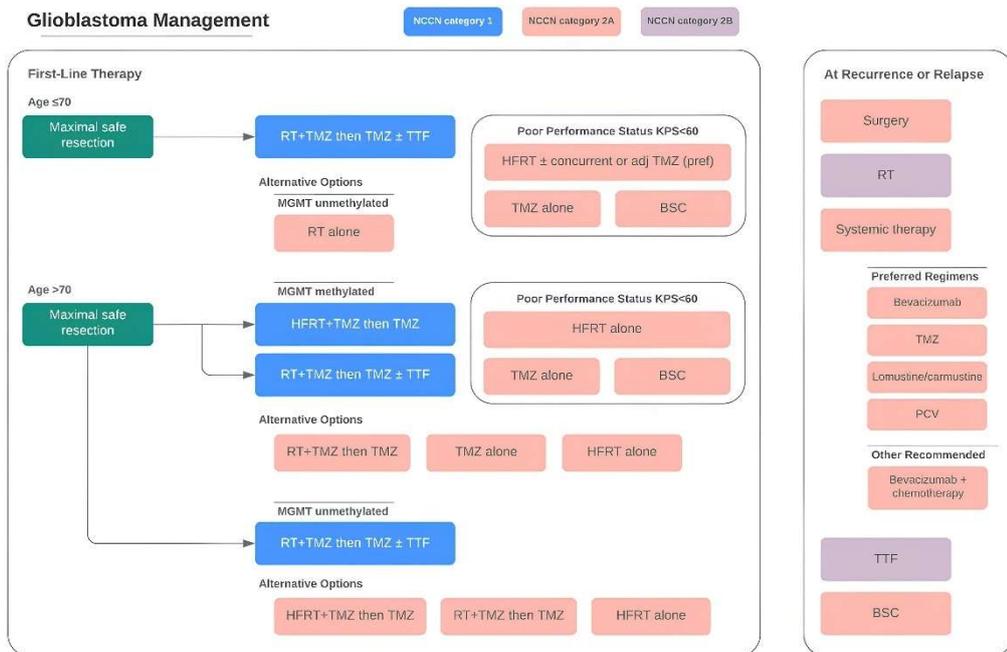


Figura 13. Algoritmo completo del trattamento del glioblastoma.

Adj: adiuvante; ±: con o senza; BSC: best supportive care; HFRT: radioterapia frazionata; KPS: performance status (Karnofsky); NCCN: National Comprehensive Cancer Network; pref: opzione preferita; PCV: regime basato su procarbazine, lomustina, e vincristina; RT: radioterapia; TMZ: temozolomide; TTF: tumor-treating fields.²²

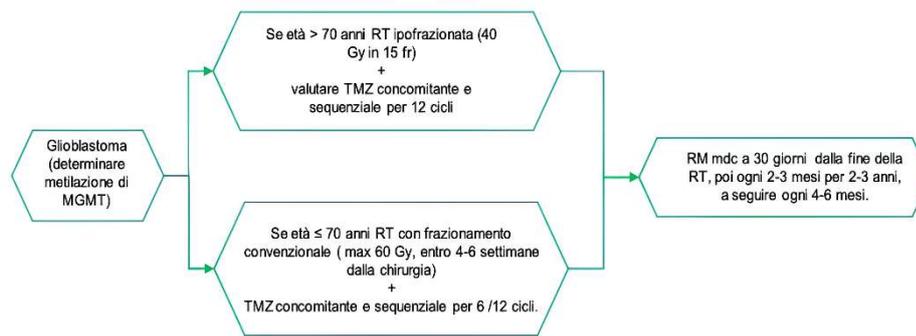


Figura 14. Algoritmo terapeutico semplificato per il trattamento del glioblastoma, secondo le linee guida AIOM 2021.³⁷

RT: radioterapia; TMZ: temozolomide.

1.7.1 Approccio chirurgico

L'approccio chirurgico si basa sulla massima resezione possibile.⁴⁵

La resezione radicale del tumore è associata ad un maggior sopravvivenza rispetto alla resezione parziale o alla biopsia.

Esistono numerosi ausili chirurgici preoperatori e intraoperatori che possono essere utilizzati per agevolare resezioni sicure e ridurre al minimo la morbidità chirurgica.

Questi includono studi di imaging preoperatori come il tracciamento delle fibre attraverso la risonanza magnetica con tensore di diffusione o la risonanza magnetica funzionale.

Sussistono inoltre modalità operatorie come l'awake surgery e ausili intraoperatori come il monitoraggio mediante fluorescenza del tessuto tumorale con acido 5-aminolevulinico, soprattutto quando i tumori sono situati vicino o coinvolgono direttamente regioni cerebrali eloquenti.⁴⁶⁻⁴⁹

In seguito all'intervento, entro 48 ore, dovrebbe essere eseguita una risonanza magnetica con contrasto, che consente la determinazione della radicalità della resezione, oltre a rappresentare un check-point fondamentale per le successive scelte terapeutiche.

Per situazioni in cui l'intervento chirurgico non è possibile, come nel caso di controindicazioni mediche, sedi tumorali di difficile accesso o rifiuto del paziente, la biopsia stereotassica o la biopsia open sono anch'esse opzioni perseguibili. (Figura 15)

Ciò rimane importante non solo per la diagnosi istologica, ma anche per ulteriori analisi molecolari.⁵⁰

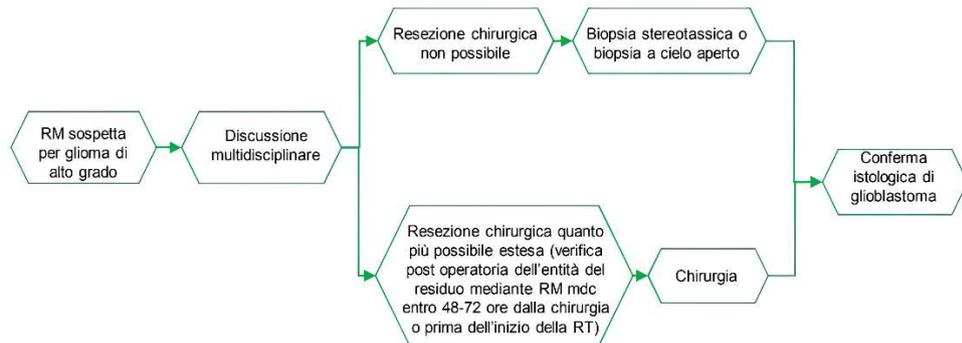


Figura 15. Algoritmo valutazione chirurgia vs biopsia.³⁷

Nel contesto di una recidiva, il reintervento, se fattibile, dovrebbe essere sempre considerato, soprattutto se sono trascorsi più di 6 mesi dal primo intervento e nei pazienti più giovani con buon performance status.⁵¹

1.7.2 Approccio radioterapico

La radioterapia è da diversi anni utilizzata nel trattamento del glioblastoma, sia per migliorare il controllo locale della malattia, sia per aumentare la sopravvivenza del paziente.

Attualmente, nella pratica clinica, la radioterapia viene somministrata convenzionalmente dopo l'intervento chirurgico con un'irradiazione di 60 Gy in frazioni da 2 Gy in 6 settimane, nella maggioranza dei casi, in combinazione, con il temozolomide.⁵²

Il volume target è costituito dal nodulo di enhancement visualizzato alla RM preoperatoria nelle sequenze T2 pesate, più un margine adeguato, generalmente 2-3 cm, in considerazione della natura infiltrativa dei glioblastomi.

La presenza di lesioni multiple bilaterali richiede invece l'estensione del campo all'intero encefalo, ma a dosaggio ridotto (45-50 Gy).^{37,53}

L'impiego di tecniche radioterapiche particolari, quali la radiochirurgia o la radioterapia stereotassica frazionata, nonché di radio sensibilizzanti, radioterapia metabolica e radio-immunoterapia non hanno ad oggi prodotto vantaggi clinici rispetto al trattamento standard.³⁷

Nei pazienti con una età >70 anni è possibile valutare la somministrazione di radioterapia ipofrazionata con una dose biologica equivalente di 40 Gy in frazioni da 2,67 Gy in 3 settimane. Oppure, in pazienti particolarmente fragili, può essere considerato un trattamento di 34 Gy in frazioni da 4,4 Gy o un trattamento di 25 Gy in frazioni da 5 Gy.⁵⁴

In caso di recidiva, la re-irradiazione rappresenta un'opzione terapeutica appropriata in circostanze selezionate, come in pazienti più giovani o in pazienti con un buon performance status.⁵³

La combinazione di re-irradiazione con terapia sistemica, in particolare con bevacizumab, è stata esplorata prospetticamente e potenzialmente potrebbe anche ridurre i tassi di radionecrosi.^{55,56}

1.7.3 Approccio chemioterapico

Il trattamento chemioterapico standard di prima linea consiste in temozolomide (75 mg/m² al giorno) concomitante alla radioterapia, seguito da ulteriori sei cicli di temozolomide (150-200 mg/m² per 5 giorni alla settimana per 4 settimane).⁵²

Le tossicità comuni indotte dal temozolomide includono nausea e mielosoppressione, in particolare trombocitopenia e neutropenia, soprattutto durante il periodo di terapia adiuvante.⁵²

Il meccanismo d'azione del temozolomide si basa sulla capacità dei suoi metaboliti di depositare gruppi metilici sulle basi guaniniche del DNA.

Dopo la somministrazione orale, il profarmaco temozolomide viene rapidamente assorbito nell'intestino tenue e raggiunge l'encefalo con una buona penetrazione della barriera ematoencefalica grazie alle sue dimensioni ridotte (194 Da).

Successivamente, subisce una conversione intracellulare spontanea attraverso idrolisi in un potente agente metilante, MTIC (Monometil triazenoimidazolo carbossamide). (**Figura 16**)

MTIC metila diverse basi azotate, soprattutto quelle guaniniche.

Ciò porta alla formazione di mutazioni nel DNA, che esitano in apoptosi cellulare, poiché i meccanismi di riparazione cellulare non sono in grado di adattarsi, alla base metilata, generando invece discontinuità tra i nucleotidi adiacenti.⁵⁷

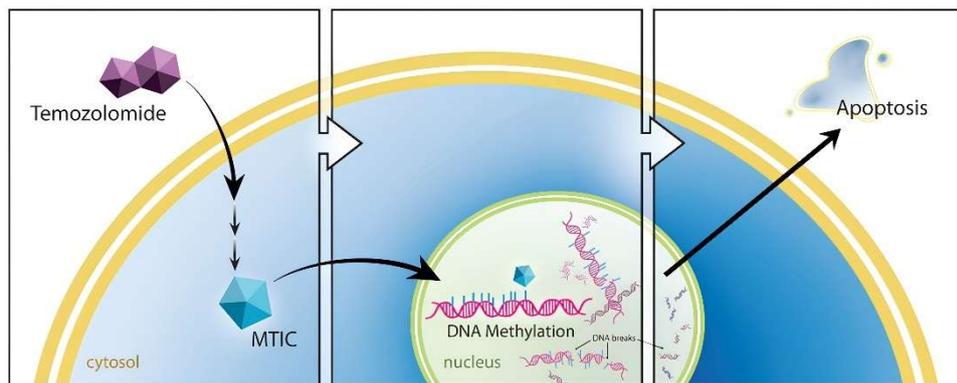


Figura 16. Illustrazione schematica del meccanismo del temozolomide. Il temozolomide a livello intracellulare si converte spontaneamente in MTIC, il quale metila il DNA. I meccanismi di riparazione del DNA non sono in grado di ripristinare il danno, producendo discontinuità tra i nucleotidi adiacenti e portando all'apoptosi.⁵⁷

Questa strategia terapeutica, secondo le linee guida (**Figura 17**), è attuabile in base all'età del paziente, al suo performance status (KPS), allo stato di metilazione del promotore dell'enzima di riparazione O⁶ - Metilguanina metiltransferasi (MGMT) e alla recidiva del tumore.²²

Questo enzima, se non metilato, può causare resistenza del paziente a temozolomide, mentre pazienti che presentano la metilazione del promotore del gene MGMT, possono trarre beneficio da una ridotta resistenza al farmaco.^{44,52}

Tuttavia, nell'attuale pratica clinica, lo status di metilazione di MGMT condiziona solo in parte la scelta terapeutica, sia per via della scarsità delle opzioni di trattamento disponibili, sia in relazione all'evidenza riportata in studi clinici di una risposta terapeutica agli agenti alchilanti anche in pazienti con MGMT non metilato.^{58,59}

Nei pazienti con età ≥ 70 anni con un buon performance status e che presentano MGMT metilato, la chemioradioterapia con temozolomide adiuvante rimane il trattamento di scelta.^{52,59}

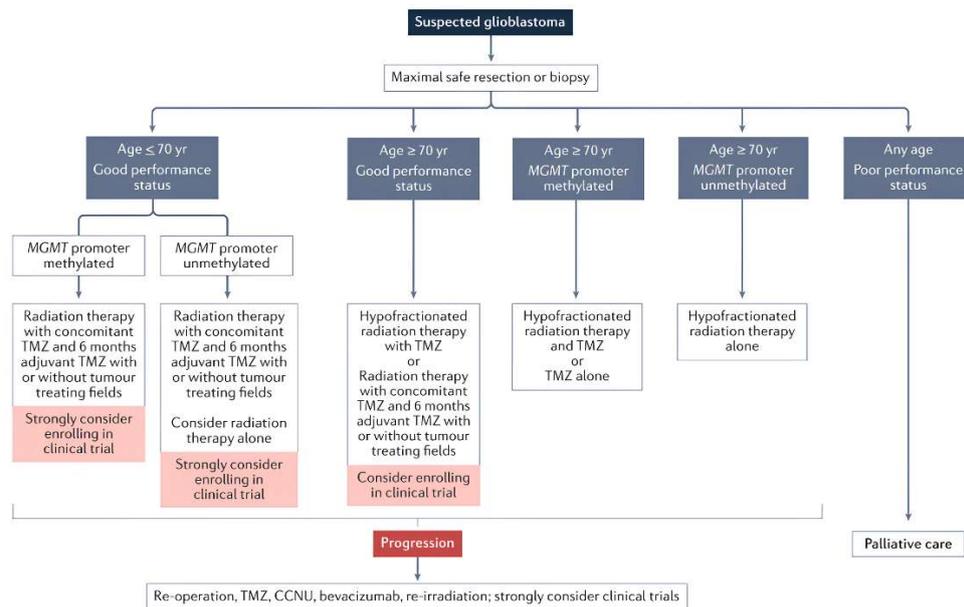


Figura 17. Algoritmo trattamento dei glioblastomi.¹⁶

1.7.4 Ulteriori approcci terapeutici

1.7.4.1 Wafer di carmustina

Gli impianti intratumorali di carmustina sono impianti chemioterapici alchilanti biodegradabili utilizzati come coadiuvanti alla resezione chirurgica nei pazienti con glioblastoma ricorrente, poiché si è osservato un miglioramento nell'overall survival complessivo.^{60,61}

Tuttavia, l'uso combinato con TMZ ancora divide gli autori, poiché alcuni ritengono che l'uso concomitante sia associato a un aumento dell'incidenza di effetti avversi.⁶²

1.7.4.2 Bevacizumab

L'anticorpo monoclonale Bevacizumab è un farmaco che esplica un ruolo antiangiogenetico legandosi ed inibendo VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).

La sua importanza è data sia dal contrasto alla proliferazione microvascolare, tipica del glioblastoma, sia perché è un farmaco ben tollerato con attività antiedemigena, che consente una diminuzione dell'uso di corticosteroidi e degli effetti avversi associati al loro utilizzo prolungato.⁶³

1.7.4.3 Tumor Treating Fields (TTF)

I dispositivi TTF sono strumenti terapeutici che utilizzano correnti alternate di bassa intensità e frequenza intermedia attraverso elettrodi posizionati sulla cute intorno alla regione di un tumore maligno per arrestarne la crescita e inducendo l'apoptosi delle cellule mitoticamente attive.^{64,65}

Questo metodo è considerato sicuro, poiché non influenza le cellule non in mitosi e, in diversi studi, ha dimostrato di poter migliorare l'overall survival se associato a temozolomide.⁶⁶

Tuttavia, il dispositivo è costoso, deve essere utilizzato almeno 18 ore al giorno e richiede la rasatura dei capelli dei pazienti. Ciò può influire sulla qualità della vita del paziente, oltre a causare una possibile bassa aderenza al trattamento.⁶⁷

Gli aspetti positivi e le principali limitazioni delle varie opzioni terapeutiche sono riassunti nella **Figura 18**.

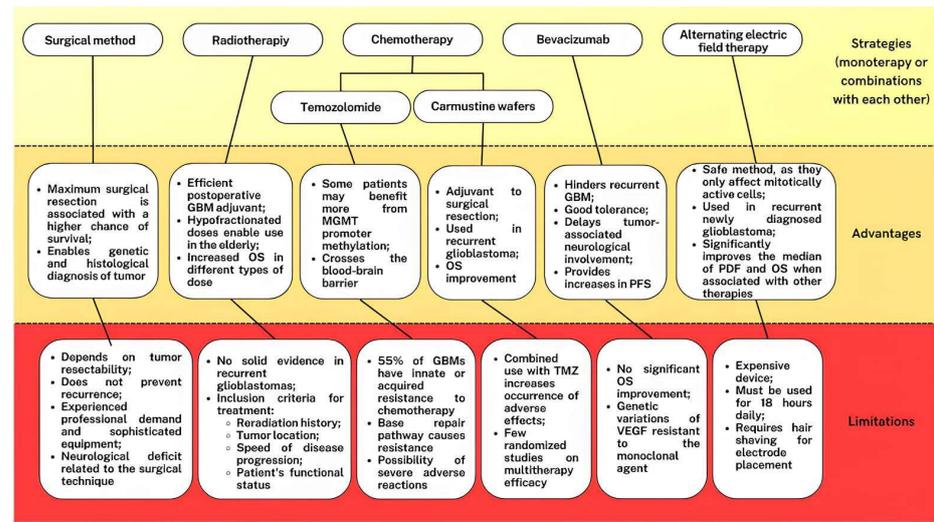


Figura 18. Schema delle principali opzioni terapeutiche per il trattamento del glioblastoma, gli aspetti positivi e le principali limitazioni.⁴⁴

1.7.5 Prospettive future

Le opzioni di immunoterapia attualmente disponibili per il trattamento del glioblastoma sono molteplici e schematizzate in **Figura 19**.

Queste includono vaccini, virus oncolitici, inibitori dei checkpoint immunitari e linfociti con il recettore per l'antigene chimerico (CAR-T).⁶⁸

I vari studi in corso e i trial clinici in atto potrebbero fornire risultati favorevoli nell'espandere l'uso di queste terapie nel prossimo futuro.⁶⁹

Tuttavia, finora ci sono alcuni fattori limitanti che ostacolano l'applicabilità dell'immunoterapia nel trattamento del glioblastoma, sia legati a fattori anatomici e immunologici individuali che alle vie di somministrazione e agli effetti avversi.^{70,71}

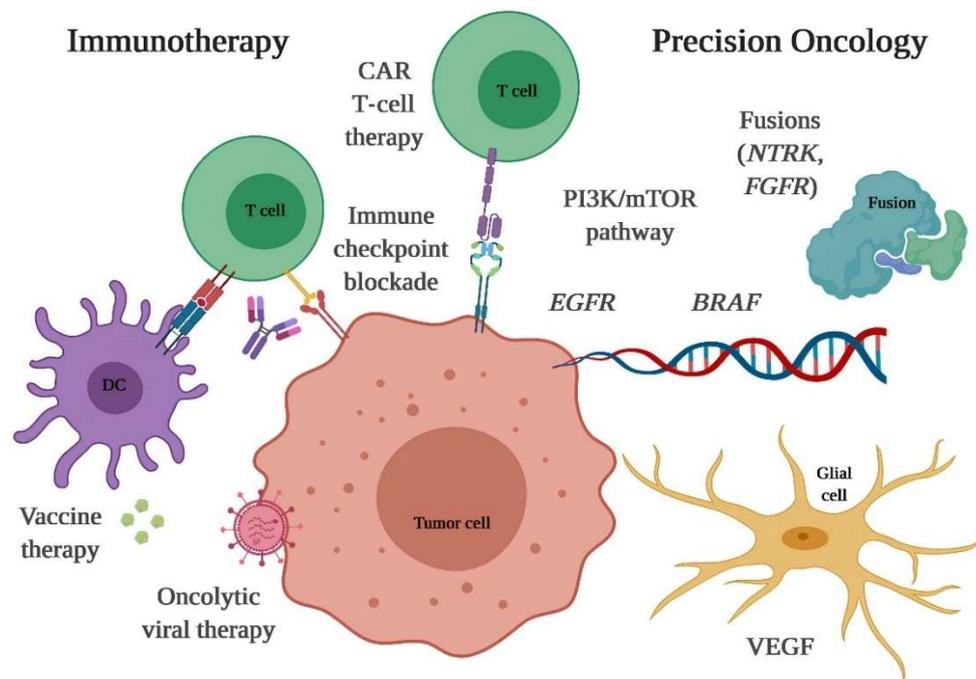


Figura 19. Prospettive future di terapie immunoterapiche.²²

1.7.6 Cure palliative

I pazienti con glioblastoma spesso sperimentano sintomi neurologici significativi e progressivi durante il corso della loro malattia, sia a causa del tumore stesso sia a causa delle tossicità derivanti dalla terapia.

Ciò interferisce con le attività quotidiane dei pazienti che, di conseguenza, spesso necessitano di livelli più elevati di assistenza infermieristica e di supporto sociale.⁷²

Infatti, è sempre più riconosciuta l'importanza del coinvolgimento attivo e precoce dei servizi di cure palliative man mano che cresce la consapevolezza della complessità delle esigenze assistenziali dei pazienti affetti da glioblastoma e dei loro caregiver.

La gestione dei sintomi, come la stanchezza, i disturbi dell'umore e del comportamento e la compromissione cognitiva, insieme alla pianificazione avanzata delle cure, rappresentano componenti cruciali per migliorare la qualità della vita dei pazienti e dei loro familiari.⁷³

2. Obiettivo dello studio

L'obiettivo principale della tesi è stato quello di esaminare retrospettivamente una casistica selezionata di glioblastomi IDH-Wildtype, valutando l'impatto prognostico e predittivo della metilazione del promotore genico della O⁶-Metilguanina metiltransferasi (MGMT).

3. Materiali e metodi

3.1 Materiali

3.1.1 Strumenti

- Microtomo rotativo (Leica)
- Estrattore: MaxWell RSC (Promega)
- Termoblocco: Thermomixer (Eppendorf)
- Termociclatore: Mastercycler Nexus GX2 (Eppendorf)
- Concentratore: Concentrator 5301 (Eppendorf)
- Sequenziatore: Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems by ThermoFisher)
- Fluorimetro: Quantus Fluorometer (Promega)
- Piattaforma NGS: Genexus (ThermoFisher scientific)

3.1.2 Kit

- Maxwell RSC DNA FFPE (Promega)
- MineralOil (Promega)
- Lysis Buffer (Promega)
- Proteinasi K (Promega)
- Colorante BlueDye (Promega),
- BrilliantDye Terminator Cycle sequencing kit v1.1 (NimaGen)
- AmpliTaq Gold DBA Polymerase with II & MgCl₂ (Applied Biosystems by ThermoFisher)
- ExoProStar (Illustra)
- iX-Pure Dye Terminator Clean-up (Resnova)
- Oncomine Precision Assay
- GeneScan - 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems)
- Acqua DEPC-Treated DNase-RNase free (BIOLINE)
- EpiTect Bisulfite Kit – (Qiagen)

3.1.3 Software

- Armonia
- OK-DH

3.2 Metodi

3.2.1 Criteri di selezione dei pazienti

Lo studio è stato condotto su una casistica di pazienti che hanno ricevuto diagnosi di glioblastoma tra il 2018 e il 2022, selezionati retrospettivamente all'interno del database della SCDU Anatomia Patologica dell'AOU Maggiore della Carità di Novara.

Per la selezione dei casi sono stati utilizzati due software:

- Armonia per la ricerca dei pazienti nel periodo indicato e dei relativi referti anatomopatologici, sia istologici, che molecolari;
- OK-DH per seguire i pazienti nel loro iter oncologico a cui i pazienti sono stati indirizzati successivamente alla diagnosi.

I pazienti, inizialmente selezionati per lo studio, sono stati successivamente confermati e inclusi solo se soddisfacevano i seguenti criteri:

- Età del paziente maggiore di 18 anni;
- Diagnosi di glioblastoma, IDH Wild-Type molecolare o istologica effettuata su paziente operato o su biopsia;
- La presenza di uno status di metilazione del promotore MGMT determinata;
- Una storia di un trattamento attivo della patologia;
- Una sopravvivenza di più di 4 mesi dalla diagnosi istopatologica.

Quindi si è provveduto a raccogliere informazioni inerenti:

- Dati anagrafici completi dei pazienti, comprendenti l'età alla diagnosi e l'età all'eventuale decesso;
- Storia clinica dei pazienti come il segno o sintomo principale che ha portato al sospetto clinico e al successivo iter diagnostico, il Karnofsky performance score (KPS) e l'esecuzione e i tipi di trattamenti effettuati; tali informazioni sono state ricavate dalla consultazione dei referti di visite oncologiche o radioterapiche svolte dal paziente presso la SCU Radioterapia e la SCU Oncologia dell'AOU Maggiore della Carità di Novara.
- La sede e la lateralità del tumore e il tipo di asportazione (macroscopicamente totale o subtotale), informazione ottenuta dalla disamina dei rapporti degli interventi chirurgici effettuati presso la SCU Neurochirurgia "Enrico Geuna", dell'AOU Maggiore della Carità di Novara.

Per ottenere informazioni riguardo al follow-up di alcuni pazienti, operati presso l'AOU Maggiore della Carità di Novara, ma seguiti nel loro iter terapeutico presso reparti più vicini alla loro residenza, per quanto riguarda la provincia di Vercelli (VC), si è reso necessario richiedere informazioni ai referenti del reparto di radioterapia oncologica dell'ASL di Vercelli.

3.2.2 Allestimento dei materiali

I pezzi operatori dei pazienti coinvolti nello studio sono stati fissati in formalina neutra tamponata per circa 24 ore, successivamente ridotti e trattati secondo la procedura istopatologica standard, per poi essere inclusi in paraffina. Da questi campioni sono state ricavate sezioni colorate con ematossilina-eosina. In un secondo momento, i vetrini e i blocchetti sono stati inviati al laboratorio di patologia molecolare. Utilizzando un microtomo, è stata eseguita una macro-dissezione con bisturi sul blocchetto per isolare l'area istologica di interesse, precedentemente individuata su una sezione colorata con ematossilina-eosina. Le sezioni così ottenute sono state quindi inserite in provetta per consentire l'estrazione successiva del DNA.

3.2.3 Estrazione del DNA

Utilizzando i protocolli in uso attualmente nella routine diagnostica della SCU Anatomia Patologica, AOU Maggiore della Carità di Novara, in questa fase è stato utilizzato un metodo di estrazione con biglie magnetiche, in particolare si è impiegato il kit "Maxwell RSC DNA FFPE" (Promega). Inizialmente, si è proceduto alla rimozione della paraffina mediante l'utilizzo del reagente MineralOil (Promega). Successivamente, si è preparata una miscela contenente Lysis Buffer (Promega), Proteinasi K (Promega) e il colorante BlueDye (Promega), distribuita in provetta. Dopo una fase di incubazione a 80°C per 2 minuti, 56°C per 30 minuti e 80°C per 4 ore, si è fatto uso dell'estrattore MaxWell RSC (Promega) con le apposite cartucce. In seguito all'estrazione, si è proceduto con la quantificazione del DNA estratto attraverso l'utilizzo dello strumento Quantus Fluorometer.

3.2.4 Sequenziamento Sanger

A seguito della quantificazione del DNA, si è proseguito con il sequenziamento Sanger per ricercare le mutazioni dei geni di interesse, nello specifico le mutazioni di IDH1 e IDH2.

In primo luogo, sono stati amplificati mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) le sequenze geniche d'interesse. Per le reazioni di PCR è stata utilizzata una Master Mix (AmpliTaq Gold DBA Polymerase with II & MgCl₂, Applied Biosystems by Thermofisher) e primers specifici per i singoli geni, descritti nella **Tabella 2**.

Tabella 2. Elenco primers di sequenza per l'analisi di geni IDH1, IDH2.

Gene	Nome primer	Sequenza primer (5'-3')
IDH1	IDH1 F	CTCCTGATGAGAAGAGGGTTG
	IDH1 R	TGGAAATTTCTGGGCCATG
IDH2	IDH2 F	TGGA ACTATCCGGAACATCC
	IDH2 R	AGTCTGTGGCCTTGTACTGC

Il DNA amplificato è stato poi purificato utilizzando il reagente ExoProStar (Illustra) seguito da una seconda PCR di sequenza per cui è stato utilizzato il kit BrilliantDye Terminator Cycle sequencing (NimaGen) e dei primers specifici per il singolo gene.

Infine, dopo la reazione di sequenza si è proceduto con una seconda purificazione del materiale che è stato successivamente dispensato in piastra poi caricata su sequenziatore Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, Thermo Fisher).

3.2.5 Next Generation Sequencing (NGS)

L'analisi di sequenziamento di nuova generazione è stata eseguita utilizzando un pannello multigenico (Oncomine Precision Assay, ThermoFisher) che è in grado di valutare le regioni hotspot e copy number variants (CNV) dei seguenti geni:

- Mutazioni hotspot (DNA): AKT1, AKT2, AKT3, ALK, AR, ARAF, BRAF, CDK4, CDKN2A, CHEK2, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ESR1, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, GNA11, GNAQ, GNAS, HRAS, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, MTOR, NRAS, NTRK1, NTRK2, NTRK3, PDGFRFA, PI3KCA, PTEN, RAF1, RET, ROS1, SMO, TP53;
- Geni valutati per CNV: ALK, AR, CD274, CDKN2A, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, KRAS, MET, PI3KCA, PTEN.

3.2.6 Valutazione epigenetica del gene MGMT

Il DNA estratto è stato diluito con acqua DEPC-Treated DNase-RNase free (BIOLINE, Taunton, USA) per ottenere una quantità di DNA pari a 1500 ng.

Per la valutazione dello stato di metilazione del gene MGMT è stata necessaria una reazione chimica utilizzando l'apposito kit (EpiTect Bisulfite Kit - Qiagen, Manchester, UK), che utilizza sodio bisolfito al fine di convertire selettivamente le citosine non metilate in uracile.

Dopo il trattamento del DNA con sodio bisolfito (DNA convertito) si effettuano due PCR separate utilizzando primers specifici, descritti nella **Tabella 3**, per l'allele metilato (sequenza comprendente citosine metilate) e per l'allele non metilato (sequenza comprendente citosine non metilate convertite precedentemente in uracile).

Tabella 3. Elenco primers di sequenza per l'analisi del gene MGMT

Gene	Nome primer	Sequenza primer (5'-3')
MGMT	MET-F	6FAM-TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC
MET	MET-R	GCACTCTTCCGAAAACGAAACG
MGMT	UNMET-F	6FAM- TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT
UNMET	UNMET-R	AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA

Il prodotto di PCR viene caricato al sequenziatore automatico (3130 Genetic Analyzer-Applied Biosystem) che effettua un'elettroforesi capillare.

Insieme al prodotto di PCR viene caricato un marker di peso molecolare fluorescente (GeneScan - 500 LIZ Size Standard - Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) di cui si conoscono già le dimensioni dei frammenti.

Nella **Figura 20**, l'elettroforesi capillare di un campione con MGMT non metilato. Nella **Figura 21**, l'elettroforesi capillare di un campione con MGMT metilato.

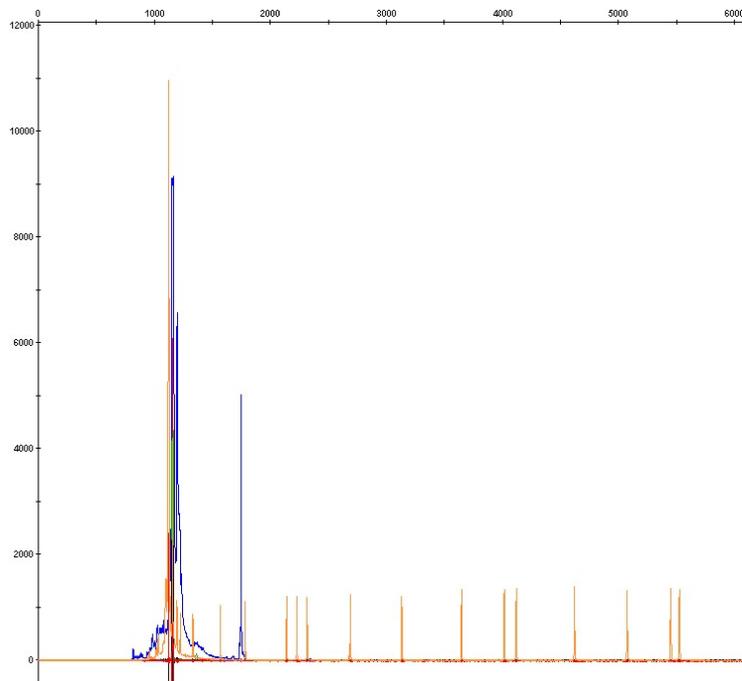


Figura 20. Elettroforesi capillare del prodotto di PCR (frammento blu) al sequenziatore automatico. In arancione marker di peso molecolare noto. MGMT non metilato.

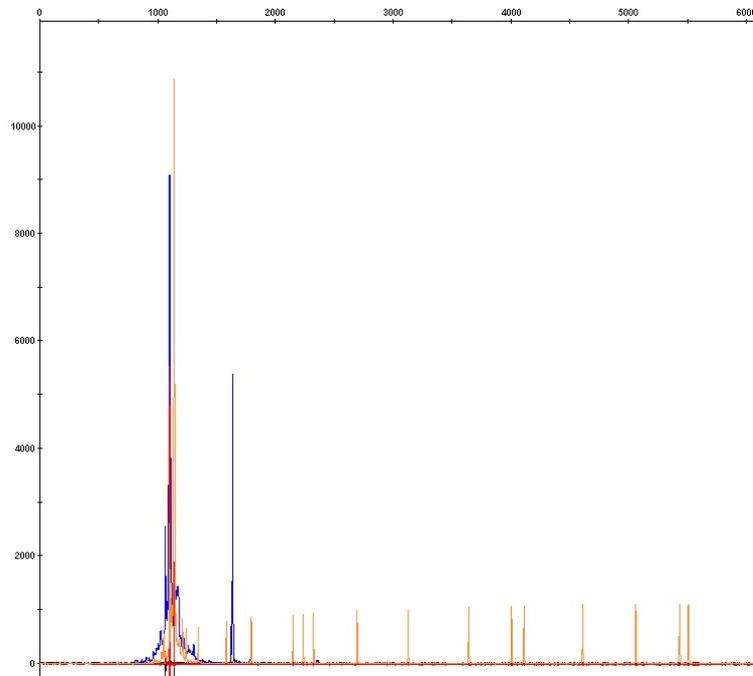


Figura 21. Elettroforesi capillare del prodotto di PCR (frammento blu) al sequenziatore automatico. In arancione marker di peso molecolare noto. MGMT metilato.

4. Risultati

Per la realizzazione dello studio retrospettivo di questa tesi sono stati inizialmente selezionati 160 pazienti con diagnosi di glioblastoma WHO 2021 o precedente.

Il primo criterio utilizzato per la selezione dei pazienti candidabili allo studio è stata la presenza di IDH-Wildtype.

Ciò si è reso necessario per poter considerare solamente i pazienti che avessero la diagnosi di glioblastoma aggiornata alle ultime linee guida WHO 2021.

Un ulteriore criterio per la selezione dei pazienti è stata la determinazione molecolare dello status del promotore genico MGMT, in quanto elemento principale oggetto di studio in questo lavoro di tesi.

Dei 160 pazienti inizialmente selezionati, 22 sono stati quindi esclusi per inadeguatezza o incompletezza dei dati molecolari disponibili.

Il processo di selezione è poi proseguito con la ricerca di informazioni circa il trattamento chirurgico effettuato dai pazienti, la sua radicalità e la storia della terapia attiva, radioterapica e/o oncologica, eseguita.

Ciò ha portato all'esclusione di 83 pazienti per carenza delle suddette informazioni chirurgiche e/o cliniche.

Ulteriori 3 pazienti sono stati esclusi in quanto il follow-up è risultato inferiore a 4 mesi.

L'iter di selezione descritto è riportato in **Figura 22**.

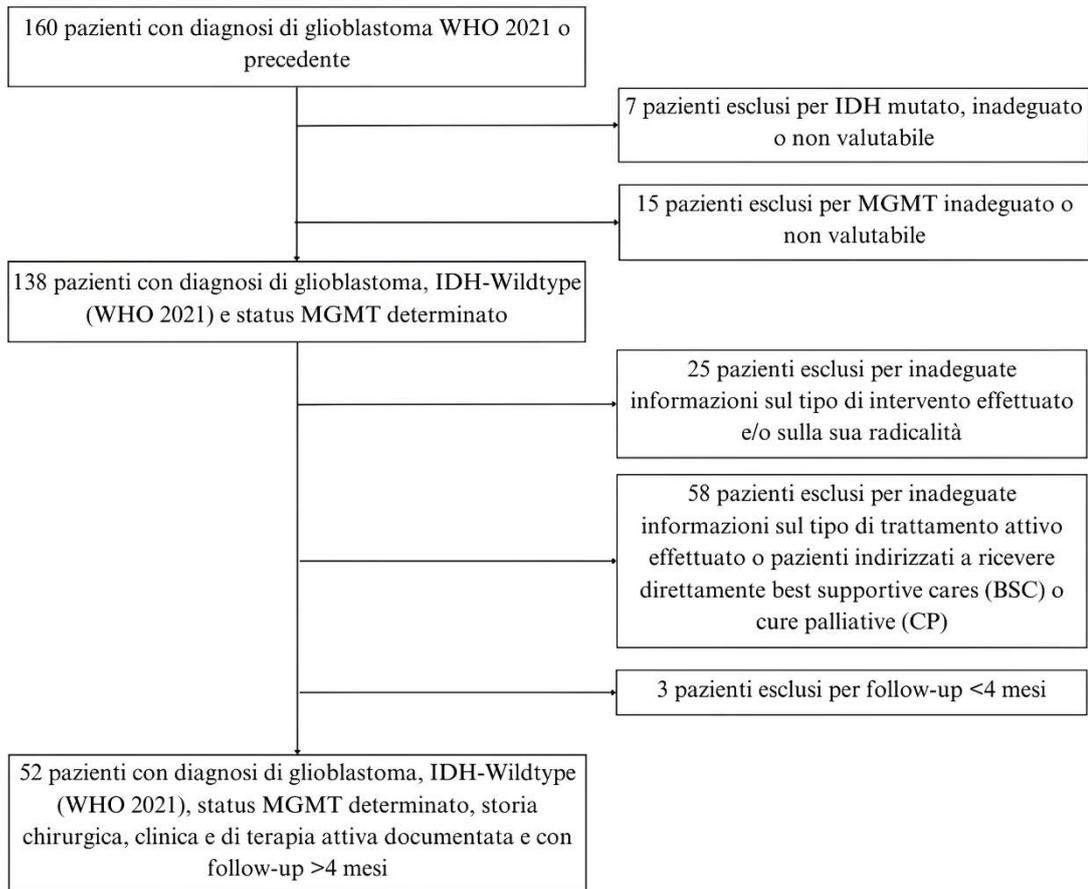


Figura 22. Diagramma rappresentativo dell'iter di selezione dei pazienti.

Al termine dell'iter di selezione, dei 160 pazienti candidabili, 52 sono stati confermati all'interno dello studio.

Gli esiti delle analisi anatomopatologiche e molecolari del tumore e le informazioni radiologiche, chirurgiche e cliniche del paziente sono riassunti nelle seguenti tabelle.

Dai dati raccolti nella **Tabella 4** emerge che la media dell'età alla diagnosi di glioblastoma IDH-Wildtype, dei pazienti oggetto di studio, sia 64 anni (20-83) e che siano più interessati i pazienti di genere maschile (60%).

Tabella 4. Dati demografici dei pazienti: genere ed età alla diagnosi.

Dati		Risultati	
		N.	%
Genere	<i>M</i>	31	60%
	<i>F</i>	21	40%
Età alla diagnosi	<i>Età media</i>	64	
	<i>Età mediana</i>	67	
	<i>Intervallo</i>	20-83	
	<i>< 70 anni</i>	33	63%
	<i>>70 anni</i>	19	37%

I sintomi (**Tabella 5**) che hanno fornito un primo sospetto clinico e successivamente condotto ad una diagnosi sono stati molteplici. I principali sono stati i seguenti: confusione (27%), crisi comiziali (14%), cefalea (13%) e ipostenia (13%).

Tabella 5. Segni e sintomi clinici dei pazienti.

Sintomo principale			
	<i>Confusione</i>	14	27%
	<i>Crisi comiziale</i>	7	14%
	<i>Cefalea</i>	7	13%
	<i>Ipostenia</i>	7	13%
	<i>Rallentamento ideo-motorio</i>	5	10%
	<i>Impaccio dell'eloquio</i>	5	9%
	<i>Impaccio motorio</i>	4	8%
	<i>Clonie</i>	1	2%
	<i>Alterazione campo visivo</i>	1	2%
	<i>Parestesie</i>	1	2%

La massa tumorale nella maggior parte dei casi era monofocale (77%), i lobi più coinvolti sono stati il temporale (35%) e il frontale (28%). (**Tabella 6**)

Nei casi in cui il tumore coinvolgesse diverse aree encefaliche (23%), la più coinvolta è stata quella parietale-occipitale (42%).

Nei casi esaminati, il tumore era localizzato similmente nell'emisfero sinistro (48%) o destro (42%), solo una minor quota presentava una localizzazione mesiale (10%).

Tabella 6. Sede di insorgenza del tumore e lateralità.

Sede	<i>Monofocale</i>	40	77%
	<i>Temporale</i>	14	35%
	<i>Frontale</i>	11	28%
	<i>Linea mediana</i>	8	20%
	<i>Parietale</i>	7	17%
	<i>Multifocale</i>	12	23%
	<i>Parietale Occipitale</i>	5	42%
	<i>Frontale Parietale</i>	2	17%
	<i>Frontale Temporale</i>	2	17%
	<i>Parietale Temporale Occipitale</i>	1	8%
	<i>Temporale Occipitale</i>	1	8%
	<i>Temporale Parietale</i>	1	8%
Lateralità	<i>Sinistra</i>	25	48%
	<i>Destra</i>	22	42%
	<i>Mesiale</i>	5	10%

Per quanto riguarda l'analisi molecolare dello status di metilazione di MGMT, riassunta nella **Tabella 7**, circa metà dei pazienti con la diagnosi di glioblastoma IDH-Wildtype all'interno dello studio presentavano MGMT metilato (52%) e circa metà presentavano MGMT non metilato (48%). Ciò ha permesso che le diverse analisi statistiche, effettuate tra i due gruppi di pazienti, fossero più confrontabili.

Tabella 7. Status di metilazione di MGMT

Status MGMT	<i>Metilato</i>	27	52%
	<i>Non metilato</i>	25	48%

Il performance status dei pazienti, schematizzato nella **Tabella 8**, valutato solitamente durante la prima visita oncologica o radioterapica attraverso la scala di Karnofsky, è un indicatore che fotografa le condizioni generali del paziente e la sua autonomia nelle attività quotidiane.

In ambito oncologico è particolarmente utilizzato per monitorare l'andamento della malattia, la risposta alla terapia e l'impatto degli eventuali effetti collaterali.

Nella maggior parte dei casi seguiti, all'inizio della terapia, circa un mese dopo l'intervento chirurgico, i pazienti erano considerati in grado di svolgere autonomamente le loro attività con un lieve (36%) o moderato sforzo (27%).

Tabella 8. Performance status (KPS) dei pazienti alla prima visita oncologica o radioterapica post-intervento neurochirurgico.

Performance Status (KPS)	50	1	2%
	60	4	8%
	70	14	27%
	80	19	36%
	90	14	27%

Mentre la maggior parte dei pazienti sono andati incontro ad un intervento neurochirurgico di exeresi della lesione (77%), taluni, per ragioni inerenti alla localizzazione del tumore o un povero performance status, sono andati incontro a biopsia stereotassica frameless in neuronavigazione della lesione (23%). **(Tabella 9)**

Ottenere un frammento di tessuto tumorale è fondamentale per poter avere la certezza di una diagnosi attraverso indagini morfologiche e molecolari.

Tuttavia, la radicalità oncologica, macroscopica o radiologica, è stata ottenuta solo in un ridotto numero di pazienti (27%).

Tabella 9. Tipologia di intervento chirurgico e radicalità oncologica.

Tipologia di intervento	<i>Exeresi lesione</i>	40	77%
	<i>Biopsia stereotassica</i>	12	23%
Radicalità	<i>Non radicale</i>	38	73%
	<i>Radicale</i>	14	27%

Per quanto riguarda l'approccio terapeutico (**Tabella 10**), il 56% dei pazienti ha effettuato il trattamento costituito da una prima fase di chemioterapia alchilante (temozolomide) e radioterapia ad intensità modulata (IMRT) concomitanti, seguita da un'ulteriore fase adiuvante di chemioterapia, con temozolomide (Schema Stupp) o Fotemustina (Schema Addeo).

Una più alta percentuale di pazienti ha effettuato solo il trattamento radiochemioterapico concomitante (60%) o il trattamento chemioterapico adiuvante (79%).

Un ridotto numero di pazienti è stato trattato con l'anticorpo monoclonale anti-VEGF Bevacizumab (2%) o con uno degli inibitori del pathway delle tirosin chinasi Regorafenib (13%).

Tabella 10. Approcci e schemi di trattamento oncologici e/o radioterapici dei pazienti

Terapia	<i>Radiochemioterapia Concomitante</i>	31	60%
	<i>Chemioterapia Adiuvante</i>	41	79%
	<i>Radiochemioterapia Concomitante + Chemioterapia Adiuvante</i>	29	56%
	<i>Regorafenib</i>	7	13%
	<i>Bevacizumab</i>	1	2%

La maggior parte dei pazienti presenti all'interno di questo studio sono attualmente deceduti (85%).

L'exitus è sopraggiunto all'età media di 66 anni (27-84). (**Tabella 11**)

Per quanto riguarda la sopravvivenza, l'overall survival è di 11 mesi e la media di 14 mesi. La differenza tra i due valori è riconducibile alla presenza di long term survivors (>50 mesi).

La sopravvivenza ad un anno si è verificata per circa la metà dei pazienti (48%), per poi calare all'8% a 3 anni e al 4% a 5 anni.

Tabella 11. Dati demografici dei pazienti: exitus e sopravvivenza.

Età exitus	<i>Età media</i>	66	
	<i>Età mediana</i>	68	
	<i>Intervallo</i>	27-84	
Status Paziente <i>(Al 05/02/2024)</i>	<i>Vivo</i>	8	15%
	<i>Deceduto</i>	44	85%
Sopravvivenza (mesi)	<i>Media</i>	14	
	<i>Mediana</i>	11	
	<i>Sopravvivenza a 1 anno</i>	25	48%
	<i>Sopravvivenza a 3 anni</i>	4	8%
	<i>Sopravvivenza a 5 anni</i>	2	4%

All'interno di questo lavoro di tesi, per studiare il valore prognostico e predittivo della metilazione del promotore MGMT, sono state effettuate analisi di sopravvivenza, attraverso la realizzazione di curve di Kaplan-Meier, per 14 gruppi distinti.

I risultati raccolti (P-Value e overall survival) sono riassunti nella **Tabella 12**.

Complessivamente, le curve di Kaplan-Meier realizzate non hanno evidenziato differenze statisticamente significative ($p < 0.05$), eccezion fatta per le **Curve N.12** e le **Curve N.14**.

Le **Curve N.11** evidenziano l'overall survival nei pazienti con MGMT metilato trattati con temozolomide concomitante o adiuvante (OS=15 mesi) vs i pazienti con MGMT non metilato trattati con temozolomide concomitante o adiuvante (OS=10 mesi). P-Value=0.1322.

Le **Curve N.12** evidenziano l'overall survival nei pazienti con MGMT metilato trattati con temozolomide concomitante o adiuvante (OS=15 mesi) vs i pazienti con MGMT non metilato trattati con temozolomide concomitante o adiuvante (OS=9 mesi). P-Value=0.0252. Si tratta di curve di sopravvivenze che hanno considerato gruppi di confronto uguali e variabili totalmente identiche rispetto alle curve N.11, tranne per una paziente long term survival che è stata estratta dal gruppo dei pazienti con MGMT non metilato per motivi di riclassificazione approfonditi nel capitolo della discussione.

Le **Curve N.14** evidenziano l'overall survival nei pazienti con MGMT metilato trattati unicamente con temozolomide concomitante o adiuvante (OS=15) vs i pazienti con MGMT metilato trattati unicamente con la radioterapia (OS=7). P-Value=0.001264.

Le **Curve N.8** evidenziano l'overall survival nei pazienti con MGMT metilato che hanno avuto una rimozione radicale del tumore (OS=31 mesi) vs i pazienti con MGMT non metilato che hanno avuto una rimozione radicale del tumore (OS=9 mesi). P-Value=0.05236. Pur soltanto avvicinandosi alla significatività statistica, il confronto tra le curve di sopravvivenza dei due gruppi analizzati fa emergere il valore prognostico della metilazione di MGMT all'interno di una corte di pazienti che hanno avuto una rimozione radicale del tumore.

Nonostante la prevalente assenza di una significatività statistica nelle altre curve di Kaplan-Meier realizzate, è evidente che le singole curve, relative al gruppo di pazienti con MGMT metilato, siano spostate verso destra, indicando così una maggior sopravvivenza. Ciò è confermato dal dato dell'overall survival che, in ogni coppia di gruppi analizzati, è maggiore per i pazienti con MGMT metilato.

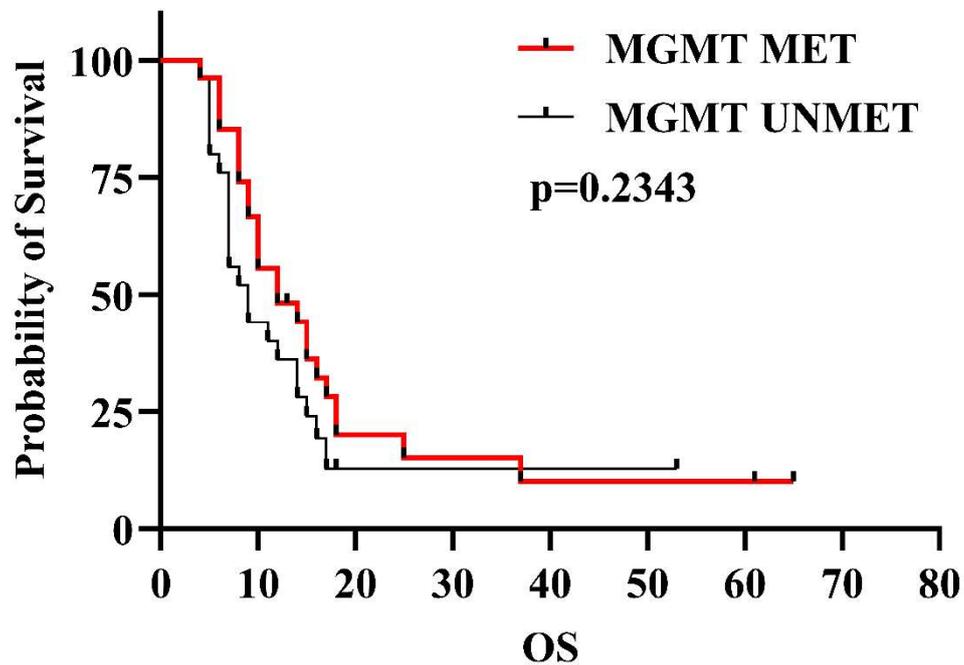
Tabella 12. Gruppi di pazienti su cui è stata effettuata una analisi di sopravvivenza attraverso la realizzazione delle curve di Kaplan-Meier, P-Value (Log-Rank test) ottenuto e Overall Survival (OS) in mesi.

MET: metilato, *UNMET*: non metilato, *UNMET Temozolomide**: gruppo di pazienti con MGMT non metilato da cui è stata estratta una paziente con diagnosi differente per i motivi esposti nella discussione della tesi.

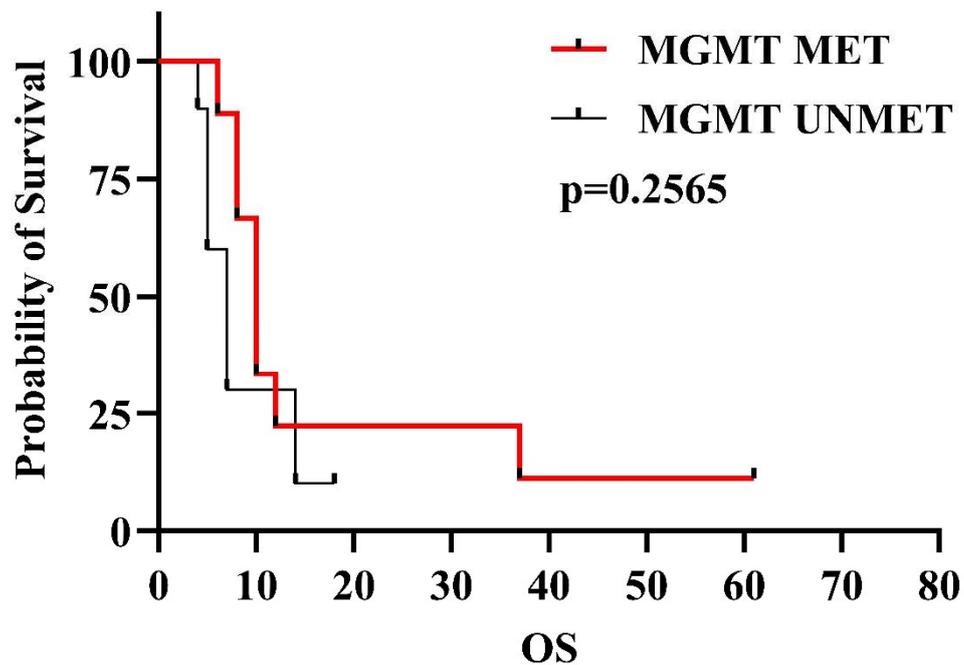
Gruppo	Categorie	Overall Survival	P-Value
1	<i>MET</i>	12	0.2343
	<i>UNMET</i>	9	
2	<i>MET Over70</i>	10	0.2565
	<i>UNMET Over70</i>	7	
3	<i>MET Under70</i>	15	0.4829
	<i>UNMET Under70</i>	11	
4	<i>MET Monofocale</i>	13.5	0.2017
	<i>UNMET Monofocale</i>	9	
5	<i>MET Multifocale</i>	10	0.8804
	<i>UNMET Multifocale</i>	7	
6	<i>MET KPS 80-90</i>	12	0.4728
	<i>UNMET KPS 80-90</i>	10.5	

7	<i>MET KPS 50-60-70</i>	13.5	0.1881
	<i>UNMET KPS 50-60-70</i>	5	
8	<i>MET Radicale</i>	31	0.05236
	<i>UNMET Radicale</i>	9	
9	<i>MET Non radicale</i>	10	0.9972
	<i>UNMET Non radicale</i>	8	
10	<i>MET Radiochemio+Chemio</i>	14.5	0.5398
	<i>UNMET Radiochemio+Chemio</i>	12	
11	<i>MET Temozolomide</i>	15	0.1322
	<i>UNMET Temozolomide</i>	10	
12	<i>MET Temozolomide</i>	15	0.0252
	<i>UNMET Temozolomide*</i>	9	
13	<i>UNMET Temozolomide</i>	9	0.5978
	<i>UNMET Radioterapia</i>	7	
14	<i>MET Temozolomide</i>	15	0.001264
	<i>MET Radioterapia</i>	7	

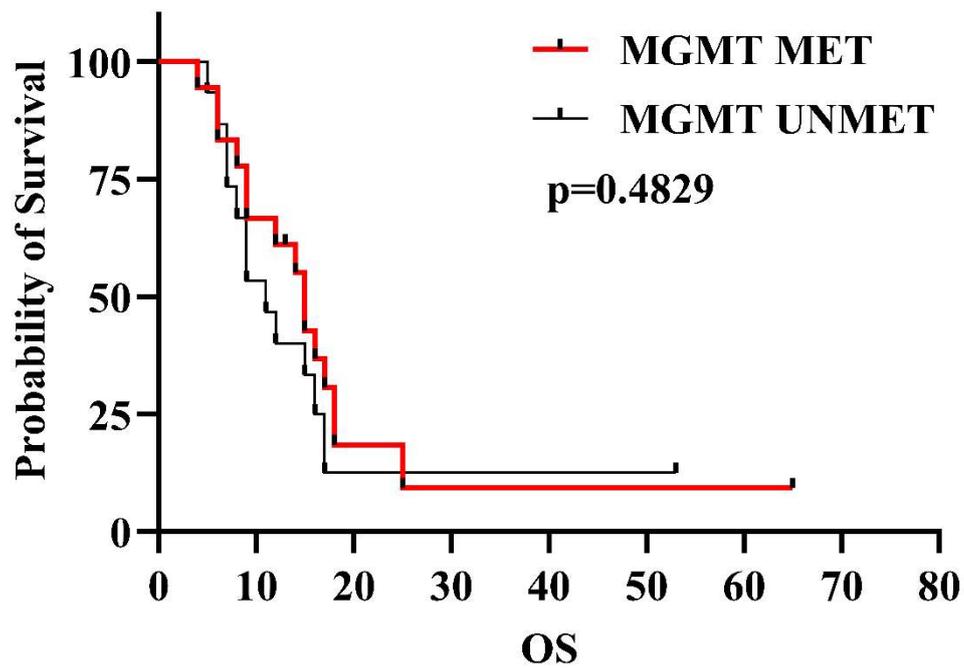
4.1 Curve di sopravvivenza



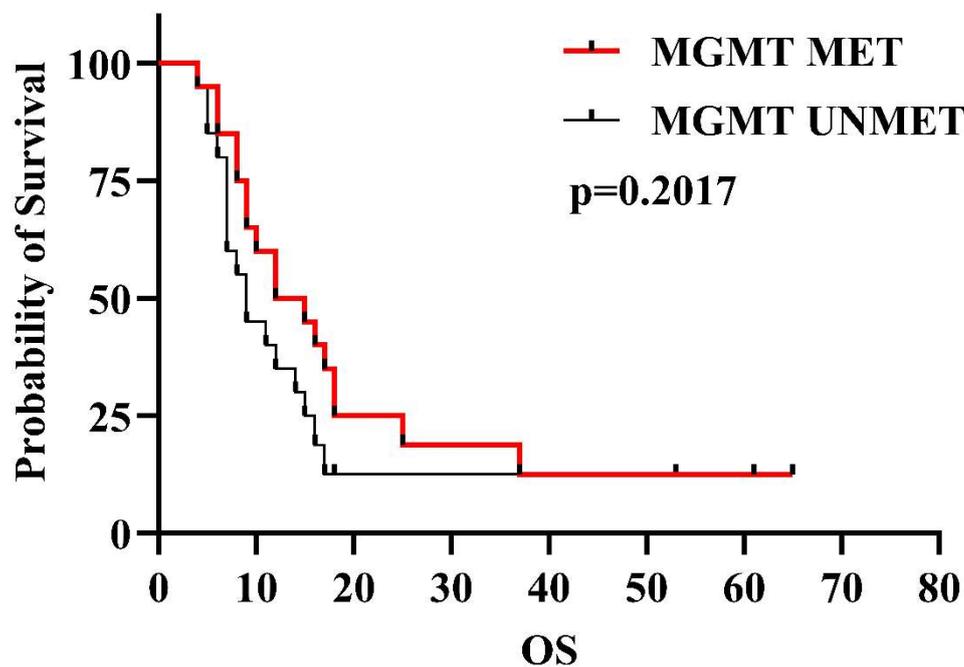
Curve di sopravvivenza del gruppo N. 1, rappresentative dei pazienti con MGMT metilato (OS=12 mesi) vs pazienti con MGMT non metilato (OS=9 mesi). P-Value=0.2343.



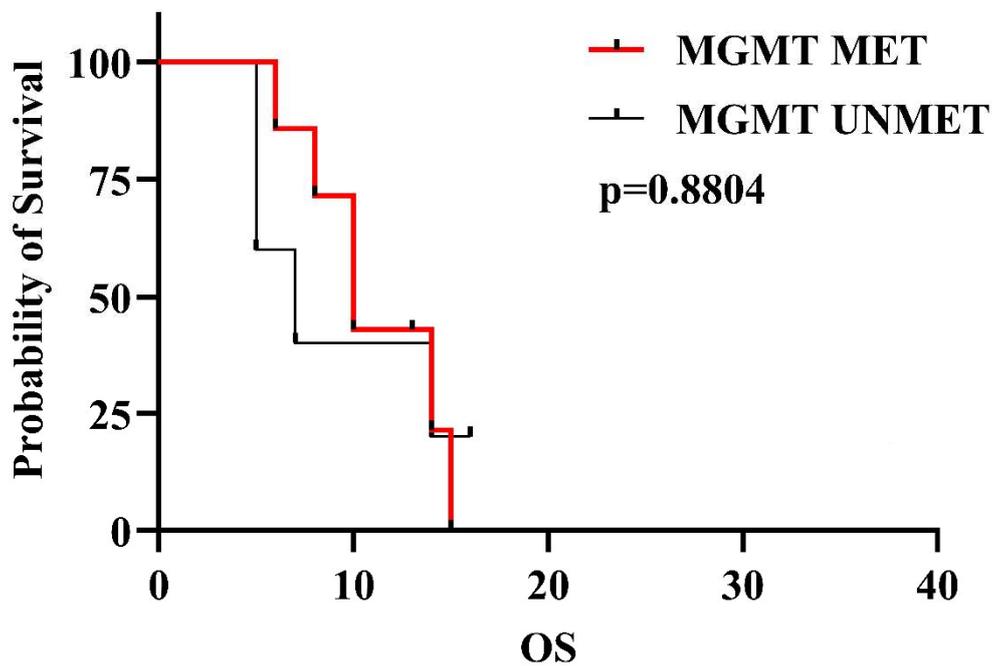
Curve di sopravvivenza del gruppo N. 2, rappresentative dei pazienti con più di 70 anni con MGMT metilato (OS=10 mesi) vs pazienti con più di 70 anni con MGMT non metilato (OS=7 mesi). P-Value=0.2565.



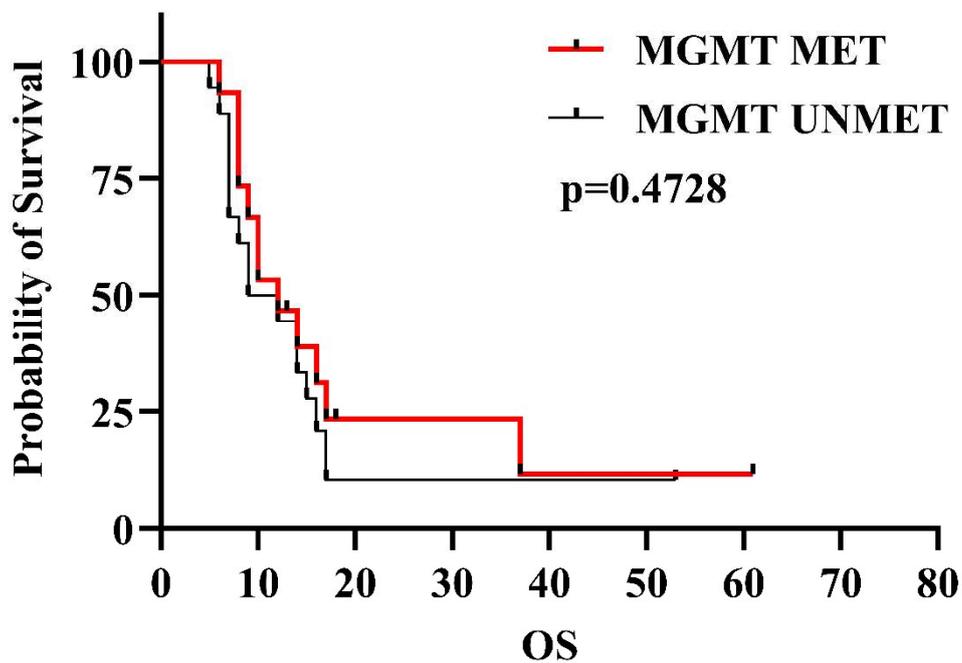
Curve di sopravvivenza del gruppo N. 3, rappresentative dei pazienti con meno di 70 anni con MGMT metilato (OS=15 mesi) vs pazienti con meno di 70 anni con MGMT non metilato (OS=11 mesi). P-Value=0.4829.



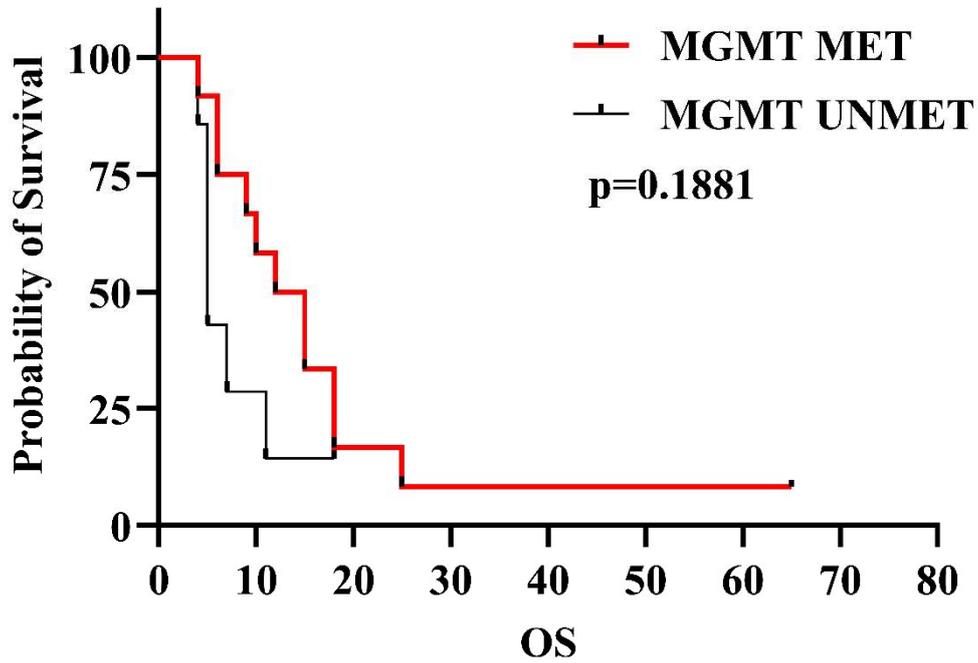
Curve di sopravvivenza del gruppo N. 4, rappresentative dei pazienti con lesione monofocale con MGMT metilato (OS=13,5 mesi) vs pazienti con lesione monofocale con MGMT non metilato (OS=9 mesi). P-Value=0.2017.



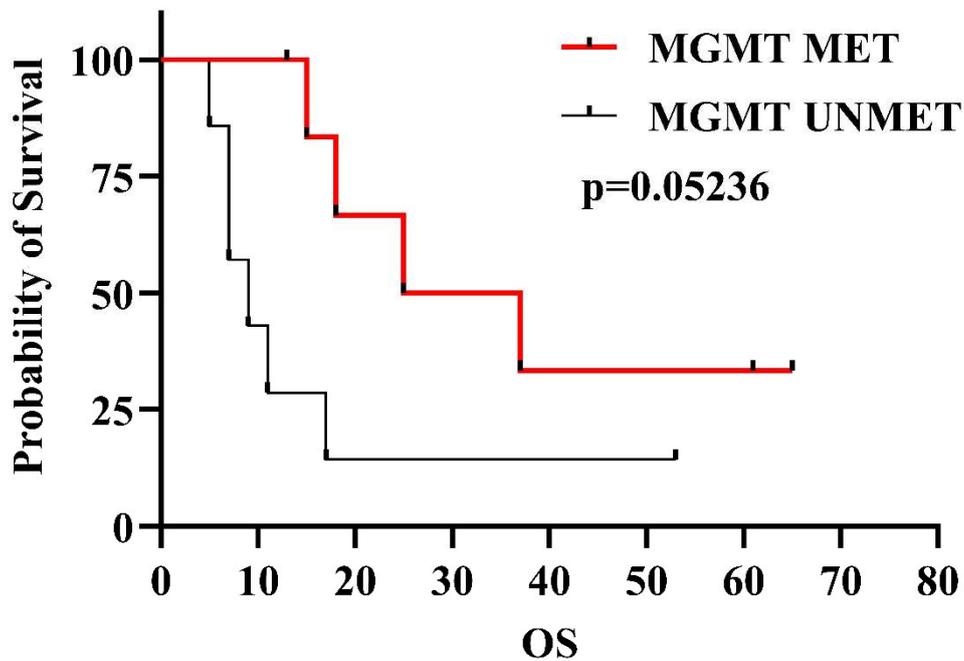
Curve di sopravvivenza del gruppo N. 5, rappresentative dei pazienti con lesione multifocale con MGMT metilato (OS=10 mesi) vs pazienti con lesione multifocale con MGMT non metilato (OS=7 mesi). P-Value=0.8804.



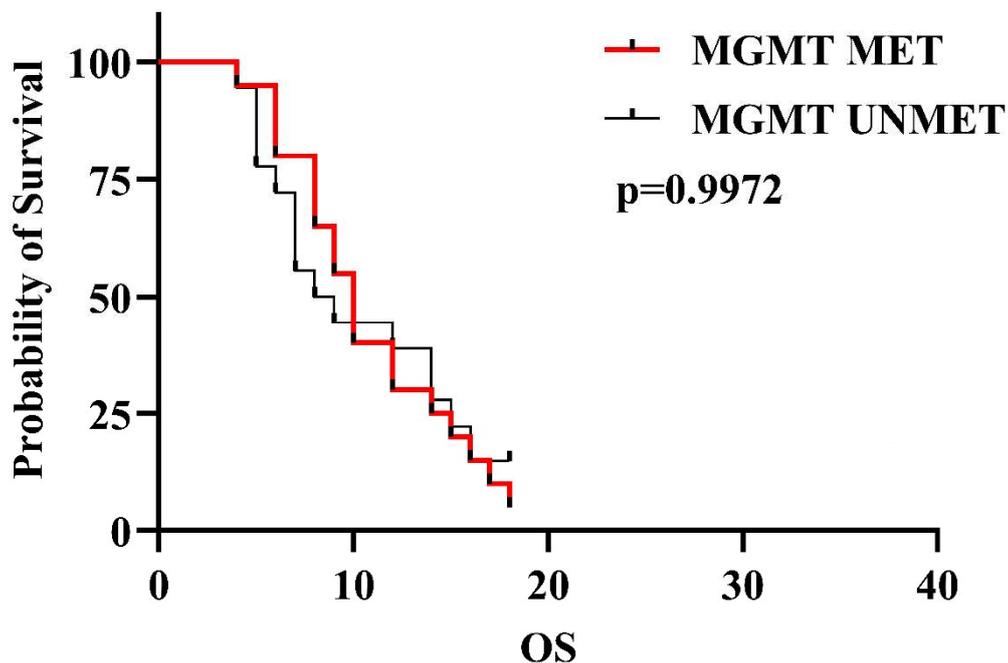
Curve di sopravvivenza del gruppo N. 6, rappresentative dei pazienti con performance status (KPS) di 80 o 90 con MGMT metilato (OS=12 mesi) vs pazienti con performance status (KPS) di 80 o 90 con MGMT non metilato (OS=10.5 mesi). P-Value=0.4728.



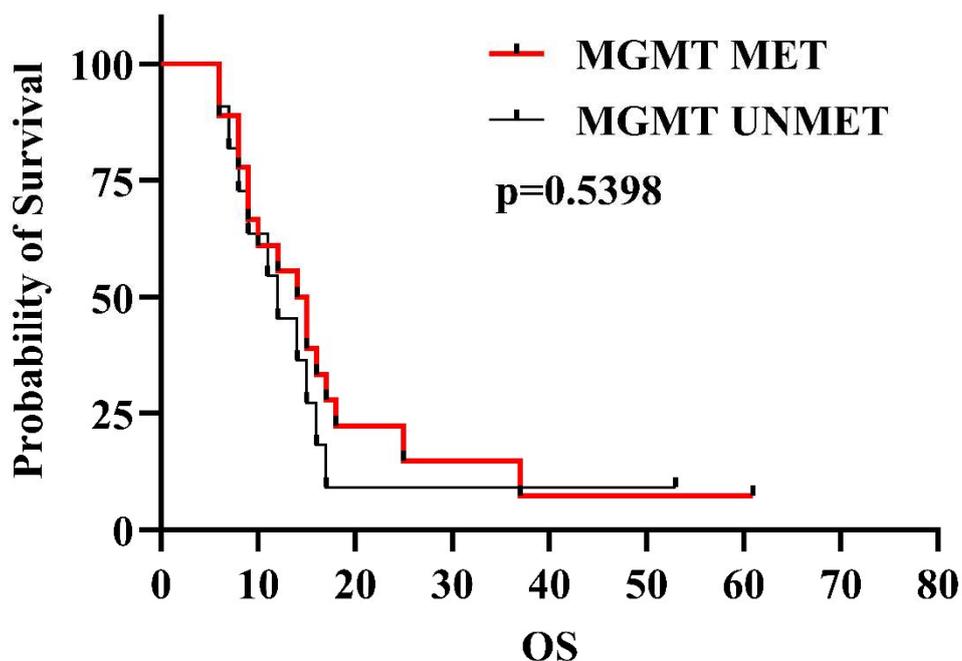
Curve di sopravvivenza del gruppo N. 7, rappresentative dei pazienti con performance status (KPS) di 50 o 60 o 70 con MGMT metilato (OS=13.5 mesi) vs pazienti con performance status (KPS) di 50 o 60 o 70 con MGMT non metilato (OS=5 mesi). P-Value=0.1881.



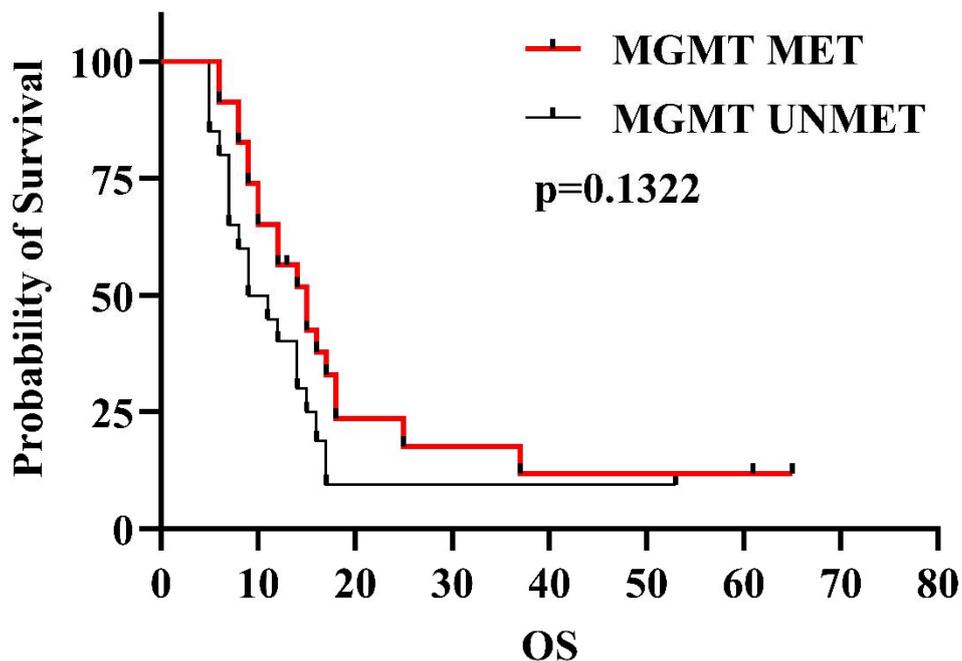
Curve di sopravvivenza del gruppo N. 8, rappresentative dei pazienti che hanno avuto una rimozione radicale del tumore con MGMT metilato (OS=31 mesi) vs pazienti che hanno avuto una rimozione radicale del tumore con MGMT non metilato (OS=9 mesi). P-Value=0.05236.



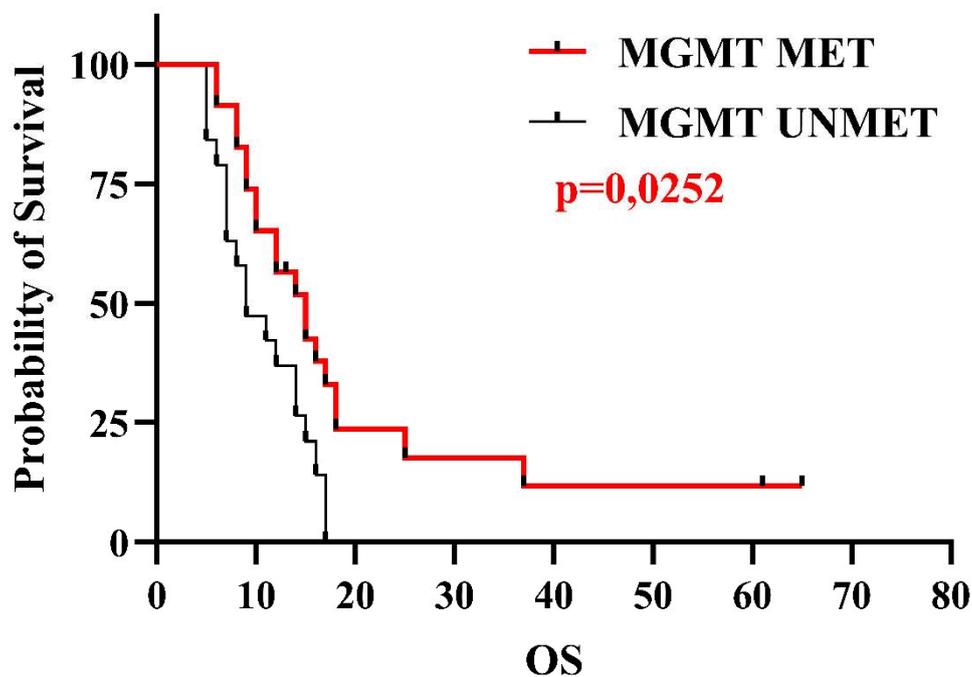
Curve di sopravvivenza del gruppo N. 9, rappresentative dei pazienti che hanno avuto una rimozione non radicale del tumore con MGMT metilato (OS=10 mesi) vs pazienti che hanno avuto una rimozione non radicale del tumore con MGMT non metilato (OS=8 mesi). P-Value=0.9972.



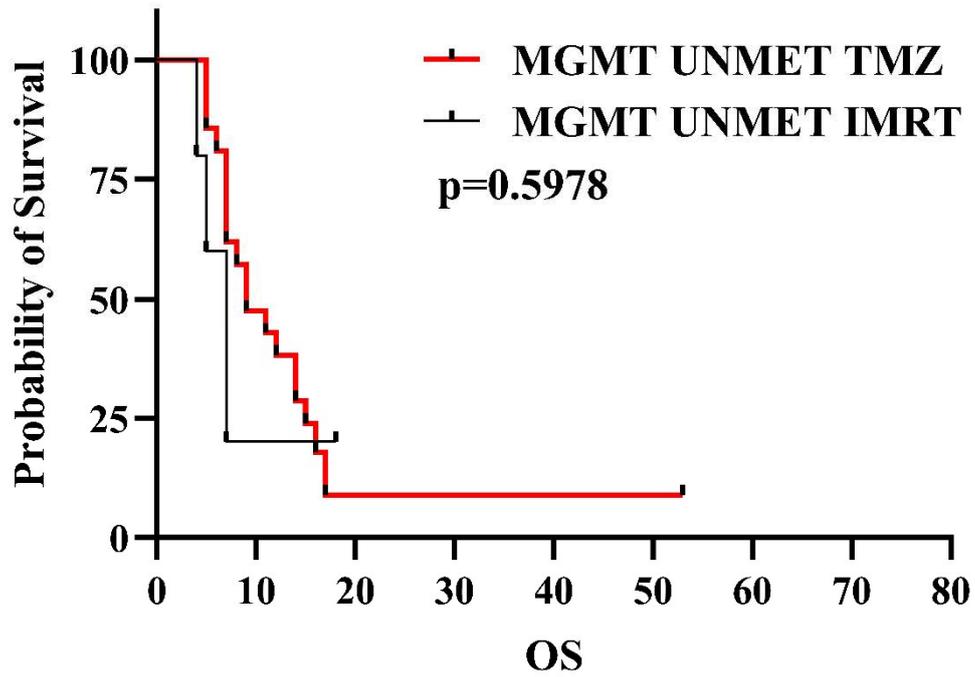
Curve di sopravvivenza del gruppo N. 10, rappresentative dei pazienti trattati con radiochemioterapia concomitante + chemioterapia adiuvante con MGMT metilato (OS=14.5 mesi) vs pazienti trattati con radiochemioterapia concomitante + chemioterapia adiuvante con MGMT non metilato (OS=12 mesi). P-Value=0.5398.



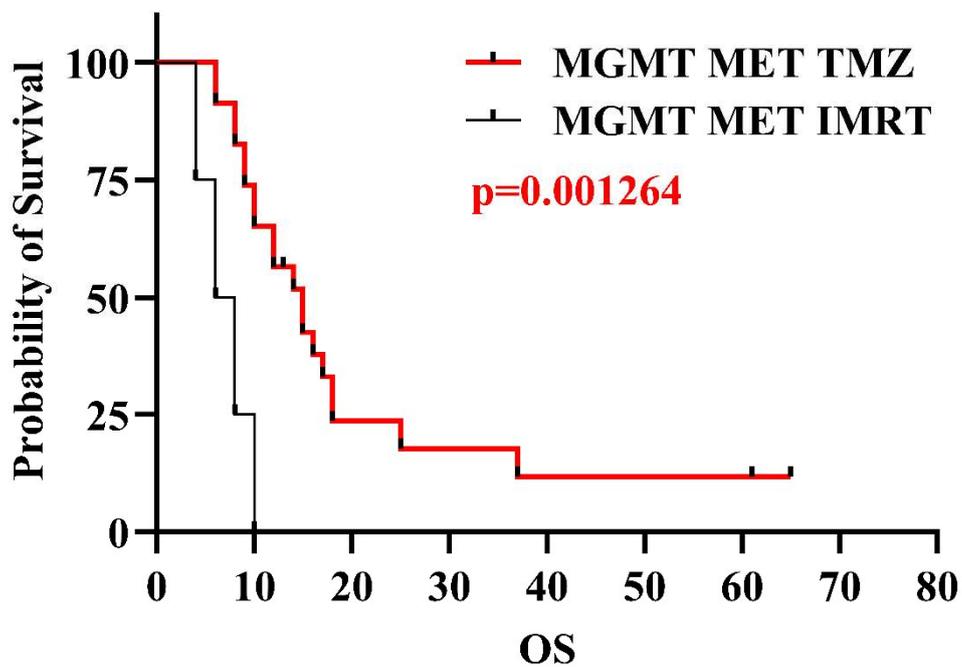
Curve di sopravvivenza del gruppo N. 11, rappresentative dei pazienti trattati con temozolomide concomitante o adiuvante con MGMT metilato (OS=15 mesi) vs pazienti trattati con temozolomide concomitante o adiuvante con MGMT non metilato (OS=10 mesi). P-Value=0.1322.



Curve di sopravvivenza del gruppo N. 12, rappresentative dei pazienti trattati con temozolomide concomitante o adiuvante con MGMT metilato (OS=15 mesi) vs pazienti trattati con temozolomide concomitante o adiuvante con MGMT non metilato (OS=9 mesi). P-Value=0.0252.
Dai gruppi di pazienti analizzati in queste curve di sopravvivenza è stata estratta una paziente con diagnosi differente per i motivi esposti nella discussione della tesi.



Curve di sopravvivenza del gruppo N. 13, rappresentative dei pazienti con MGMT non metilato trattati con temozolomide concomitante o adiuvante (OS=9 mesi) vs pazienti trattati unicamente con radioterapia (OS=7 mesi). P-Value=0.5978.



Curve di sopravvivenza del gruppo N. 14, rappresentative dei pazienti con MGMT metilato trattati con temozolomide concomitante o adiuvante (OS=15 mesi) vs pazienti trattati unicamente con radioterapia (OS=7 mesi). P-Value=0.001264.

5. Discussione

I tumori gliali del sistema nervoso centrale (SNC) rappresentano una categoria eterogenea dal punto di vista morfologico, molecolare, nonché prognostico, come evidenziato dal recente inquadramento classificativo, pubblicato nel 2021 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità.^{5,17}

Questa classificazione dicotomizza i gliomi, tuttora diagnosticati su base morfologica, in due categorie, in relazione allo status mutazionale del gene IDH, attribuendo loro prognosi differenti, e successivamente li sottoclassifica sulla base di una complessa integrazione tra il dato morfologico e il dato molecolare.¹⁷

In termini generali, i gliomi diffusi IDH-Wildtype rappresentano la categoria più numerosa e sono caratterizzati da una prognosi generalmente infausta, con mediane di sopravvivenza oscillanti tra i 12 e i 18 mesi dal momento della diagnosi.⁵

Tuttavia, all'interno di questa categoria, sussistono differenze sostanziali, in parte legate alla morfologia del tumore - tale per cui viene utilizzato il classico sistema di grading in gradi 2, 3 e 4 - e in parte legate al setting molecolare relativo allo status mutazionale o all'amplificazione/delezione di geni quali EGFR, TERT, ATRX o a perdite cromosomiche, che possono condizionare l'andamento clinico della neoplasia.^{3,7}

Gli schemi terapeutici convenzionali suggeriscono un approccio chemioterapico e radioterapico concomitante seguito da un mantenimento adiuvante con un chemioterapico come il temozolomide (Schema Stupp)⁷⁴ o la fotemustina (Schema Addeo)⁷⁵ e risultano pressoché invariati da molti anni.²²

Inoltre, l'attuazione di protocolli terapeutici basati sul principio del bersaglio molecolare hanno mostrato complessivamente scarsa efficacia e/o significativi effetti collaterali.²²

Ciò nonostante, il tentativo di implementare nuove strategie terapeutiche basate sulla ricerca di target molecolari è in piena attuazione attraverso molteplici studi clinici condotti in varie parti del mondo.⁴⁴

Contrariamente ad altre neoplasie solide, per le quali nella pratica clinica al patologo vengono richiesti molteplici marcatori predittivi – in questo senso basti pensare ai tumori della mammella, del colon retto e del polmone – nel caso dei gliomi, le indagini morfologiche e molecolari sono sostanzialmente limitate ad un ruolo diagnostico o, al più, prognostico.

Come unico marcatore predittivo, nella pratica clinica, viene richiesto lo status di metilazione del promotore genico della O⁶ - Metilguanina metiltransferasi (MGMT).

Il principio su cui si basa la valutazione di MGMT è relativo alla previsione di efficacia dei trattamenti alchilanti, i quali risultano più validi in caso di silenziamento di MGMT che, non rimuovendo gli stessi gruppi alchilici dal DNA della cellula tumorale, ne favorisce la distruzione.

Tuttavia, nell'attuale pratica clinica, lo status di metilazione di MGMT condiziona solo in parte la scelta terapeutica e dà più empiricamente un significato prognostico, sia per via della scarsità delle opzioni di trattamento disponibili, sia in relazione all'evidenza riportata in studi clinici di una risposta terapeutica agli agenti alchilanti anche in pazienti con MGMT non metilato.^{58,76}

Nel presente lavoro di tesi abbiamo condotto una indagine retrospettiva su una casistica di glioblastomi operati presso la SCDO Neurochirurgia "Enrico Geuna", dell'AOU Maggiore della Carità di Novara tra il 2018 e il 2022, valutando il ruolo dello status di metilazione di MGMT quale parametro prognostico e/o predittivo.

I criteri di selezione della casistica sono risultati molto restrittivi e hanno incluso unicamente pazienti con glioblastoma IDH-Wildtype, per i quali era disponibile un adeguato follow up - maggiore di 4 mesi - e una precisa conoscenza dello schema di trattamento terapeutico chirurgico, radioterapico e/o chemioterapico eseguito dal paziente.

Pertanto, da un'iniziale casistica di 160 pazienti si è giunti ad una più esigua, ma ben documentata, casistica di 52 pazienti.

Su questi casi sono state effettuate una serie di valutazioni atte ad evidenziare l'eventuale ruolo prognostico o predittivo del promotore genico della O⁶ - Metilguanina metiltransferasi (MGMT).

Le curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier hanno evidenziato complessivamente una linea di tendenza di prognosi più favorevole per i pazienti che presentavano metilazione di MGMT riferita all'età, al performance status, alla radicalità e alla focalità, raggiungendo però solamente livelli vicini alla significatività statistica nel caso di pazienti che avevano ottenuto la radicalità chirurgica.

Quest'ultimo dato evidenzia come la valutazione dello status di metilazione di MGMT in questo sottogruppo di pazienti risulti fondamentale per una stratificazione prognostica.

Al contrario, nei pazienti nei quali la radicalità chirurgica non è stata raggiunta per motivazioni tecniche, di performance status del paziente o di sede del tumore, lo status di metilazione di MGMT non ha modificato minimamente la sopravvivenza, come sottolineato dalla totale sovrapposizione delle **Curve N.9**.

Per quanto riguarda il significato predittivo dello status di metilazione di MGMT, esso è stato valutato mediante analisi di sopravvivenza di tre gruppi distinti.

Il primo gruppo comprendeva pazienti con MGMT metilato vs pazienti con MGMT non metilato, sottoposti a trattamento adiuvante o concomitante con temozolomide. (**Curve N.11**)

Il secondo gruppo comprendeva pazienti con MGMT non metilato sottoposti unicamente a radioterapia vs unicamente a chemioterapici alchilanti. (**Curve N.13**)

Il terzo gruppo comprendeva pazienti con MGMT metilato sottoposti unicamente a radioterapia vs unicamente a chemioterapici alchilanti. (**Curve N.14**)

La significatività statistica è stata raggiunta solamente in quest'ultimo gruppo evidenziando come, a fronte di uno status metilato di MGMT risulterebbe più efficace la scelta di un trattamento con farmaci alchilanti, specie se confrontata con il sottogruppo di pazienti con MGMT non metilato per i quali la scelta del trattamento chemioterapico o radioterapico non sembrerebbe impattare significativamente sulla sopravvivenza.

Da questi dati sembra emergere, seppur relativamente ad una casistica limitata dal punto di vista numerico e di conseguenza della forza statistica, un qualche ruolo predittivo di miglior risposta al trattamento alchilante nei pazienti con status metilato di MGMT.

Il limite principale di questo studio, che va sottolineato, è rappresentato dalla sua natura retrospettiva, e, per conseguenza, è assai verosimile che interferenze quali uno scarso performance status del paziente, la loro età o altri fattori che hanno limitato il trattamento chemioterapico, abbiano introdotto fattori confondenti sul reale significato clinico dello status di metilazione stesso di MGMT.

Un ulteriore limite è presente nell'analisi statistica per quanto riguarda la valutazione predittiva del biomarcatore MGMT, in quanto non è stato possibile rendere i gruppi omogenei sulla base della radicalità dell'intervento effettuato per via di una limitata casistica.

Un commento più approfondito va effettuato valutando dettagliatamente le **Curve N.11**, rappresentative dei pazienti trattati con temozolomide concomitante o adiuvante con MGMT metilato (OS=15 mesi) vs pazienti trattati con temozolomide concomitante o adiuvante con MGMT non metilato (OS=10 mesi). P-Value=0,1322.

In questo sottogruppo è presente un paziente con MGMT non metilato long term survival, con una sopravvivenza attuale di 53 mesi.

Si tratta di una paziente di 20 anni all'epoca della diagnosi sottoposta a radicalità chirurgica nel 2019, trattata, inizialmente con temozolomide concomitante alla radioterapia, successivamente, in seguito all'insorgenza di resistenza al temozolomide, si è scelto di proseguire il trattamento con un diverso chemioterapico alchilante (Fotemustina).

La paziente inoltre ha avuto recidiva locale a distanza di tre mesi dalla prima diagnosi ed è stata rioperata, attualmente è in buona salute.

Il caso è stato rivalutato istologicamente e molecolarmente e, sulla base della nuova classificazione WHO, in relazione alla mutazione di P53 e alla perdita di funzione di geni di mismatch repair, nonché della morfologia, è stato riclassificato come Giant Cells Glioblastoma IDH-Wildtype, p53 mutato con instabilità dei microsatelliti.

I quadri istologici e l'immunofenotipo del glioblastoma relativi alla paziente long term survival sono rappresentati nella **Figura 23**, **Figura 24** e **Figura 25**.

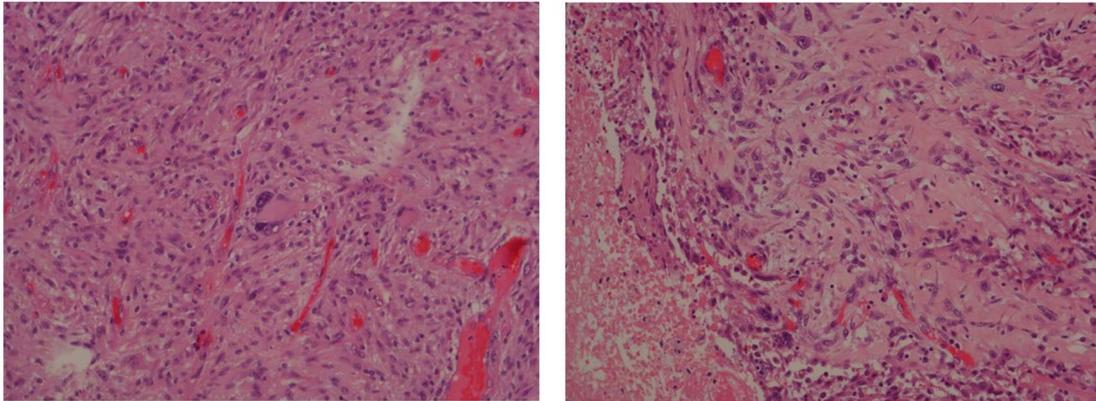


Figura 23. Proliferazione neoplastica di astrociti atipici con frequente gigantismo e multinucleazione.

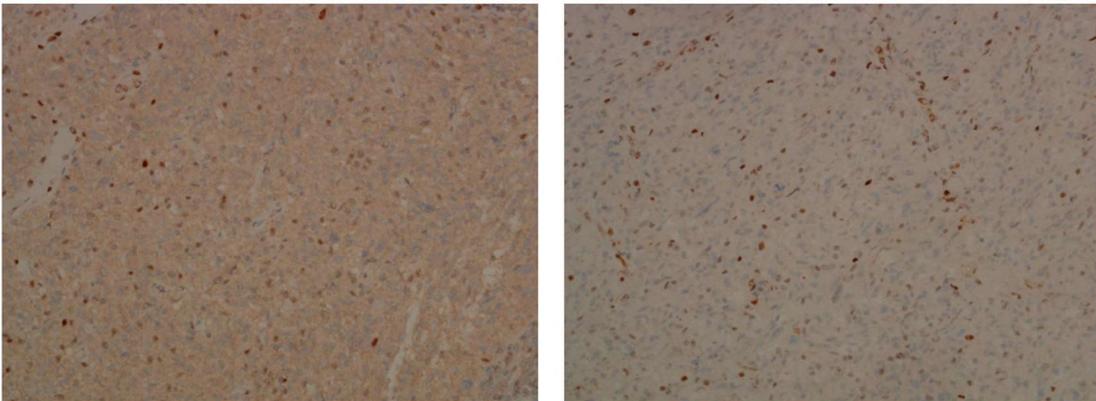


Figura 24. Perdita di funzione delle proteine del mismatch repair MLH1 e PMS2.

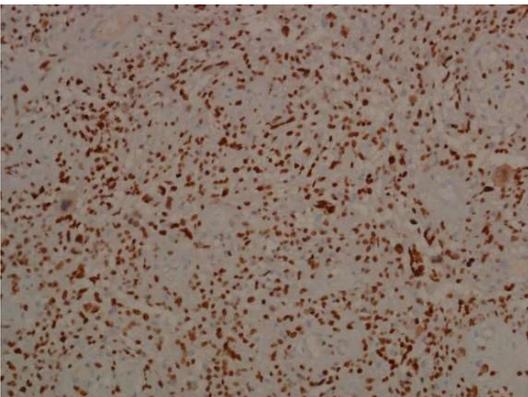


Figura 25. Overespressione di P53.

A questa variante, assai rara, è stato attribuito un vantaggio prognostico rispetto al glioblastoma IDH-Wildtype convenzionale come evidenziato da studi nei quali si mostra come glioblastomi ultramutati o ipermutati, stimolando attraverso la produzione di neoantigeni tumorali una marcata risposta immunitaria, si associno ad una prognosi migliore.⁷⁷

Sulla base di ciò, per le caratteristiche sopracitate, l'estrazione di questa paziente dall'analisi statistica mostra una differenza statisticamente significativa (**Curve N.12**, P-Value=0,0252) nel gruppo dei pazienti metilati vs non metilati, sottolineando ulteriormente il significato predittivo di questo biomarcatore.

6. Conclusioni

A conclusione dello studio, seppur con i limiti precedentemente esposti, appare indispensabile, nei glioblastomi IDH-Wildtype, la valutazione dello status di metilazione del promotore genico della O⁶ - metilguanina metiltransferasi (MGMT) quale biomarcatore prognostico e predittivo di risposta terapeutica.

Risulta altresì importante la valutazione, anche retrospettiva, dei pazienti long term survival per l'identificazione, attraverso metodiche molecolari, di biomarcatori potenzialmente utili a giustificare una prognosi più favorevole, aprendo a prospettive terapeutiche più mirate.

7. Bibliografia

1. Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM). *I Numeri Del Cancro in Italia 2023* (2023).
2. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71, 209–249 (2021).
3. Ostrom, Q. T. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2016-2020. *Neuro-Oncology* vol. 25 IV1–IV99 (2023).
4. Huang, J. *et al.* Disease burden, risk factors, and trends of primary central nervous system (CNS) cancer: A global study of registries data. *Neuro Oncol* 25, 995–1005 (2023).
5. Louis, D. N. *et al.* The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Neuro Oncol* 23, 1231–1251 (2021).
6. AIRTUM Working Group *et al.* *Italian Cancer Figures - Report 2015: The Burden of Rare Cancers in Italy* (2016).
7. Ostrom, Q. T., Francis, S. S. & Barnholtz-Sloan, J. S. Epidemiology of Brain and Other CNS Tumors. *Current Neurology and Neuroscience Reports* vol. 21.
8. Birzu, C. *et al.* Recurrent Glioblastoma: From Molecular Landscape to New Treatment Perspectives (2020).
9. Pellerino, A., Caccese, M., Padovan, M., Cerretti, G. & Lombardi, G. Epidemiology, risk factors, and prognostic factors of gliomas. *Clinical and Translational Imaging* vol. 10 467–475 (2022).
10. Ostrom, Q. T. *et al.* Risk factors for childhood and adult primary brain tumors. *Neuro-Oncology* vol. 21 1357–1375 (2019).
11. Kinnersley, B. *et al.* Quantifying the heritability of glioma using genome-wide complex trait analysis. *Sci Rep* 5 (2015).

12. Braganza, M. Z. *et al.* Ionizing radiation and the risk of brain and central nervous system tumors: A systematic review. *Neuro-Oncology* vol. 14 1316–1324 (2012).
13. Baan, R., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B. & *et al.* Opinion on Potential health effects of exposure to electromagnetic fields (EMF). *Lancet Oncology* 624–626 (2011).
14. 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).
15. Gritsch, S., Batchelor, T. T. & Gonzalez Castro, L. N. Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. *Cancer* vol. 128 47–58 (2022).
16. Horbinski, C., Berger, T., Packer, R. J. & Wen, P. Y. Clinical implications of the 2021 edition of the WHO classification of central nervous system tumours. *Nat Rev Neurol* 18, 515–529 (2022).
17. Kurokawa, R. *et al.* Major Changes in 2021 World Health Organization Classification of Central Nervous System Tumors. *Radiographics* 42, 1474–1493 (2022).
18. Komori, T. Grading of adult diffuse gliomas according to the 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System. *Laboratory Investigation* vol. 102 126–133 (2022).
19. International Agency for Research on Cancers. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Central nervous system tumours (2021).
20. Louis, D. N. *et al.* The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Neuro Oncol* 23, 1231–1251 (2021).
21. Wirsching, H. G., Galanis, E. & Weller, M. Glioblastoma. in *Handbook of Clinical Neurology* vol. 134 381–397 Elsevier (2016).

22. Tan, A. C. *et al.* Management of glioblastoma: State of the art and future directions. *CA Cancer J Clin* 70, 299–312 (2020).
23. Masui, K., Cloughesy, T. F. & Mischel, P. S. Molecular pathology in adult high-grade gliomas: From molecular diagnostics to target therapies. *Neuropathology and Applied Neurobiology* vol. 38 271–291 (2012).
24. Cohen, A. L., Holmen, S. L. & Colman, H. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep* 13 (2013).
25. Christensen, B. C. *et al.* DNA methylation, isocitrate dehydrogenase mutation, and survival in glioma. *J Natl Cancer Inst* 103, 143–153 (2011).
26. Yang, H., Ye, D., Guan, K. L. & Xiong, Y. IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: Mechanistic insights and clinical perspectives. *Clinical Cancer Research* vol. 18 5562–5571 (2012).
27. Ohba, S., Kuwahara, K., Yamada, S., Abe, M. & Hirose, Y. Correlation between IDH, ATRX, and TERT promoter mutations in glioma. *Brain Tumor Pathology* vol. 37 33–40 (2020).
28. Yu, W., Zhang, L., Wei, Q. & Shao, A. O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT): Challenges and New Opportunities in Glioma Chemotherapy. *Frontiers in Oncology* vol. 9 (2020).
29. Caccese, M. *et al.* Definition of the Prognostic Role of MGMT Promoter Methylation Value by Pyrosequencing in Newly Diagnosed IDH Wild-Type Glioblastoma Patients Treated with Radiochemotherapy: A Large Multicenter Study. *Cancers (Basel)* 14, (2022).
30. Monica, R. Della *et al.* MGMT and Whole-Genome DNA Methylation Impacts on Diagnosis, Prognosis and Therapy of Glioblastoma Multiforme. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 23 (2022).
31. Liu, D., Yang, T., Ma, W. & Wang, Y. Clinical strategies to manage adult glioblastoma patients without MGMT hypermethylation. *Journal of Cancer* vol. 13 354–363 (2022).

32. Butler, M. *et al.* MGMT Status as a Clinical Biomarker in Glioblastoma. *Trends in Cancer* vol. 6 380–391 (2020).
33. Pines, G., Huang, P. H., Zwang, Y., White, F. M. & Yarden, Y. EGFRvIV: A previously uncharacterized oncogenic mutant reveals a kinase autoinhibitory mechanism. *Oncogene* 29, 5850–5860 (2010).
34. Śledzińska, P., Bebyn, M. G., Furtak, J., Kowalewski, J. & Lewandowska, M. A. Prognostic and predictive biomarkers in gliomas. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 22 (2021).
35. Chistiakov, D. A., Chekhonin, I. V & Chekhonin, V. P. The EGFR variant III mutant as a target for immunotherapy of glioblastoma multiforme. *Eur J Pharmacol* 810, 70–82 (2017).
36. Kono, K. *et al.* The Role of Diffusion-Weighted Imaging in Patients with Brain Tumors. *AJNR Am J Neuroradiol* vol. 22.
37. Associazione Italiana di Oncologia Medica (AIOM). *Linee Guida neoplasie cerebrali Edizione 2021.* (2021).
38. Pivawer, G., Law, M. & Zagzag, D. *et al.* Perfusion MR Imaging and Proton MR Spectroscopic Imaging in Differentiating Necrotizing Cerebritis from Glioblastoma Multiforme.
39. Young, R. M., Jamshidi, A., Davis, G. & Sherman, J. H. Current trends in the surgical management and treatment of adult glioblastoma. *Annals of Translational Medicine* vol. 3 (2015).
40. Mekkaoui, C. *et al.* Diffusion tensor imaging in patients with glioblastoma multiforme using the supertoroidal model. *PLoS One* 11, (2016).
41. Kickingeder, P. *et al.* Primary Central Nervous System Lymphoma and Atypical Glioblastoma: Multiparametric Differentiation by Using Diffusion-, Perfusion-, and Susceptibility-weighted MR Imaging. *Radiology* 272, 843–850 (2014).
42. Weller, M. *et al.* EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol* 15, e395–e403 (2014).

43. Pérez-Larraya, J. G. *et al.* Temozolomide in elderly patients with newly diagnosed glioblastoma and poor performance status: An ANOCEF phase II trial. *Journal of Clinical Oncology* 29, 3050–3055 (2011).
44. Rocha Pinheiro, S. L. *et al.* Immunotherapy in glioblastoma treatment: Current state and future prospects. *World J Clin Oncol* 14, 138–159 (2023).
45. Kelly, P *et al.* Stereotactic Histologic Correlations of Computed Tomography- and Magnetic Resonance Imaging-Defined Abnormalities in Patients with Glial Neoplasms. *Mayo Clin Proc* 62, 450–459 (1987).
46. Bush, N. A. O., Chang, S. M. & Berger, M. S. Current and future strategies for treatment of glioma. *Neurosurg Rev* 40, 1–14 (2017).
47. Brindle, K. M., Izquierdo-García, J. L., Lewis, D. Y., Mair, R. J. & Wright, A. J. Journal of clinical oncology Brain Tumor Imaging. *J Clin Oncol* 35, 2432–2438 (2017).
48. Berntsen, E. M. *et al.* Functional Magnetic Resonance Imaging and Diffusion Tensor Tractography Incorporated into an Intraoperative 3-Dimensional Ultrasound-Based Neuronavigation System: Impact on Therapeutic Strategies, Extent of Resection, and Clinical Outcome. *Neurosurgery* 67, (2010).
49. Abhinav, K., Yeh, F. C., Mansouri, A., Zadeh, G. & Fernandez-Miranda, J. C. High-definition fiber tractography for the evaluation of perilesional white matter tracts in high-grade glioma surgery. *Neuro-Oncology* vol. 17 1199–1209 (2015).
50. Eigenbrod, S. *et al.* Molecular stereotactic biopsy technique improves diagnostic accuracy and enables personalized treatment strategies in glioma patients. *Acta Neurochir (Wien)* 156, 1427–1440 (2014).
51. Ringel, F. *et al.* Clinical benefit from resection of recurrent glioblastomas: Results of a multicenter study including 503 patients with recurrent glioblastomas undergoing surgical resection. *Neuro Oncol* 18, 96–104 (2016).
52. Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 352, 987–996 (2005).

53. Cabrera, A. R. *et al.* Radiation therapy for glioblastoma: Executive summary of an American Society for Radiation Oncology Evidence-Based Clinical Practice Guideline. *Pract Radiat Oncol* 6, 217–225 (2016).
54. Malmström, A. *et al.* Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13, 916–926 (2012).
55. Cabrera, A. R. *et al.* Concurrent Stereotactic Radiosurgery and Bevacizumab in Recurrent Malignant Gliomas: A Prospective Trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 86, 873–879 (2013).
56. Gutin, P. H. *et al.* Safety and Efficacy of Bevacizumab with Hypofractionated Stereotactic Irradiation for Recurrent Malignant Gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 75, 156–163 (2009).
57. Wesolowski, J. R., Rajdev, P. & Mukherji, S. K. Temozolomide (Temodar). *American Journal of Neuroradiology* 31, 1383–1384 (2010).
58. Perry, J. R. *et al.* Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 376, 1027–1037 (2017).
59. Hegi, M. E. *et al.* MGMT Gene Silencing and Benefit from Temozolomide in Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 352, 997–1003 (2005).
60. FUKAI, J. *et al.* Rapid regression of glioblastoma following carmustine wafer implantation: A case report. *Mol Clin Oncol* 5, 153–157 (2016).
61. Brem, H. *et al.* Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. *The Lancet* 345, 1008–1012 (1995).
62. Gutenberg, A. *et al.* The combination of carmustine wafers and temozolomide for the treatment of malignant gliomas. A comprehensive review of the rationale and clinical experience. *J Neurooncol* 113, 163–174 (2013).

63. Diaz, R. J. *et al.* The role of bevacizumab in the treatment of glioblastoma. *J Neurooncol* 133, 455–467 (2017).
64. Pless, M. & Weinberg, U. Tumor treating fields: concept, evidence and future. *Expert Opin Investig Drugs* 20, 1099–1106 (2011).
65. Burri, S. H., Gondi, V., Brown, P. D. & Mehta, M. P. The Evolving Role of Tumor Treating Fields in Managing Glioblastoma: Guide for Oncologists. *Am J Clin Oncol* 41, (2018).
66. Hottinger, A. F., Pacheco, P. & Stupp, R. Tumor treating fields: a novel treatment modality and its use in brain tumors. *Neuro Oncol* 18, 1338–1349 (2016).
67. Stupp, R. *et al.* Maintenance Therapy with Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 314, 2535–2543 (2015).
68. Sener, U., Ruff, M. W. & Campian, J. L. Immunotherapy in Glioblastoma: Current Approaches and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 23 (2022).
69. Chowdhury, S. *et al.* Current Advances in Immunotherapy for Glioblastoma Multiforme and Future Prospects. *Cureus* (2021).
70. Lu, D. & Gao, Y. Immune checkpoint inhibitor-related endocrinopathies. *J Transl Int Med* 10, 9–14 (2022).
71. Alok, A., Seok, K. & Wesolow, J. A Case of abdominal pain and diarrhea post immunotherapy: Hypophysitis associated with immune checkpoint inhibitors. 10, 178–180 (2022).
72. Bradley, S. *et al.* I could lose everything: understanding the cost of a brain tumor. *J Neurooncol* 85, 329–338 (2007).
73. Pace, A. *et al.* European Association for Neuro-Oncology (EANO) guidelines for palliative care in adults with glioma. *Lancet Oncol* 18, e330–e340 (2017).
74. Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma.

75. Addeo, R. *et al.* A new schedule of fotemustine in temozolomide-pretreated patients with relapsing glioblastoma. *J Neurooncol* 102, 417–424 (2011).
76. Stupp, R. *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10, 459–466 (2009).
77. Barresi, V. *et al.* Ultra-mutation in IDH wild-type glioblastomas of patients younger than 55 years is associated with defective mismatch repair, microsatellite instability, and giant cell enrichment. *Cancers (Basel)* 11, (2019).