



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

**Analisi retrospettiva delle caratteristiche istologiche,
immunoistochimiche e molecolari nei meningiomi di grado I recidivati
post-resezione completa**

Relatore:

Chiar.mo Prof. Renzo Luciano BOLDORINI

Candidato:

Stefano BOTTINI

Matricola 20031530

Anno Accademico 2023/2024

INDICE

I.	Introduzione	1
	<i>a. Epidemiologia</i>	<i>1</i>
	<i>b. Classificazione WHO</i>	<i>2</i>
	<i>c. Profili di metilazione</i>	<i>4</i>
	<i>d. Analisi genomica</i>	<i>4</i>
	<i>e. Fattori di rischio</i>	<i>9</i>
	<i>f. Clinica</i>	<i>11</i>
	<i>g. Diagnostica</i>	<i>13</i>
	<i>h. Approcci terapeutici</i>	<i>18</i>
	<i>i. Prognosi</i>	<i>24</i>
	<i>j. Metastasi</i>	<i>26</i>
II.	Obiettivo dello studio	27
III.	Materiali e metodi	28
	<i>a. Casistica</i>	<i>28</i>
	<i>b. Rivalutazione istologica</i>	<i>29</i>
	<i>c. Immunoistochimica</i>	<i>30</i>
	<i>d. Estrazione del DNA</i>	<i>33</i>
	<i>e. Quantificazione del DNA</i>	<i>35</i>
	<i>f. PCR e purificazione del prodotto PCR</i>	<i>35</i>
	<i>g. Sequenziamento Sanger</i>	<i>37</i>
	<i>h. Elettroforesi capillare</i>	<i>38</i>

IV. Risultati	39
<i>a. Analisi delle caratteristiche cliniche e patologiche</i>	39
<i>b. Analisi dei dati istologici</i>	43
<i>c. Analisi dei dati immunoistochimici</i>	46
<i>d. Analisi dei dati molecolari</i>	57
V. Discussione	59
VI. Conclusioni	61
VII. Bibliografia	62

I. INTRODUZIONE

a. Epidemiologia

I meningiomi sono i tumori primitivi del sistema nervoso centrale più comuni, solitamente benigni, a crescita lenta e di derivazione dalle cellule dell'aracnoide. Nello specifico rappresentano il 37,6% di tutti i tumori del SNC e il 53,3% dei soli tumori benigni.

L'età media in cui avviene la diagnosi di meningioma è 66 anni, con un aumento dell'incidenza correlato all'aumento dell'età (18,69/100.000 in soggetti over 40 contro 0,16/100.000 in soggetti di età compresa tra 0 e 19 anni).

I meningiomi, sia benigni che maligni, sono più comuni nel sesso femminile con un rapporto 2,32:1 nel caso di lesioni benigne, e di 1,12:1 nel caso dei meningiomi maligni. Questo è vero solo in soggetti maggiori di 19 anni, in età pediatrica e adolescenziale, invece, l'incidenza è simile nei due sessi.^{1,2}

Nei pazienti pediatrici i meningiomi riscontrati sono tipicamente di grado più alto, con un maggior rischio di recidive, ma associati a una diminuzione nella mortalità.^{1,3,4}

Secondo il CBTRUS (Central Brain Tumor Registry of the United States), nel periodo 2012-2016, l'80% dei meningiomi è stato classificato secondo il grading WHO. Di questi, l'80,5% è risultato essere di grado I, quindi benigni, il 17,7% è risultato essere un grado II e l'1,7% un grado III.²

Un grado II o III evidenzia un comportamento maligno della neoplasia, caratterizzato da una mortalità maggiore e un aumentato rischio di recidive.⁵

Secondo i dati dal 2004 al 2014 del CBTRUS si ha una sopravvivenza a 5 anni del 88,3% nei meningiomi non maligni, che scende al 66,5% in meningiomi con comportamenti maligni (grado II o III).⁶

b. Classificazione WHO

Il grading istopatologico dei meningiomi è un importante fattore prognostico e svolge un importante ruolo nell'approccio terapeutico e nell'organizzazione del follow-up.^{7,8}

I meningiomi sono suddivisi secondo la classificazione del World Health Organization (edizione 2021) in 3 gradi.

I criteri che differenziano i gradi sono istopatologici, cioè quindi basati solo sulla presentazione istologica, indipendentemente dal sottotipo della neoformazione.⁷

La classificazione istologica dei meningiomi proposta nel 2016 è la seguente:^{9,10}

Grading	Caratteristiche
<i>WHO I</i>	<ul style="list-style-type: none">• Assenza di invasione cerebrale• Indice mitotico < 4 mitosi/10 HPF
<i>WHO II o atipico</i>	<ul style="list-style-type: none">• Presenza di invasione cerebrale o• Indice mitotico compreso tra 4 e 19 mitosi /10 HPF o• Almeno tre tra le seguenti caratteristiche istologiche: foci di necrosi spontanea, crescita sheet-like, nucleoli prominenti, alta cellularità, piccole cellule con un alto rapporto nucleo-citoplasma
<i>WHO III o anaplastico</i>	<ul style="list-style-type: none">• Indice mitotico > 20 mitosi/10 HPF o• Istologia rabdoide o papillare

Nel 2016 riconosciuti 15 sottotipi di meningioma, ciascuno dei quali varia per presentazione istopatologica e carico mutazionale. Il riconoscimento di uno di questi pattern definiva il grading della lesione.⁷

In particolare le varianti meningoteliale, fibroso, transizionale, psammomatoso, angiomaso, microcistico, secretorio e lymphoplasmacyte-rich erano classificati come grado I; le varianti atipico, cordoide e a cellule chiare come grado II, le varianti rabdoide e papillare come grado III.^{7,11}

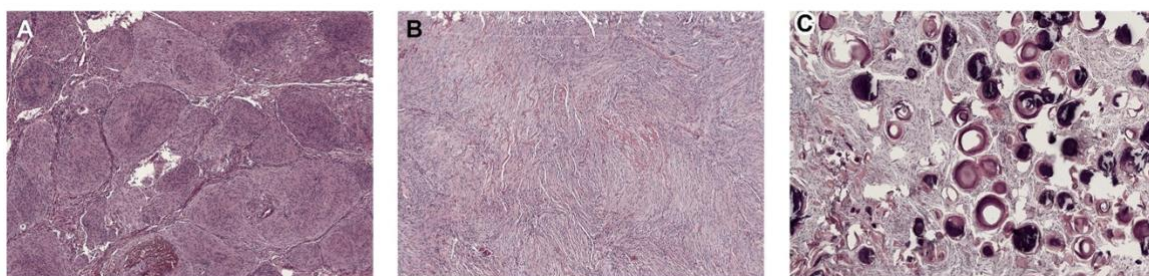


Fig.1: Alcuni pattern istologici dei meningiomi di grado I. A, Meningioma meningoteliale che mostra vortici di cellule meningoteliali con citoplasma eosinofilo simile a sincizio. B, Meningioma fibroso composto da cellule fusate allungate con fasci di collagene intercalati. C, Meningioma psammomatoso che mostra abbondanti corpi psammomatosi con cellule tumorali intercalate.¹²

Ciò cambia nella classificazione del 2021, dalla quale i criteri per definire una lesione di grado più alto devono essere ricercati e confermati indipendentemente dalla variante istologica.⁷

Inoltre, aumenta l'importanza delle indagini molecolari, in particolar modo, per poter definire dei meningiomi come di grado III, sono stati aggiunti, come ulteriore criterio diagnostico, il riscontro della mutazione del promotore TERT o della delezione in omozigosi di CDKN2A e CDKN2B.¹¹

Da questa classificazione si evince che la definizione di malignità per queste lesioni si basa su criteri soggettivi, come l'invasione del tessuto cerebrale e le caratteristiche istopatologiche, ciò definisce questo sistema come subottimale e soggetto a variabilità inter-osservazionale, con una concordanza del 87,2%.^{7,13}

Nella classificazione WHO 2021, sono, inoltre, approvati markers biomolecolari, che, però, non sono necessari alla diagnosi, se la lesione presenta un pattern istopatologico definitivo.^{7,11}

c. Profili di metilazione

Tuttavia, anche successivamente all'introduzione della nuova classificazione del 2021, permangono delle criticità e discordanze. Infatti, la classificazione istologica dei meningiomi non è la classificazione migliore dal punto di vista prognostico-predittivo. Attraverso l'analisi del carico mutazionale e soprattutto del profilo di metilazione di queste lesioni si può avere una miglior stratificazione del rischio e una miglior definizione prognostica. Sono stati descritti 6 gruppi di metilazione che dividono le lesioni in lesioni benigne (MC-benign, 3 classi), intermedie (MC-intermediate, 2 classe) e maligne (MC-malignant, 1 classe).¹⁴

Questa classificazione si è dimostrata migliore rispetto alla WHO nel contesto di stratificazione delle lesioni in termini di Free Progression Survival, in particolare si è notato che delle lesioni classificate come un grado I istologico, ma con un profilo di metilazione MC-intermediate presentano una prognosi peggiore rispetto a lesioni classificate solo come grado I istologico, simile invece a meningiomi di grado II. Allo stesso modo, una lesione di grado II istologico con un profilo MC-benign hanno una prognosi migliore di meningiomi descritti solo come grado II istologico.⁹

d. Analisi genomica

Attraverso studi di sequenziamento genomico (WGS), di trascrittomico, di sequenziamento dell'esone (WES), studi di metilazione si è arrivati alla definizione di un profilo mutazionale dei meningiomi con la conseguente identificazione di possibili target terapeutici.^{9,15}

1. NF2

La mutazione del gene NF2 (a causa di una delezione sul cromosoma 22, braccio lungo, locus 12), codificante per la proteina Merlin (componente del citoscheletro, implicata in processi di adesione intercellulare, migrazione e proliferazione cellulare) è una alterazione che si riscontra in circa il 50% dei casi di meningioma, per cui identifica due macrogruppi: meningiomi NF2 wild type e meningiomi NF2 mutati.^{16,17}

NF2 è un gene oncosoppressore e una mutazione a questo livello correla con lo sviluppo di meningiomi che prevalentemente si manifestano con sottotipo fibroblastico o

transizionale^{9,18} con particolare instabilità genomica e multiple localizzazione a livello emisferico.^{9,19}

2. Mutazioni sulla via Hedgehog (SMO, AKT1, SUFU)

SMO è un recettore transmembrana, la cui mutazione porta ad una attivazione costitutiva della via Hedgehog e PI3K-AKT-mTOR. AKT1 è una proteina chinasi, anch'essa coinvolta nei pathways di PI3K e mTOR. Mutazioni a livello dei geni di queste due proteine porta alla genesi di meningiomi a bassa instabilità genomica, localizzati principalmente a livello della base del cranio,^{9,17} specialmente a livello del solco olfattivo.²⁰

La mutazione più frequente sul gene codificante per SMO è la sostituzione missenso p.Trp535Leu, mentre sul gene AKT1 è lo sostituzione p.Glu17Lys.¹⁷

Le mutazioni di AKT1 sul codone 17 (come la p.Glu17Lys) sono associate alla genesi di meningiomi di grado I, sottotipo meningoteliale, ad un maggior rischio di ricorrenza.⁹

In ultimo, ci possono essere mutazioni su SUFU e PTCH1. Anch'esse portano alla attivazione costitutiva della via SHH e sono presenti nell'1% dei meningiomi sporadici.⁹

Inoltre, alterazioni di SUFU e PTCH1 si ritrovano in meningiomi intracranici che insorgono in un contesto di sindrome di Gorlin-Goltz.^{9,21}

3. Mutazioni sulla via PI3K (TRAF7, KLF4, PIK3CA)

Il gene TRAF7 è coinvolto nella via di segnalazione delle MAPK e JNK, pathways che favoriscono la crescita e la differenziazione cellulare, oltre che alla regolazione dei processi apoptotici. Una mutazione a questo livello si ritrova nel 25% dei casi di meningiomi di grado I e II. La maggior parte delle mutazioni coinvolge il dominio WD40.^{9,19,22}

Le mutazioni di TRAF7 possono essere associate a mutazioni di KLF4, PIK3CA e AKT1 ma sono mutualmente esclusive con mutazioni NF2 e SMO.²³

Le mutazioni di KLF4 portano a una over-regolazione della via HIF-1a. Nella maggior parte dei casi si tratta di mutazione missenso K409Q.⁹

Le mutazioni di TRAF7 e KLF4 sono associate alla genesi di meningiomi di sottotipo secretorio, sottotipo caratterizzato da una maggior aggressività, a causa dell'edema cerebrale ad essi associato.²⁴

4. Mutazioni su POLR2A

Le mutazioni su due hotspot del gene della subunità A della polimerasi II (p.Gln403Lys o p.Leu438-His439) si associano a meningiomi con sottotipo meningoteliale che si sviluppano, principalmente, a livello del tubercolo della sella.^{9,25}

5. Mutazioni più rare, associate a meningiomi di alto grado

Questo gruppo di mutazioni è comunemente associato a meningiomi di grado istologico III.

In particolar modo in meningiomi che si presentano con sottotipo rabdoide è stata frequentemente riscontrata l'inattivazione di BAP1.^{9,26} Questa inattivazione si manifesta con la formazione di una proteina tronca, che non è quindi più riscontrabile con indagini immunoistochimiche.^{26,27}

Il gene BAP1 codifica per una proteina a localizzazione nucleare espressa in vari tessuti dell'organismo, con funzione oncosoppressoria, intervenendo a livello di regolazione del ciclo cellulare e riparazione del danno al DNA, oltre che in processi di differenziazione cellulare.²⁸

Nei meningiomi che si presentano con sottotipo papillare è stata descritta una inattivazione biallelica di PBRM, con possibilità di overlap con mutazioni su BAP1.^{9,29}

In meningiomi atipici, il ritrovamento di una up-regulation di EZH2 si associa a maggior aggressività e alto grado istologico, e, se associato a una negatività alla ricerca della trimetilazione dell'istone 3, una minor progression free survival (PFS).³⁰

Una delezione sul gene DMD (Duchenne Muscular Dystrophy), che normalmente regola la sintesi della distrofina, è stata ritrovata in alcuni casi di meningioma e si associa a una prognosi peggiore.³¹

Mutazioni su KDM5C, KDM6A e SMARCB1 possono portare a mutazioni epigenetiche che caratterizzano il 10% dei meningiomi NF2 wild-type.⁹

Una mutazione a livello di MLL/KMT2 è stata identificata in meningiomi di grado II con sottotipo cordoide. È una mutazione associata a NF2 ed è caratterizzato da prognosi negativa.³²

6. pTERT

In meningiomi atipici/anaplastici recidivanti (ossia delle lesioni che sono originariamente insorte senza caratteri di malignità, caratteri che sono stati assunti solo secondariamente a processi di accumulo mutazionale), sono state trovate delle mutazioni a livello del promotore della telomerasi inversa, pTERT (5p15.33).³³ Questa mutazione che porta ad un mancato accorciamento dei telomeri e, conseguentemente, a una immortalizzazione della cellula, grazie alla formazione di nuovi siti di legame per i fattori di trascrizione ETS/TCF.³⁴

La presenza di una mutazione su pTERT ha sia una valenza diagnostica che prognostica. Dalla nuova classificazione dei tumori del SNC del WHO 2021, infatti, il riscontro di una mutazione a questo livello permette di classificare la lesione come un grado III.¹¹ Dal punto di vista prognostico, vari studi hanno evidenziato come questa mutazione si associa a una prognosi peggiore e una più breve overall survival, indipendentemente dal grado istologico.

Inoltre, è presente una relazione tra la presenza della mutazione e una recidiva di malattia più precoce.³⁵⁻³⁷

Oltre alle mutazioni a livello del promotore di TERT, il tumore può sfruttare dei meccanismi differenti, telomerasi-indipendenti, al fine di avere un allungamento dei telomeri, e quindi immortalizzarsi. Questi meccanismi sono chiamati Alternative Length Telomerase (ALT) e coinvolgono mutazioni inattivanti a livello dei geni di ATRX o DAXX. ATRX è una proteina coinvolta nei processi di regolazione della cromatina, una delezione a livello genico porta allo sviluppo di proteine tronche/inattive.³⁷

Sebbene i meccanismi ALT siano comuni in molti tipi di cancro (gliomi, astrocitomi, osteosarcomi e tumori neuroendocrini del pancreas), nei meningiomi sono stati poco osservati.³⁸

7. CDKN2A/B

L'inibitore 2A/B della chinasi ciclino dipendente svolge un importante ruolo nella regolazione del ciclo cellulare, con un ruolo da oncosoppressore. Della alterazioni a questo livello sono state ritrovate nei meningiomi, e in particolar modo in quelle lesioni che hanno subito una progressione dal grado II al grado III.⁹

Perdita di omozigosi e mutazioni somatiche (p.Ala148Thr) a questo livello sono state riconosciute in meningiomi anaplastici.³⁹

Queste mutazioni, inoltre, sono altamente correlate con rischio di recidiva e un indice di proliferazione (ki67) maggiore del 7%.⁴⁰

8. Loss of H3K27me3

La perdita della tripla metilazione a livello della lisina 27 nell'istone 3 si ritrova in vari tipi di cancro, tra cui mammella, prostata, colon, ovaie, e meningiomi. Ha un valore prognostico negativo (con una ridotta overall survival) e si associa a un maggior rischio di recidiva, in particolar modo per i meningiomi di grado I o II (Anche nei meningiomi di grado III, si può osservare la perdita della trimetilazione, ma in tali casi, tale evento non si traduce in una suddivisione differenziata basata su una diversa aggressività della lesione).^{41,42}

9. Copy Number Alterations (CNA)

Aberrazioni al livello cromosomico sono associate a un maggior rischio di recidiva (specialmente in meningiomi atipici) e quindi può rappresentare un marker di supporto nello scegliere di intraprendere una radioterapia adiuvante.^{9,23}

Le alterazioni più frequenti sono la delezione del 22q, 1p, 6q, 14q, 18, perdita di 9p che sono associate a meningiomi di più alto grado.⁴³

In lesioni recidivanti, CNAs sono presenti nel 75% dei casi a livello della lesioni primaria, suggerendo che, quindi, possano svolgere un ruolo chiave nella formazione della neoplasia.⁹

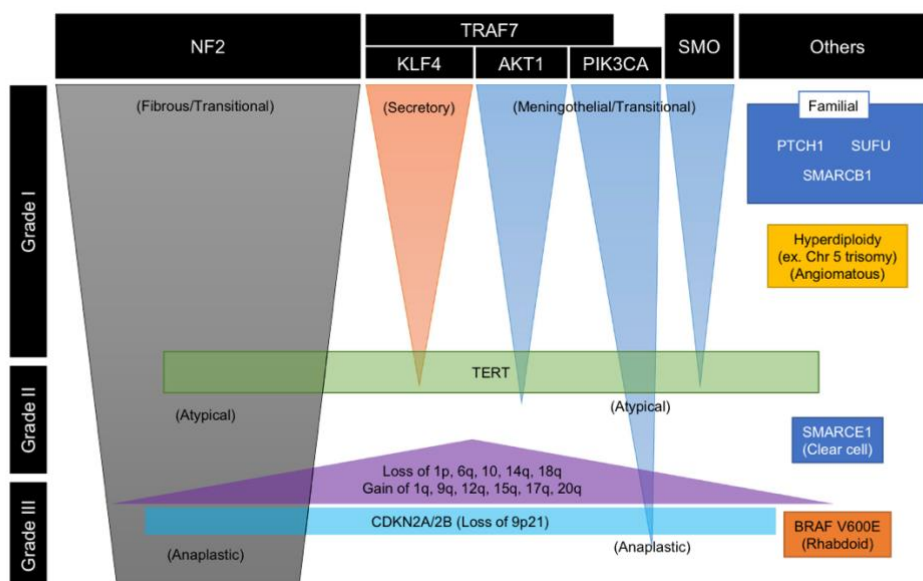


Fig.2: Schema riassuntivo con la maggior parte delle mutazioni coinvolte nella genesi dei meningiomi e i relativi pattern istologici associati.⁴⁴

e. Fattori di rischio

I fattori di rischio riconosciuti nello sviluppo dei meningiomi sono l'esposizione a radiazioni ionizzanti, l'obesità, esposizione professionale a erbicidi, e, inoltre, anche la stimolazione ormonale ricopre un ruolo nello sviluppo dei meningiomi.¹

1. Radiazioni ionizzanti

I meningiomi sono le neoplasie cerebrali maggiormente associate all'esposizione a radiazioni ionizzanti.⁴⁵

La presentazione clinica tipica di un paziente con meningiomi indotti da radiazioni è caratterizzata dall'aver meningiomi multipli con una percentuale maggiore di tessuto atipico e/o anaplastico e un aumentato rischio di recidiva.

Il rischio di sviluppare meningiomi è direttamente proporzionale alla dose di radiazioni che irradia il cranio. Anche dosi basse (1- 2,6 Gray) aumentano il rischio di sviluppare la neoplasia (specificamente, il rischio relativo della popolazione è 9,5), dosi invece maggiori di 2,6 Gray sono associate a un rischio relativo di 18,82. In aggiunta, più alta è la dose a cui si è esposti, minore è il tempo di latenza prima dello sviluppo della neoplasia.^{1,46}

2. Obesità

Non sono stati ancora riscontrati delle alterazioni a specifiche pathways legate ai meningiomi insorti in un contesto di obesità; tuttavia, è riscontrata un'associazione tra il BMI, la percentuale di grasso corporeo e lo sviluppo dei meningiomi. Il rischio relativo, infatti, aumenta di 1,19 per ogni aumento di 5 kg/m² di BMI.⁴⁷

I possibili meccanismi coinvolti in questo processo riguardano lo stato infiammatorio cronico che caratterizza l'obesità, insieme all'aumento del segnale delle adipochine e l'aumento dell'attività della via di segnalazione dell'insulina e dell'IGF1 con conseguente inibizione dell'apoptosi e stimolazione della crescita tumorale.⁴⁸

3. Ormoni

Il ruolo degli ormoni è stato sospettato di essere coinvolto nella genesi dei meningiomi in quanto essi sono lesioni più frequenti nelle donne e con caratteristiche immunoistochimiche che portano ad immaginare un ruolo ormonale nello sviluppo.

Queste caratteristiche sono la presenza del recettore della somatostatina (in quasi il 100% dei casi), del recettore per il progesterone nell'88% dei casi, del recettore per estrogeni e androgeni entrambi nel 40% dei casi.⁴⁹

Attraverso multipli studi e metanalisi si è giunti alla conclusione che la terapia ormonale sostitutiva (HRT) si associa a un rischio maggiorato di sviluppare dei meningiomi, mentre non è stata riscontrata alcuna associazione con l'uso di contraccettivi orali, età del menarca, età della menopausa e età del primo figlio.^{50,51}

Tuttavia, la terapia ormonale con inibizione dello stimolo estrogenico non ha dato risultati clinici migliori rispetto alla terapia convenzionale.^{1,52}

4. Altro

Gli ultimi due fattori di rischio associati allo sviluppo di meningioma sono: l'esposizione professionale a erbicidi e la carenza di IgE.¹

Nel primo caso, donne esposte cronicamente all'uso di erbicidi hanno mostrato un aumentato rischio (Odds ratio = 2,4) di sviluppare meningiomi, rischio che aumenta con l'aumentare del tempo di esposizione alla sostanza.⁵³

Le IgE invece svolgono un ruolo protettivo, di conseguenza una carenza di queste comporta un aumentato rischio di sviluppare meningiomi.⁵⁴

5. Familiarità

Come evidenziato dall'analisi genomica, i meningiomi sono caratterizzati da peculiari mutazioni, che nella maggior parte dei casi sono sporadiche; tuttavia, si riconoscono anche dei casi di sindromi familiari che predispongono allo sviluppo delle neoformazioni.

La neurofibromatosi 2, caratterizzata da mutazioni su gene NF2 (cromosoma 22q12.2), è una sindrome familiare con trasmissione autosomica dominante, e porta allo sviluppo di meningiomi multipli, schwannomi vestibolari e gliomi.^{55,56}

Altre sindromi familiari in cui si può trovare la presenza di meningiomi sono la Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1) e la sindrome di Gorlin, anche se i casi riscontrati in questo contesto non sono molti; infatti, solo l'8% di pazienti affetti da MEN1 sviluppa un meningioma.^{21,57}

f. Clinica

I meningiomi sono lesioni a crescita lenta, non infiltrante per cui i sintomi di esordio spesso sono insidiosi.⁵⁸

In molti casi la presentazione clinica dei meningiomi è con sintomi aspecifici, tuttavia a causa della crescita espansiva e compressiva (sia sul tessuto cerebrale che sulla componente vascolare), possono manifestarsi dei sintomi più specifici, correlati alla localizzazione della lesione.^{1,59}

I sintomi più frequenti sono: mal di testa (33,3–36,7%), deficit focale di nervi cranici, a seconda della localizzazione della lesione (28,8–31,3%), crisi epilettica (16,9–24,6%), cambiamenti cognitivi (14,4%), debolezza (11,1%), vertigini/capogiri (9,8%), atassia o variazione nella deambulazione (6,3%), dolore e deficit sensoriali (5,6%), esoftalmo (2,1%), sincope (1,0%). Può anche decorre come asintomatico nel 9,4% dei casi.¹

I meningiomi che si sviluppano a livello della base cranica si presentano più spesso con deficit neurologici, mentre quelli emisferici sono maggiormente correlati a epilessie.⁶⁰

L'epilessia è anche il più frequente disturbo riscontrato a seguito di neurochirurgia.⁶¹

Se un meningioma si sviluppa a livello della fossa cranica anteriore (coinvolgendo la falce anteriore, il solco olfattivo o a livello orbito-frontale) i sintomi con cui si può manifestare coinvolgono una compromissione della vista, emicrania, anosmia, crisi epilettiche (solo nel 20% dei casi) e sintomi psicomotori con disturbi comportamentali e della personalità con apatia e demenza, a causa del coinvolgimento del lobo frontale (sintomi che possono portare a una errata diagnosi di demenza o depressione).⁶²

I meningiomi parasagittali sono delle lesioni che possono decorrere come asintomatiche fino a che non raggiungono grosse dimensioni. Dal momento che diventano sintomatiche si manifestano come emicrania e crisi epilettiche con marce Jacksoniane e coinvolgimento degli arti inferiori. Se si sviluppano nella porzione anteriore possono anche dare papilledema ed emianopsia omolaterale.⁶²

I meningiomi che si sviluppano a livello del tubercolo della sella si presentano con perdita della vista nel lato della lesione e difetti scotomici nell'occhio controlaterale.⁶²

I grandi meningiomi olfattivi poi possono presentare una peculiare, sebbene rara, sindrome clinica, la sindrome di Foster-Kennedy. Questa si presenta con atrofia ottico omolaterale, scotoma centrale nell'occhio omolaterale, papilledema nell'occhio controlaterale e anosmia.⁶³

I meningiomi in sede soprasellare spesso si presentano semplicemente con delle anomalie ormonali.⁶²

Lesioni che si sviluppano lateralmente alle ali dello sfenoide si manifestano inizialmente con esoftalmo unilaterale indolore, che evolve poi in cecità omolaterale alla lesione.⁶²

I meningiomi con sede nel lobo temporale si caratterizzano clinicamente con crisi epilettiche.⁶²

I meningiomi che insorgono a livello petroclivale si presentano con atassia e neuropatie dei nervi cranici, in particolar modo si manifesta come compressione del nervo trigemino.⁶⁴

Meningiomi clinoidi (insorgono in base cranica, nelle vicinanze del seno cavernoso) danno sintomi visivi variegati, con paralisi dei nervi cranici ed esoftalmo.⁶²

I meningiomi che insorgono nella fossa cranica posteriore possono portare allo sviluppo di idrocefalo ostruttivo, papilledema e emicrania mattutina.¹

I meningiomi peritorculari sono localizzati nella regione intorno al seno cavernoso, alla base del cranio, vicino alla sella turcica e alle strutture del nervo ottico. I sintomi sono dati principalmente dalla compressione del lobo occipitale o del cervelletto e si caratterizzano da emicrania occipitale, papilledema e deficit visivi omolaterali, atassia, dismetria e nistagmo.⁶²

I meningiomi possono insorgere anche a livello del midollo spinale. Il sito più comune è a livello della colonna toracica, seguito da neoplasie a livello cervicale e alla giunzione cranio-cervicale. Meningiomi che insorgono a livello toracico si presentano con lenta ma progressiva paresi spastica con o senza dolore radicolare o notturno. A livello cervicale invece portano allo sviluppo di quadri di tetraparesi con o senza segni di coinvolgimento del basso bulbo.⁶⁵

Meningiomi possono anche dare sintomi generali come iperostosi, specie se le neoplasie insorgono a contatto con il tessuto osseo. Questo porta alla genesi di sporgenze ossee con dolore localizzato. L'iperostosi è segno di invasione del tessuto osseo.⁶²

I meningiomi possono dare anche sanguinamenti spontanei. Sono eventi rari, ma più comuni nei pazienti con meno di 30 anni o oltre i 70 anni. I sanguinamenti spontanei hanno un tasso di mortalità complessivo del 21%, che sale al 75% se il paziente con sanguinamento spontaneo non riprende conoscenza prima della riparazione chirurgica.^{62,66}

Pazienti over 70 anni si presentano più frequentemente con deficit sensitivo-motori e deterioramenti cognitivi.¹

g. Diagnostica

1. Tecniche di imaging

L'indagine imaging di primo livello nel percorso diagnostico del meningioma è la Risonanza Magnetica Nucleare (RMN), o, nei casi in cui questa sia controindicata per il paziente, si utilizza la Tomografia Computerizzata (TC).⁶⁷

Il secondo livello, invece, sfrutta la Tomografia ad Emissione di Positroni (PET), usando ligandi del recettore della somatostatina (come il ⁶⁸Ga-DOTATOC o il ⁶⁸Ga-DOTATATE), sfruttando quindi l'importante espressione del recettore della somatostatina, presente nei meningiomi. Questa indagine permette una miglior differenziazione tra il tessuto sano e il tessuto neoplastico.⁶⁸

Alla RMN il meningioma appare come una massa con la tendenza a spiazzare il parenchima cerebrale, e, rispetto a quest'ultimo, appare come ipo-isointenso in T1 e iperintenso in T2. Inoltre, dopo la somministrazione di mezzo di contrasto (gadolinio), la lesione presenta un intenso enhancement post-contrastografico.⁶⁹

Il segno della "dural tail", un segno radiologico post-contrastografico con enhancement durale adiacente al punto di impianto del meningioma nella leptomeninge, può essere visibile nel 72% dei casi e aiuta nella diagnosi differenziale con altri tumori extra-assiali quali schwannomi o adenomi ipofisari.⁶⁹

All'imaging il meningioma si può presentare anche come una lesione eterogenea con cisti intratumorali, emorragie e necrosi. Questa presentazione si associa a un grado di aggressività maggiore.⁶⁹

Alla TC, il meningioma appare solitamente come una lesione circoscritta e lobulare isodensa rispetto al parenchima cerebrale, o in alcuni rari casi iperdensa o leggermente ipodensa.⁶⁷

Presentano un enhancement omogeneo in seguito alla somministrazione di mezzo di contrasto iodato.⁶⁹

La TC, infine, ha una sensibilità maggiore rispetto alla RMN nel discriminare calcificazioni intratumorali, iperostosi e coinvolgimento osseo.

Oltre a indagini imaging, nel processo di diagnosi differenziale delle lesioni neoplastiche extraassiali rientra lo studio istologico della neoformazione. Ci sono infatti varie altre lesioni che mimano il comportamento clinico e radiologico dei meningiomi per cui solo un'indagine microscopica può dare la certezza della diagnosi. Queste lesioni sono principalmente lesioni metastatiche, altri processi neoplastici primitivi, malattie

granulomatose e infezioni. Tra queste le lesioni più comuni sono l'emangiopericitoma (o tumore fibroso solitario), schwannomi e metastasi.^{70,71}

Anche se spesso assenti o di modesta entità, i segni istologici che si possono ritrovare nei meningiomi sono: corpi psammomatosi, pseudoinclusioni intranucleari o citoplasmatiche, vortici patognomonic.⁷²

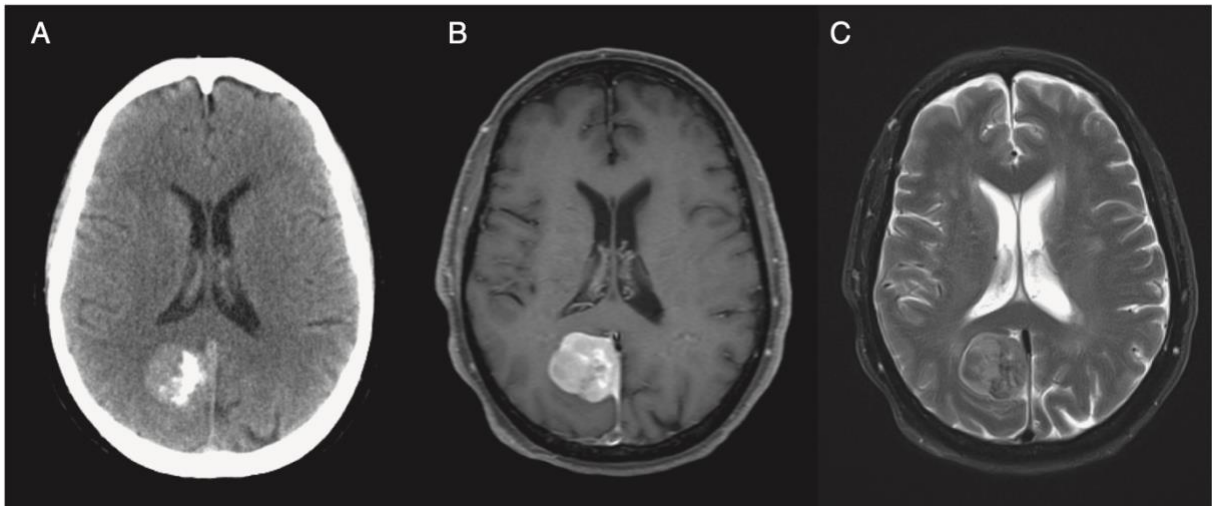


Fig.3: A: TC senza mezzo di contrasto; B: sequenza T1-pesata della RM con somministrazione di gadolinio; C: sequenza T2-pesata della RM.⁶⁹

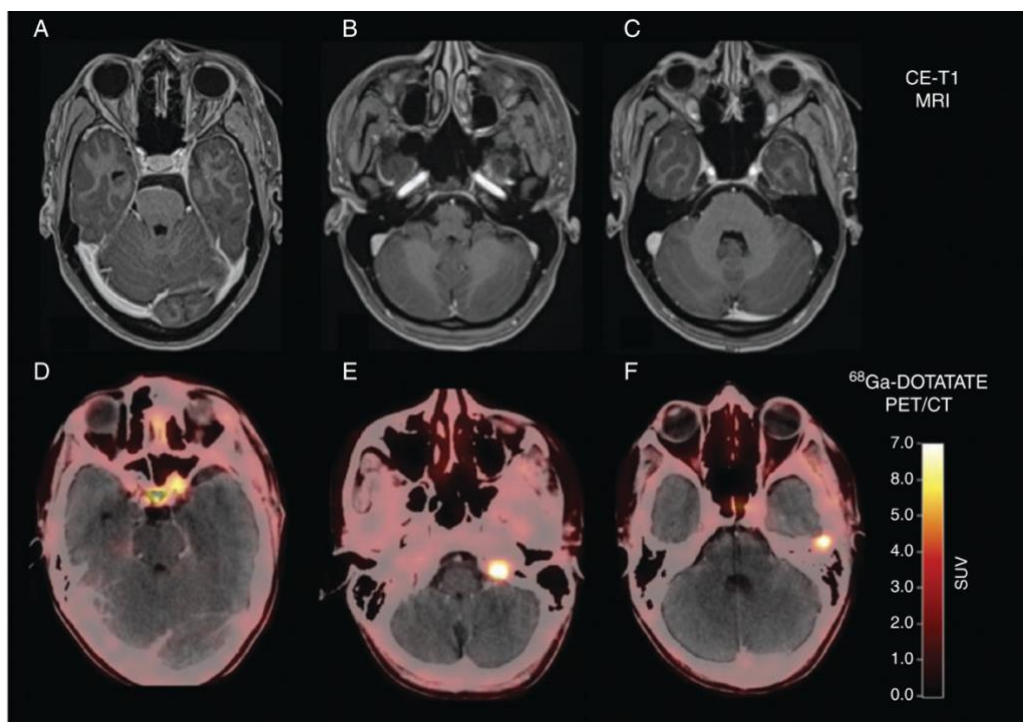


Fig.4: Immagini post-operatorie eseguite con RMN (A, B e C) e con PET con somministrazione di DOTATATE. Le immagini PET mostrano residuo di malattia.⁷³

2. Diagnosi differenziale

Spesso per definire una neoplasia extra-assiale come meningioma può bastare uno studio microscopico con colorazione EE (Ematossilina-Eosina), ci sono però alcuni casi che possono mostrare delle caratteristiche simili ad altre neoplasie intracraniche.

L'immunohistochimica entra quindi in gioco nella definizione di meningioma. Questi esprimono EMA e vimentina, per cui una positività a questi marker indirizza la diagnosi.⁷⁴

Anche EMA ha dei limiti, in quanto in alcuni sottotipi di meningiomi, quali il fibroso e l'anaplastico, spesso dà una debole positività solo focale, o in alcuni casi perfino assente.

Può essere invece positiva in casi di metastasi da adenocarcinoma polmonare e melanoma.

Un terzo marcatore che quindi può essere considerato in un contesto di diagnosi differenziale è il recettore della somatostatina di tipo 2a (SSTR2A), che è espresso diffusamente in tutti i casi ma può essere positivo anche nei casi di PNET (neoplasie neuroendocrine).^{74,75}

Le tre lesioni principali che entrano in diagnosi differenziale con i meningiomi sono: Schwannomi, emangiopericitoma meningeo, emangioblastoma, PNET, tumore fibroso solitario, emangioblastoma, melanocitomi meningei.

1. Schwannomi

Gli schwannomi hanno positività per s100, vimentina ed EMA (anche se più variabile in questo caso). Inoltre, negli schwannomi si riconosce l'espressione di SOX10, proteina che nel meningioma non è mai positiva.⁷⁴

2. pPNET

Il sarcoma pPNET può emulare il meningioma come sintomatologia e presentazione radiologica, la diagnosi differenziale viene per cui fatta con l'immunohistochimica: PNET ha una forte positività di membrana per il CD99, colorazione locale per la cromogranina e la sinaptofisina e NSE (enolasi neurone specifica), mancanza di architettura EMA, citocheratina AE1/AE3 e bcl-2.⁷⁴

3. Emangiopericitoma

È una lesione che emula il meningioma atipico a causa del suo aspetto istologico e dell'indice mitotico. La differenza tra le due lesioni si può notare secondariamente e una colorazione argentea per evidenziare la reticolina. Questa è positiva solo per gruppi isolati di cellule o singole cellule nell'emangiopericitoma, mentre nel meningioma si crea una rete

grossolana tra vari gruppi di cellule. Inoltre, l'emangiopericitoma è negativo alla colorazione EMA, contrariamente al meningioma.⁷⁶

4. Tumore fibroso solitario

Il tumore fibroso solitario all'osservazione istologica può imitare il meningioma fibroso, ma l'immunoistochimica permette di differenziare le due lesioni sulla base della colorazione EMA (che risulta assente nel tumore fibroso), e sulla colorazione per bcl-2 e CD34 (che hanno pattern diffuso solo nel tumore fibroso)^{76,77}

5. Emangioendotelioma

Questa lesione si presenta come una massa extra-assiale meningeale, caratterizzata da un aspetto cistico. Alla risonanza magnetica può emulare il meningioma.

Istologicamente manifesta la presenza di corde e stroma mixoide, in maniera simile al meningioma cordoide. La differenza tra le due lesioni è immunoistochimica: l'emangioendotelioma è negativo alla colorazione EMA e positivo per il CD31 e il CD34.⁷⁸

6. Emangioblastoma

Istologicamente l'emangioblastoma è caratterizzato dall'avere numerosi vacuoli dal contenuto lipidico che portano al caratteristico aspetto a cellule chiare, che entra in diagnosi differenziale con il meningioma a cellule chiare.

È inoltre caratterizzato da un'importante proliferazione vascolare, tale da mimare il meningioma angiomatico (lesione caratterizzata dalla predominanza di vasi sanguigni rispetto alle cellule tumorali).

Anche in questo caso, per poter arrivare a una diagnosi certa, si ricorre all'immunoistochimica, in quanto l'emangioblastoma è caratterizzato dall'avere una negatività all'EMA⁷⁹.

7. Melanocitomi meningei

La diagnosi differenziale, anche in questi casi, sfrutta le caratteristiche immunoistochimiche differenti delle lesioni: i melanocitomi sono fortemente reattivi per s100, hmb-45 e vimentina, mentre non sono reattivi per EMA e proteine acido fibrillare gliale.⁸⁰

3. Indice di proliferazione (KI-67)

Con le tecniche immunohistochimiche si può andare a studiare l'indice di proliferazione (KI-67): questo valore non rientra nelle caratteristiche diagnostiche del WHO, ma i dati da vari studi confermano la sua validità come marker significativo nella discriminazione di casi aggressivi e casi benigni.^{81,82}

Il KI-67 è una proteina nucleare, espressa solo da cellule proliferanti, in particolar modo aumenta la sua espressione da cellule in G1 a cellule in mitosi, per poi diminuire rapidamente subito dopo la divisione cellulare. Non sarà per cui rilevabile nelle cellule quiescenti (in fase G0).^{83,84}

Pertanto, l'espressione del KI-67 è indicativa dello stato di proliferazione cellulare, e più alto è il valore, peggiore sarà la prognosi.⁸⁵

Il calcolo dell'indice proliferativo viene fatto con uno studio immunohistochimico nel quale si ricerca il numero di cellule positive alla colorazione su mille cellule neoplastiche, contate ad alto ingrandimento e nella zona a maggiore immunoreattività.⁸⁶

h. Approcci terapeutici

Le opzioni terapeutiche del meningioma sono varie e la terapia è personalizzata sul singolo caso in base alle caratteristiche del paziente e della neoformazione stessa. Le armi terapeutiche includono: osservazione attiva, resezione chirurgica, radioterapia e, raramente, chemioterapia.⁸

1. Approccio “wait and see”

Questo tipo di approccio è utilizzato per pazienti che si presentano con lesioni asintomatiche, quindi, riscontrate in maniera accidentale in esami effettuati per altre motivazioni, o di piccole dimensioni (diametro minore di 3 cm).^{87,88}

Queste categorie di pazienti entrano in un percorso di osservazione attiva che prevede l'esecuzione di scansioni RMN, la prima 6 mesi dopo la diagnosi e poi a cadenza annuale per i primi 5 anni e poi una ogni due anni, finchè la lesione non diventa sintomatica o raggiunge dimensioni tali per cui l'intervento diviene consigliato al fine di evitare l'insorgenza futura di sintomi.^{8,87}

Nei pazienti con diagnosi radiologica di meningioma benigno, ma con una bassa aspettativa di vita, a causa di anzianità o comorbidità importanti, non entrano nel percorso di osservazione.⁸

2. Resezione chirurgica

L'approccio chirurgico rappresenta la prima scelta terapeutica nei meningiomi sintomatici o di grosse dimensioni, sia nei casi in cui queste caratteristiche siano già presenti alla diagnosi, sia in lesioni che le sviluppano nel periodo di osservazione attiva.¹

L'ampiezza e la totalità della resezione si valutano con il grading Simpson, che si basa sull'imaging post-operatorio e sulla valutazione del neurochirurgo.⁷²

Il Simpson grade è così diviso:¹

Grado	Descrizione	Ampiezza della resezione
1	Resezione totale macroscopica (GTR) del tumore, dell'impianto durale e dell'osso infiltrato	
2	Resezione totale macroscopica (GTR) del tumore, coagulazione dell'impianto durale	Gross Total Resection (GTR)
3	Resezione totale macroscopica (GTR) del solo tumore	
4	Resezione subtotale del tumore (STR)	Subtotal Resection (STR)
5	Semplice decompressione, con o senza biopsia	-

La rilevanza di questa classificazione oggi è messa in dubbio, a causa della piccola differenza nei tassi di recidiva tra i vari gradi, persino nella resezione subtotale. Ciò può essere riconducibile alle nuove tecniche micro-neurochirurgiche e la combinazione di questa con altre tecniche, come l'embolizzazione, nel trattamento anche di lesioni che sono aggredibili chirurgicamente solo in maniera parziale.⁸⁹

Un secondo punto di critica riguarda il grado IV, che comprende tutte le lesioni con resezione subtotale indipendentemente dalla quantità di neoplasia lasciata in sede. Ovviamente il volume del residuo correla direttamente con uno sviluppo clinico della recidiva.⁹⁰

Di conseguenza nell'odierno approccio chirurgico ai meningiomi la classificazione di Simpson non è più rilevante, ne andrebbe mantenuto solo il messaggio di fondo, ossia che lo scopo della chirurgia deve essere di ottenere la massima rimozione possibile della neoplasia. La classificazione in sé, contrariamente, andrebbe sostituita con un sistema di grading che si basa sulle immagini di risonanza magnetica post-operatoria che vada, in modo oggettivo, a definire la completezza della resezione e che suddivida le resezioni

subtotali in due categorie: resezioni che lasciano in sede un volume minore di 4-5 cm³ o un volume maggiore di 4-5 cm³. Tutto ciò, integrando criteri molecolari per poter dare una miglior definizione del rischio di recidiva.⁹¹

Una resezione totale macroscopica è curativa nel 70-80% dei casi, e rappresenta quindi l'obiettivo della chirurgia, tuttavia ciò può essere limitato da caratteristiche del tumore (localizzazione, coinvolgimento dei seni venosi, coinvolgimento di tessuto neurovascolare) o del paziente.^{1,72,88}

L'estensione della rimozione chirurgica, e quindi il grado di Simpson, correla con la probabilità di recidiva della lesione, indipendentemente dal grado WHO della stessa.⁸

Nel contesto chirurgico si possono utilizzare farmaci steroidei (per via orale o per via endovenosa), con lo scopo di portare a una diminuzione dell'edema peritumorale. Questo è un trattamento sintomatico, utilizzato per alleviare i sintomi in attesa dell'intervento chirurgico.

Un secondo trattamento sintomatico riguarda i farmaci antiepilettici. L'epilessia è un sintomo caratteristico dei meningiomi sovratentoriali, e la chirurgia porta a una risoluzione della sintomatologia nel 70% dei casi, ma c'è anche la possibilità che sia proprio l'intervento chirurgico a predisporre il paziente a sviluppare una sintomatologia epilettica. Ciò avviene nel 12% dei pazienti non epilettici che subiscono un intervento per asportazione di meningioma.⁶¹

3. Radioterapia

La radioterapia è la terapia di prima linea per i meningiomi non resecabili (come lesioni che coinvolgono strutture neurovascolari o localizzati in alcune area della base cranica).⁸⁸

In meningiomi di grado WHO I si offre la radioterapia in lesioni trattate con una resezione parziale o in lesioni ricorrenti. Gli approcci possono essere due: SRS, o radiocirurgia stereotassica, e FRT, o radioterapia frazionata.^{1,8}

L'approccio stereotassico prevede l'utilizzo di una dose di 12-16 Gray in un'unica somministrazione e si utilizza in tumori di piccole dimensioni (diametro minore di 3 cm o volume totale minore di 10 cm³). L'approccio con radioterapia frazionata invece prevede l'utilizzo di una dose totale di 50-55 Gray con somministrazioni multiple, ciascuna da 1.8-2.0 Gray.^{1,8}

La FRT viene utilizzata nei meningiomi non resecabili chirurgicamente e di grande volume. È, ad esempio, il trattamento di prima linea nei meningiomi che insorgono a livello della guaina del nervo ottico (una zona non aggredibile chirurgicamente in quanto

c'è alto rischio di indurre cecità). Non porta all'eradicazione della lesione ma ad un controllo della crescita e una stabilizzazione o lieve regressione dei sintomi.⁹²

Nei meningiomi di grado II e III il rischio di ricorrenza, anche con un Simpson grade 1, è aumentato e si attesta sul 30-40% a 5 anni nei meningiomi atipici e 50-80% a 5 anni nei meningiomi anaplastici. Per cui un trattamento radioterapico adiuvante, con approccio FRT, è spesso parte dell'approccio terapeutico di queste lesioni.^{1,88}

Dati rispetto alla radioterapia adiuvante in meningiomi WHO II che hanno subito una gross total resection, non sono ancora conclusivi, per cui rimane consigliato l'approccio radioterapico a partire da una lesione resecata in maniera parziale.^{1,8,88}

L'utilizzo di RT post-operatoria in meningiomi anaplastici o atipici, trattati inizialmente con chirurgia (soprattutto se Simpson III o IV), ha un effetto positivo sulla sopravvivenza e sulla probabilità di sviluppare una recidiva.⁹³

4. Terapia sistemica

È una terapia di salvataggio in quei pazienti che hanno lesioni recidivante non trattabili chirurgicamente o con radioterapia. Il NCCN (National Comprehensive Cancer Network) raccomanda l'uso di α -IFN, agonisti del recettore della somatostatina e gli inibitori del VEGF.⁹⁴

L'inibitore del VEGF, il bevacizumab in particolar modo, rientra nell'approccio terapeutico dei meningiomi in quanto queste lesioni sono altamente vascolarizzate e presentano una up-regolazione dell'espressione del VEGF.⁹⁵

Altri approcci sistemici partono dalla mutazione molecolare alla base dello sviluppo del meningioma, con azione mirata sulla via di trasmissione del segnale coinvolta nel processo patogenetico.

Nei meningiomi con NF2 mutato ci sono delle disregolazioni sulla via di mTOR, con una regolazione in senso negativo di mTORC1 e in senso positivo di mTORC2. Queste alterazioni suggeriscono lo studio per farmaci inibitori di mTOR.^{9,96,97}

In aggiunta, alcuni studi preclinici hanno mostrato che i meningiomi NF2 mutati presentano una sensibilità a farmaci inibitori della chinasi di adesione focale (FAK). Queste caratteristiche hanno permesso l'inizio di un trial clinico che ha mostrato che l'utilizzo di questo farmaco risulta in un miglioramento di sei mesi della Progression Free Survival.^{9,98,99}

Inoltre, anche la mutazione di KFL4, in associazione con la mutazione su TRAF7, porta ad una up-regolazione di HIF-1a (Fattore indotto dall'ipossia 1a). Quest'ultimo agisce a sua volta stimolando la via di mTOR.^{9,100}

L'alterazione di AKT1 può essere un target terapeutico per i farmaci inibitori di AKT come il capivisertinib, che ha mostrato di poter ottenere un controllo duraturo della malattia, perfino se questa era refrattaria ad altri tipi di trattamento.^{9,101}

Meningiomi che sono caratterizzati da mutazioni di BAP1 presentano degli alterati meccanismi di riparazione del DNA. Questo ha portato all'ipotesi, in studio, di utilizzare i PARP inibitori come farmaco target. Sempre in questa categoria di meningiomi sono ancora aperti degli studi sull'efficacia di farmaci EZH2 inibitori.^{9,102}

Farmaci PARP inibitori possono essere usati anche nei meningiomi associati a radiazioni ionizzanti, a causa del meccanismo di danno al DNA che le radiazioni provocano.

Altre possibili alternative di terapie sistemiche sono gli inibitori del CDK, farmaci antiprogesterone (nei meningiomi non trattabili chirurgicamente e che esprimono il recettore per il progesterone)⁹

Gli analoghi della somatostatina come l'octreotide (studiati in quanto i meningiomi risultano avere positività per il recettore della somatostatina di tipo 2), portano a una riduzione della crescita del tumore, ma non in una riduzione della dimensione dello stesso. Non hanno quindi effetti clinici sulla lesione.^{9,103}

5. Immunoterapia

Molti dei trial clinici in questa categoria vanno a studiare farmaci target sull'asse PD-1/PD-L1; inoltre, Yeung et al. ha dimostrato una maggior potenziale terapeutico nell'immunoterapia con target l'asse CSF1/CSFR1.^{104,105}

CSF1 è un antigene prodotto sia da cellule della linea mieloide, sia da cellule tumorali, mentre il suo recettore è espresso solo dalle cellule mieloidi. Yeung ha inoltre osservato che nei pazienti con meningioma ci sono livelli sierici più elevati di CSF1 che possono essere usati come biomarker della malattia.¹⁰⁴

Ad oggi, l'immunoterapia è una scelta terapeutica nei meningiomi di alto grado, nei quali la terapia convenzionale non porta ad un miglioramento della progression free survival. Ci sono varie possibili alternative terapeutiche in questa categoria: CAR-T, anticorpi monoclonali e inibitori dei checkpoints. Gli inibitori del checkpoint sono principalmente inibitori dell'asse PD-1/PD-L1.¹⁰⁶

Il razionale terapeutico è l'attivazione delle cellule immunitarie che infiltrano il tessuto tumorale contro la neoplasia stessa. Di conseguenza l'infiltrazione di cellule immunitarie nel tessuto neoplastico è un importante indicatore prognostico, sia nel senso di presenza di infiltrato infiammatorio, sia nella composizione dello stesso.¹⁰⁷

Studi hanno dimostrato che nel meningioma sono presenti varie proteine regolatrici dei checkpoints: PD-L1 (l'espressione è maggiore, più alto è il grado della lesione), PD-L2, B7-H3, CTLA-4, NY-ESO-1. L'espressione di queste proteine correla con un maggior rischio di progressione, recidiva e bassa sopravvivenza.¹⁰⁸

Il corredo di cellule immunitarie che infiltrano il tumore va a formare il microambiente immunologico del tumore. Le cellule immunitarie che si possono trovare sono linfociti T, linfociti B, macrofagi (con fenotipo M2, immunosoppressivo. Sono più frequenti nei tumori di grado II e III) e plasmacellule, cellule NK, APC, microglia. In particolare, nel meningioma, sono prevalenti i linfociti T con una aumentata espressione di PD-1. Nel meningioma di grado III i linfociti sono principalmente Treg con invece una bassa percentuale di CD4+ e CD8+.^{106,109,110}

La composizione del microambiente immunitario è direttamente correlata con la progressione tumorale.¹⁰⁶

La terapia con inibitori dell'asse PD-1/PD-L1 viene suggerita in pazienti con delle lesioni cronicamente recidivanti, con storia di multipli interventi chirurgici e/o trattamenti radioterapici. Tuttavia, anche all'interno di lesioni con lo stesso grado WHO ci sono risposte varie alla terapia, il che può essere dovuto a un diverso pattern mutazionale. Rimane quindi necessario integrare la scelta terapeutica con lo studio di marker molecolari.¹⁰⁶

Ci sono alternative immunoterapeutiche il cui bersaglio sono altri inibitori del checkpoint come PD-L2, CTLA-4, B7-H3 e NY-ESO-1. B7-H3 e PD-L2, i quali sono maggiormente espressi in quelle lesioni caratterizzate dall'aver mutazioni sulla via di PI3K/AKT/mTOR, mentre CTLA-4 ha una maggior espressione in lesioni con mutazioni a livello di PI3KCA e SMO.^{106,108}

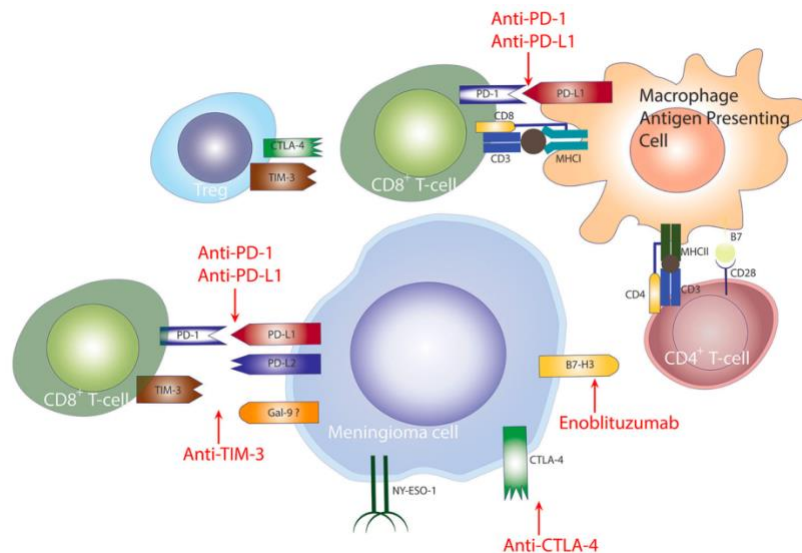


Fig.5: I meccanismi mediati dai checkpoint impiegati dai meningiomi per eludere la risposta immunitaria antitumorale e i farmaci inibitori dei checkpoint per trattare i meningiomi.¹⁰⁶

i. Prognosi

La storia naturale del meningioma consta, solitamente, di una crescita lenta (intorno ai 2-4 mm/anno). In alcuni casi, tuttavia, la lesione non va incontro a un processo di crescita o, all'opposto, la crescita può essere rapida ed esponenziale.¹

La sopravvivenza su 10 anni, suddivisa per grado istologico è del 83,7% per il grado I, 53% per il grado II, 0% per il grado III.^{1,72}

I fattori prognostici principali sono il grading istologico e il grado di ampiezza della resezione chirurgica (la classificazione di Simpson). Altri fattori che entrano in gioco nel definire la prognosi della lesione sono: le dimensioni e il volume iniziale del tumore (maggiori sono, più scarsa sarà la prognosi), l'indice di proliferazione MIB-1/ki-67 (è un metodo immunostochimico che permette la ricerca di strutture nucleari che si presentano solo in fase proliferativa e che quindi sostengono la crescita del tumore: più è alto, più cellule sono in stato proliferativo e peggiore sarà la prognosi), la presenza di necrosi intralesionale (se è presente riduce il tempo di progression free survival e aumenta la probabilità di avere una recidiva), un basso Karnofsky Performance Status alla diagnosi e il coinvolgimento di nervi cranici.^{106,111}

I meningiomi spinali hanno complessivamente una prognosi migliore rispetto a quelli cerebrali, sono caratterizzati dall'aver un indice MIB-1 e un Ki-67 minori rispetto alle lesioni con localizzazione cerebrale. Istologicamente si vedono un minor numero di cellule in mitosi.

Studi recenti hanno, infine, individuato dei marker prognostici molecolari. Sahm et al. ha studiato i profili di metilazione di 40 geni associati alla genesi e alla progressione del meningioma, stratificando le lesioni in 6 gruppi.¹¹²

Questi sei gruppi propongono una stratificazione del rischio di progressione e di recidiva in maniera più accurata rispetto alla classificazione istologica WHO.

Katz et al. ha dimostrato inoltre che i pattern di metilazione dell'istone H3 sono direttamente correlati con il rischio di recidiva per meningiomi di grado istologico I e II.^{42,113}

Una prima stratificazione del rischio di recidiva si basa sul grado istologico della lesione e sull'estensione della resezione chirurgica: tumori che hanno subito una Total Gross Resection recidivano nel 7-23% dei casi di grado I, nel 50-55% dei casi di grado II, nel 72-78% dei casi di grado III a 5 anni di distanza. Tumori che hanno subito un Subtotal Resection invece hanno quasi il 100% di possibilità di recidivare entro 15 anni, indipendentemente dal grado istologico; inoltre il 60% dei pazienti trattati con STR vanno incontro a decesso, la maggior parte entro 10 anni.^{1,88}

Secondo Haddad et al. il rischio di recidiva nelle lesioni di grado I è associato all'indice MIB-1 (con un valore di cut-off di 4,5%, oltre questo valore c'è un aumentato rischio di recidiva), a una localizzazione a livello della fossa cranica posteriore, la presenza di atipia a livello nucleare e, in ultimo, una chirurgia STR.¹¹⁴

I meningiomi di grado I che sono andati incontro a una GTR non dovrebbero presentare una recidiva nel corso degli anni successivi; tuttavia, la pratica clinica presenta dei casi che rientrano in questa categoria. Teranishi et al. con uno studio su 281 meningiomi di grado I, fornisce una possibile sottodivisione dei meningiomi di grado I in modo da meglio stratificare il rischio di recidiva e valutare la PFS. I parametri presi in considerazione sono lo status mutazionale del gene NF2 (o del cromosoma 22q), l'indice proliferativo MIB-1, valutato con il ki-67, la localizzazione del meningioma.¹¹⁵

Combinando questi tre parametri si possono stratificare i meningiomi di grado I in tre gruppi:

Grado	Status mutazionale, indice proliferativo e localizzazione tumorale
<i>Buono</i>	Ki67 < 4% e tutti gli NF2 wild-type
	Ki67 < 4% e meningiomi infratentoriali NF2 mutati
<i>Intermedio</i>	Ki67 > 4% o meningiomi sopratentoriali NF2 mutati
<i>Scarso</i>	Ki67 > 4% e meningiomi sopratentoriali NF2 mutati

Per le lesioni di grado buono la percentuale di recidiva è stata del 4%, mentre la Progression Free Survival (PFS) del 96,1% sia a 5 che a 10 anni. Per le lesioni di grado intermedio la percentuale di recidiva è stata del 10,7%, con una PFS del 89,7% a 5 anni e 83,9% a 10 anni. Per le lesioni di grado scarso la percentuale di recidiva è stata del 48,1%, con una PFS del 43% a 5 anni e 21,5% a 10 anni.¹¹⁵

Youngblood et al. infine, ha studiato la relazione tra sottogruppi molecolari e tempo di recidiva delle lesioni: ha riscontrato diversi sottogruppi aggressivi (NF2, PI3K, Hedgehog, TRAF7) che hanno avuto un tempo alla ricorrenza, in media, 22 volte superiore rispetto ad altri (KLF4, POLR2A, SMARCB1). I tumori con mutazione sul gene PI3K sono recidivati prima rispetto agli altri sottogruppi, ma sul lungo termine i risultati sono intermedi.

Tra i tumori a basso grado, i meningiomi Hedgehog e TRAF7 hanno mostrato una ricorrenza elevata rispetto ad altri sottogruppi.¹¹⁶

j. Metastasi

Le metastasi sono delle complicanze rare nei meningiomi, infatti la possibilità che si sviluppino dei secondarismi in questo tipo di neoplasie è meno dello 0,1%, la maggior parte dei quali sono originarie da meningiomi di grado III.¹

I siti di metastasi più comuni sono i polmoni (60% dei casi), pleura, ossa, fegato, linfonodi e reni.^{1,117}

Sono stati riscontrati casi estremamente rari di metastasi polmonari da meningioma di grado I, tuttavia la prognosi di queste lesioni è positiva.¹¹⁸

II. OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'obiettivo di questo studio retrospettivo è analizzare le caratteristiche istologiche, immunoistochimiche e molecolari dei meningiomi classificati di grado I, secondo il WHO 2021, che hanno recidivato nonostante una resezione neurochirurgica completa.

Le caratteristiche istologiche prese in analisi sono l'indice mitotico, l'invasione del parenchima cerebrale e l'istotipo.

Le indagini immunoistochimiche si sono basate sullo studio dell'indice di proliferazione, sul profilo della trimetilazione della lisina 27 dell'istone 3 e, nei casi di donne in età fertile, la presenza di recettori per estrogeno e progesterone.

Infine, lo studio molecolare è volto alla valutazione dello status mutazionale del promotore di TERT.

Attraverso l'esame dei campioni in studio si vuole determinare la possibile esistenza di pattern specifici associati a una maggiore recidività di questi tumori, fornendo per cui una miglior comprensione sui fattori predittivi di queste lesioni.

III. MATERIALI E METODI

a. Casistica

La selezione dei casi è stata effettuato retrospettivamente, inserendo nello studio tutti i casi di meningioma di grado I (WHO), recidivanti nonostante una escissione totale della lesione primitiva.

I casi di recidiva presi in analisi sono casi diagnosticati dalla SCDU di Anatomia Patologica della AOU Maggiore della Carità di Novara nel lasso temporale compreso tra il 01/01/2013 e il 31/12/2023.

Di ciascuno di questi casi sono state studiate anche le lesioni primitive, anch'esse diagnosticati dalla SCDU di Anatomia Patologica della AOU Maggiore della Carità di Novara.

I criteri con cui sono stati inclusi i pazienti sono:

1. Paziente di età ≥ 18 anni
2. Meningioma primitivo classificato come grado I o con istotipo riconducibile ad un grado I
3. Paziente con recidiva del suddetto meningioma
4. Evidenza radiologica di escissione completa della lesione primitiva

Al termine della ricerca dei casi, effettuata tramite i programmi Armonia e Winsap 3.0, i casi di recidiva di meningioma di grado I erano 33.

È stato effettuato, successivamente, una ulteriore selezione in base a criteri radiologici che dimostravano l'escissione completa della lesione primitiva. Questa selezione si è basata sui referti e sulle immagini radiologiche recuperate dal sistema PACS.

Dei 33 casi iniziali di recidiva, 7 sono stati esclusi in quanto la Tomografia Computerizzata post-operatoria dimostrava la persistenza di un residuo della lesione e ulteriori 7 casi sono stati esclusi per mancanza di una indagine radiologica post-operatoria.

I casi finali di recidive facenti parte dello studio sono quindi 19.

Per ogni caso sono state recuperate dall'archivio le inclusioni in paraffina e i preparati istologici, sia della recidiva, sia della lesione primitiva. I preparati istologici presentavano una colorazione con Ematossilina-Eosina, e in alcuni casi delle indagini immunoistochimiche supplementari, come lo studio del Ki-67.

Di ciascuna lesione è stata identificata la sede di insorgenza, attraverso le notizie sulla storia clinica del paziente e attraverso lo studio delle immagini pre e post-operatorie.

Tutti i casi sono stati rivalutati, descrivendone l'istotipo, il rapporto con il parenchima cerebrale e l'indice mitotico, al fine di confermare o riclassificare le lesioni secondo le più recenti linee guida della classificazione WHO 2021.

Per ogni caso, sia sulla lesione primitiva che sulla recidiva, sono state tagliate nuove sezioni al fine di effettuare delle indagini immunoistochimiche ancillari. Queste comprendono lo studio dell'indice di proliferazione (Ki-67), l'espressione del recettore per il progesterone (PR) e del recettore per gli estrogeni (ER) nelle donne che hanno sviluppato la lesione primitiva in età fertile (2 casi), e la ricerca della perdita della trimetilazione sull'istone 3 (H3K27me3).

I casi totali, includendo sia lesioni primitive che recidive, sono in totale 39.

b. Rivalutazione istologica

Per ciascuno dei 39 casi sono stati recuperati dall'archivio tutti i preparati istologici e le inclusioni in paraffina.

I casi in questione sono rappresentati da 36 casi di meningioma classificati come lesioni di grado I e 3 casi di meningioma classificati come delle lesioni di grado II. Tutte le lesioni primitive erano classificate come grado I. Questi casi, inoltre, spaziano a livello temporale tra il 2008 e il 2023.

Molti casi, quindi, sono stati classificati secondo delle linee guida passate che sono state modificate nel corso degli anni successivi. Conseguentemente si è resa necessaria una rivalutazione istologica di tutti i casi al fine di avere una classificazione coerente con le linee guida ad oggi in vigore, cioè il WHO 2021.

Questa rivalutazione è stata effettuata analizzando i preparati istologici con colorazione Ematossilina-Eosina, descrivendo l'istotipo della lesione, indagandone l'indice mitotico (su dieci campi a grande ingrandimento) e ricercando l'invasione del parenchima cerebrale, laddove questo fosse presente nel preparato.

Si è, inoltre, studiato la presenza delle caratteristiche istologiche che permetterebbero di definire la lesione come un grado II. Queste sono la presenza di foci di necrosi spontanea, una alta cellularità della lesione, la presenza di piccole cellule con un alterato rapporto

nucleo-citoplasma, la presenza di nucleoli prominenti e dei pattern di crescita definiti come “sheet-like” o “patternless”.

Al termine della rivalutazione tutti i meningiomi che erano stati classificati come grado I sono stati confermati come grado I, mentre tra i tre meningiomi classificati come grado II soltanto uno ha avuto la conferma della gradazione, mentre gli altri due sono stati riclassificati come un grado I secondo il WHO 2021.¹¹⁹

c. Immunoistochimica

Per ogni caso selezionato, partendo dalle inclusioni in paraffina sono state allestite 4-5 sezioni da 2 µm su vetrini polarizzati, immergendo il tessuto in bagno termostatico a circa 42°C.

Da questi sono state selezionate le sezioni migliori per l'indagine immunoistochimica.

Nel contesto di questa tesi, le indagini immunoistochimiche sono state eseguite al fine di studiare l'indice di proliferazione, la Loss of H2K27me3, la presenza del recettore per estrogeno e recettore per progesterone.

Le prime due indagini sono state eseguite per tutti i casi, sia sulle recidive che sulle lesioni primitive, mentre i recettori di estrogeni e progesterone solo nel caso di donne giovani (2 casi, di cui sono state studiate sia le primitività che la recidiva).

I vetrini selezionati sono stati posizionati in stufa a 60 gradi per 30 minuti prima del processamento automatico, mediante l'utilizzo dello strumento *BenchMark ULTRA*[®] (Ventana Medical System, Inc. Tucson, AZ, USA) con il sistema di rilevazione *Ultraview Universal DAB Detection kit*. Il processo prevede inizialmente uno smascheramento dell'antigene, seguito, a metà del processo, da montaggio manuale su singolo vetrino dell'anticorpo primario, conservato a una temperatura di 5 gradi. Per terminare si svolge un lavaggio in acqua con sapone a pH 5,5 e un successivo passaggio in scala alcolica a 95 gradi per 3 minuti, poi a 100 gradi per 3 minuti e infine in xilene per 1 minuto. Il vetrino finale presenterà una cover slip posizionata sopra con l'utilizzo di un balsamo Eukitt classic



Fig. 6: BenchMark ULTRA® (Ventana Medical System, Inc. Tucson, AZ, USA).

Per quanto riguarda lo studio dell'indice di proliferazione il processo si compone delle seguenti fasi.

1. Sparaffinatura (72°C)
2. Smascheramento antigenico con ULTRA Conditioner (Cell Conditioning 1 Standard).
3. Incubazione con anticorpo primario per 16 minuti a 37°C. In questo contesto è stato utilizzato l'anticorpo monoclonale Ki-67 (Ventana Medical System, Inc. Tucson, AZ, USA). L'anticorpo monoclonale Ki-67 è di origine animale (specie rabbit), utilizzato a una concentrazione di 2 µg/mL, di produzione della ditta Roche.
4. Controcolorazione con Ematossilina per 4 minuti.
5. Post-controcolorazione (Bluing reagent per un tempo tra 2 e 4 minuti).
6. Deidratazione e montaggio con coverslip
7. Valutazione dell'indice. Questa è stata effettuata studiando il rapporto tra le cellule risultate positive e il totale delle cellule. Questa valutazione è stata effettuata nelle zone del campione che, visivamente, presentavano una maggior positività.

Nel contesto dello studio circa la perdita della trimetilazione della lisina 27 dell'istone 3 il processo è:

1. Sparaffinatura (72°C)
2. Smascheramento antigenico con BOND™ Epitope Retrieval ER2 Solution a 100°C per 20 minuti.
3. Blocco della Perossidasi con Refine Detection Kit Peroxide Block ® per 5 minuti
4. Incubazione con anticorpo primario per 30 minuti. È stato utilizzato l'anticorpo monoclonale Tri-Methyl-Histone (Cell Signaling Technology ®, Danvers,

Massachusetts, USA), ad una diluizione di 1:100-1:400. L'anticorpo monoclonale è una IgG di originale animale, di coniglio specificamente.

5. Controcolorazione con ematossilina per 5 minuti.
6. Deidratazione delle sezioni che vengono passate in etanolo 95%, 2 volte, ciascuna per 10 secondi. Successivamente è ripetuta in etanolo 100%, anche in questo caso due volte per 10 secondi. E infine un'ultima ripetizione in xilene. Segue montaggio con coverslip
7. L'anticorpo si lega all'istone 3 soltanto quando la lisina 27 è trimetilata, conseguentemente la valutazione è stata fatta come percentuale di cellule che non risultano positive sul totale delle cellule del meningioma

Infine, nella valutazione dell'espressione dei recettori per estrogeni il processo è:

1. Sparaffinatura (72°C)
2. Smascheramento antigenico con ULTRA Conditioner (Cell Conditioning 1, Standard)
3. Incubazione con anticorpo primario per 16 minuti a 36°C. È stato utilizzato l'anticorpo monoclonale anti-Estrogen Receptor (Ventana Medical System, Inc. Tucson, AZ, USA). L'anticorpo monoclonale anti-ER è un anticorpo di coniglio il kit contiene anticorpi monoclonale alla concentrazione di 1 µg/mL
4. Controcolorazione con ematossilina per 4 minuti.
5. Post-controcolorazione (Bluing reagent per 4 minuti).
6. Deidratazione e montaggio con coverslip
7. L'espressione è poi stata valutata come la percentuale corrispondente al valore medio del rapporto tra cellule tumorali positive e cellule tumorali totali, studiato nella totalità del preparato.

Infine, nella valutazione dell'espressione dei recettori per progesterone il processo è:

1. Sparaffinatura (72°C)
2. Smascheramento antigenico con ULTRA Conditioner (Cell Conditioning 1, Standard)
3. Incubazione con anticorpo primario per 16 minuti a 36°C. sono stati utilizzati rispettivamente l'anticorpo monoclonale anti-Progesterone Receptor (Ventana Medical System, Inc. Tucson, AZ, USA). L'anticorpo monoclonale anti-PR è un

anticorpo di coniglio, il kit contiene anticorpi monoclonale alla concentrazione di 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

4. Controcolorazione con ematossilina per 4 minuti.
5. Post-controcolorazione (Bluing reagent per 4 minuti).
6. Deidratazione e montaggio con coverslip
7. L'espressione è poi stata valutata come la percentuale corrispondente al valore medio del rapporto tra cellule tumorali positive e cellule tumorali totali, studiato nella totalità del preparato.

d. Estrazione del DNA

È stato selezionato il vetrino più rappresentativo del campione in base all'analisi istologica. Il blocchetto di paraffina corrispondente è stato quindi sottoposto a una procedura di macrodissezione manuale al microtomo Jung Biocut 2035 (Leica), dal quale si sono ottenute diverse sezioni di 8 μm , che sono state riposte in provette sterili Eppendorf da 2 mL. Successivamente si è proceduto all'estrazione del DNA.

Utilizzando i protocolli in uso attualmente nella routine diagnostica della SCDU Anatomia Patologica, AOU Maggiore della Carità di Novara, per la procedura di estrazione del DNA è stato utilizzato un metodo con biglie magnetiche, in particolare si è impiegato il kit "Maxwell RSC DNA FFPE" (Promega), secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice.



Fig.7: Estrattore Maxwell RSC (Promega)

Gli step del processo sono i seguenti:

1. Centrifugazione delle sezioni in provetta eppendorf a 14.000 giri per 1 minuto.
2. rimozione della paraffina mediante l'utilizzo del reagente MineralOil (Promega), in una quantità di 300 μ L. Il materiale è stato agitato per 10 secondi e quindi posto in incubazione per 1 minuti a 80°C.
3. Aggiunta in provetta di una miscela di 250 μ L, composta da Lysis Buffer (Promega) 224 μ L, Proteinasi K (Promega) 25 μ L e il colorante BlueDye (Promega) 1 μ L
4. Il preparato viene agitato per cinque secondi e centrifugato a 14.000 giri per 20 secondi e successivamente passa per una fase di incubazione a 80°C per 20 secondi, 56°C per 30 minuti e 80°C per 4 ore.
5. Ulteriore centrifugazione a 14.000 giri per 2 minuti, dal prodotto poi si preleva la fase acquosa che viene posizionata nel pozzetto #1 della Maxwell FFPE Cartridge, preventivamente inserita sul deck tray.
6. Collocazione del puntuale RSC nel pozzetto #8 della stessa cartridge e inserimento sul deck tray di un Eppendorf di diluizione da 0,5 mL a 50 μ L di Nuclease Free Water
7. Trasferimento del deck tray all'interno dell'estrattore MaxWell RSC (Promega) con le apposite cartucce e avvio della corsa che impiega biglie di salice nelle colonnine di estrazione. L'estrazione sfrutta l'affinità tra le biglie di salice e l'acido nucleico

Il processo è durato 40 minuti ed è terminato con il trasferimento, attraverso una pipetta automatica di 250 μ L di DNA in un eppendorf da 1,5 mL contenente 50 μ L di acqua.

e. Quantificazione del DNA

In seguito all'estrazione, si è proceduto con la quantificazione del DNA estratto attraverso l'utilizzo dello strumento Quantus Fluorometer.



Fig.8: Quantus Fluorometer

La quantificazione prevede l'utilizzo del kit di test ad alta sensibilità (HS) Invitrogen™ Qubit™ dsDNA utilizzato per campioni con una bassa concentrazione di dsDNA. Preparare la soluzione di lavoro Qubit™ diluendo il reagente Qubit 1:200 nel buffer Qubit. Abbiamo caricato 190 μL di soluzione di lavoro in ciascuna delle provette utilizzate per gli standard e, infine, aggiungiamo 10 μL di ogni standard nella provetta appropriata e mescoliamo nel vortex per 2-3 secondi. Caricare la soluzione di lavoro nei singoli campioni, rispettivamente 198 μL e 2 μL , in modo che il volume finale in ciascuna provetta sia 200 μL . Prima di esaminare i campioni abbiamo utilizzato gli standard per tarare il Fluorimetro

f. PCR e purificazione del prodotto PCR

La PCR è una metodica che attraverso un processo ciclico permette di amplificare frammenti specifici di DNA. Questo ciclo si articola in tre fasi: denaturazione, appaiamento ed estensione.

Nella prima fase la miscela di reazione viene portata a 94-98°C per 20-30 secondi al fine di separare i filamenti di DNA doppia elica in filamenti singoli.

Nella fase di appaiamento la temperatura è abbassata a 50-65°C per 20-40 secondi consentendo al primer di legarsi in modo specifico alle sequenze complementari.

Nell'ultima fase la temperatura viene portata a 72°C per 1-2 minuti, periodo durante il quale la DNA polimerasi, partendo dai primer, sintetizza il filamento di DNA.

Tutto questo ciclo è ripetuto 25-35 volte. Il primo ciclo è preceduto da un passaggio di attivazione della polimerasi a 95°C per 10 minuti, e l'ultimo ciclo è seguito da un processo di estensione a 72°C per 5-10 minuti.

Le regioni mutazionali hotspot del promotore TERT (posizione -C250 e C228) sono state amplificate mediante PCR standard. Per il promotore TERT sono state eseguite le reazioni con AmpliTaq Gold 360® MasterMix (*Thermo Fisher*).

Il processo è stato applicato con l'utilizzo di corse da 8 eppendorf, ciascuna da 0,2 mL.

In ogni 1 mL di campione è presente una concentrazione dai 50-100 ng/mL.

La miscela di reazione è stata preparata tenendo conto del volume finale richiesto di 20 µL e nella mix sono stati aggiunti Primer, NTPs, polimerasi e cloruro di magnesio.

Successivamente sono stati aggiunti 5 µL di DNA nelle varie provette, tranne in quella adibita a controllo negativo per l'identificazione di eventuali contaminazioni dei reagenti in uso, nella quale sono stati somministrati 5 µL di H₂O.

La composizione della miscela risulta quindi:

- 3 µL di H₂O
- 10 µL di Master Mix, comprendente 2 µL di enhancer
- 1 µL di Primer Forward
- 1 µL di Primer Reverse
- 5 µL di DNA (o di H₂O, nel controllo negativo)

I primers utilizzati per l'amplificazione del promotore genomico di TERT:

- TERT forward: TCCTGCCCTTCACCTT
- TERT reverse: AGCACCTCGCGGTAGTGG

Per le reazioni è stato usato il termociclatore Thermal cycler 2720.



Fig.9: termociclatore Thermal cycler 2720.

Per la purificazione dall'eccesso di primers e dNTPS non incorporati nella reazione, è stato utilizzato il kit ExoSAP-IT Express PCR Product Cleanup (Thermo Fisher) composto da due enzimi: esonucleasi, che rimuove i primers, e Shrimp alkaline phosphatase, che rimuove il gruppo fosfato dai dNTPs. Il profilo termico utilizzato prevedeva 15 minuti a 37° C e 15 minuti a 80° C.

g. Sequenziamento Sanger

I frammenti purificati sono stati quindi sottoposti a reazione di sequenza con kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing (Thermo Fisher).

I reagenti utilizzati per la reazione di sequenza sono:

- BigDye® 1 µL
- Primer Reverse 1 µL
- Nuclease free-water 6 µL
- Prodotto di PCR 2 µL

Le quantità si riferiscono al singolo campione. Il volume finale deve essere di 10 µL.

La reazione è avvenuta utilizzando il seguente profilo termico: una prima fase a 96°C per 10 minuti; una seconda fase a 50°C per 5 minuti e una terza ed ultima fase a 60°C per 4 ore.

Il prodotto della reazione di sequenza è stato infine purificato con BigDye® XterminatorM Purification kit (Thermo Fisher), ovvero con aggiunta di 45 µL di SAM™ solution e 10 µL di BigDye® TerminatorM Solution, seguita da agitazione per 30 minuti a 20.000 rpm.

h. Elettroforesi capillare

Infine, si è provveduto a caricare il sequenziatore automatico 3130 Genetic Analyzer Data Collection 5.1 Software Versione 5.1 (Applied Biosystems) da 16 capillari, con piastra da 96 pozzetti ottenuta dall'aggiunta di 10 µL di prodotto purificato e 10 µL di formammide per singolo pozzetto, precedentemente denaturata a 96°C per 2 minuti, per evitare che il DNA a singola elica formasse strutture secondarie e terziarie.

Al termine dell'elettroforesi capillare, i dati della corsa sono stati analizzati attraverso il software Sequencing Analysis (Applied Biosystems).

IV. RISULTATI

a. Analisi delle caratteristiche cliniche e patologiche

Questo studio ha l'obiettivo di studiare le caratteristiche delle recidive dei meningiomi di grado I (classificati o riclassificati secondo il WHO 2021) e cercare dei pattern che possano presentare un ruolo prognostico-predittivo.

La selezione dei pazienti è partita dall'identificazione di soggetti con recidiva di un meningioma classificato come grado I al tempo della diagnosi, identificando 33 casi totali tra le 640 diagnosi di meningioma nel periodo compreso tra il 1° gennaio 2013 e il 31 dicembre 2023.

Il secondo criterio di selezione dei pazienti è l'evidenza radiologica di una escissione totale della lesione, quindi l'assenza alla TC post-operatoria di residuo di malattia.

7 casi sono stati scartati a causa dell'assenza di immagini radiologiche post-operatoria, portando così il numero di pazienti in studio a 26.

Ulteriori 7 casi sono invece stati scartati in quanto l'imaging eseguito successivamente all'intervento neurochirurgico mostrava la permanenza di residuo di malattia, classificando l'intervento come una resezione subtotale.

In questo modo si è raggiunto il numero finale di casi in esame, comprendente quindi 19 pazienti.

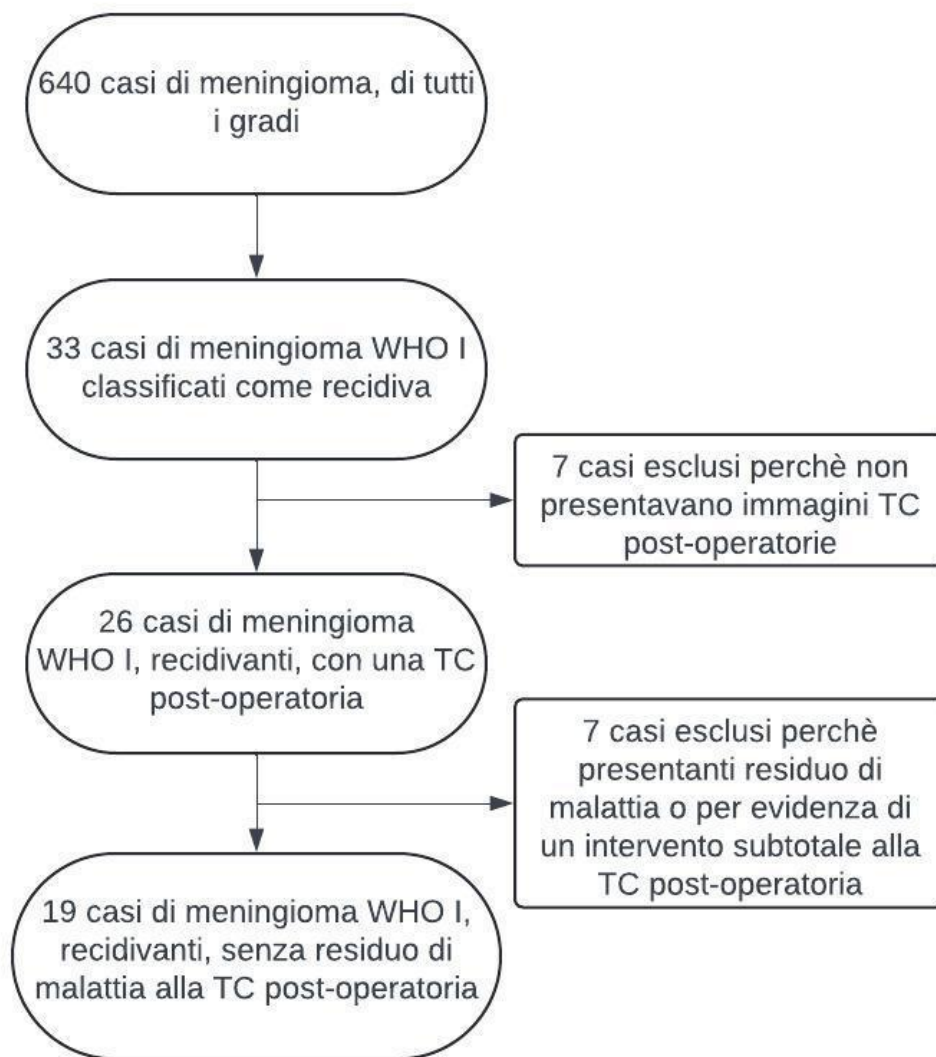


Fig. 10: Flowchart riguardante la scelta della casistica in esame, comprendenti il periodo dal 2013 al 2023

Per riassumere, i soggetti presi in esame in questo studio sono 19 pazienti che, nel periodo compreso tra il 1/1/2013 e il 31/12/2023, hanno presentato una diagnosi di recidiva di meningioma, la cui lesione primitiva venne classificata come un grado I.

Di ciascuno dei 19 pazienti sono state studiate sia le lesioni primitive sia la recidiva, e in un caso, anche la seconda recidiva della stessa lesione. In questo modo, il totale dei campioni in esame risulta essere di 39.

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

Dati		Risultati	
		N.	%
Genere	<i>M</i>	9	47,4
	<i>F</i>	10	52,6
Età alla diagnosi della lesione primitiva	<i>Età media</i>	60,2	
	<i>Età mediana</i>	63	
	<i>Intervallo</i>	18-75	

Tabella 1: Dati demografici dei pazienti

Dai dati espressi in tabella 1 si evidenzia che i pazienti sono quasi equamente divisi considerando il genere. L'età media della diagnosi del meningioma primitivo è di 60,2 anni con un intervallo di età che spazia tra i 18 e i 75 anni.

Dati		Risultati	
		N.	%
Sede	<i>Della convessità cerebrale (superficiali)</i>	14	73,7
	<i>Della base cranica</i>	4	21,1
	<i>Spinali</i>	1	5,2
Sottodivisione dei meningiomi della convessità con sede più specifica	<i>Occipitale sinistra</i>	2	10,5
	<i>Frontale destra</i>	4	21,1
	<i>Frontale sinistro</i>	2	10,5
	<i>Temporale destro</i>	1	5,2
	<i>Parasagittale</i>	3	15,8
	<i>Frontale bilaterale</i>	1	5,2
	<i>Parietale sinistro</i>	1	5,2

Tabella 2: sede di insorgenza del meningioma. La percentuale riportata nello studio della sottodivisione dei meningiomi della convessità è calcolata rispetto ai 19 casi totali

Dalla tabella 2 si evince che nel 73,7% dei casi il meningioma era localizzato a livello della convessità cerebrale, una sede di più facile accesso chirurgico. Mentre solo 4 casi (21,1%) sono riconducibili a lesioni sviluppatasi a livello della base cranica e un solo caso invece ha come sede il midollo spinale.

Nel contesto dei meningiomi della convessità la sede che risulta più frequentemente coinvolta è il lobo frontale destro con 4 casi registrati, mentre considerando anche lesioni frontali bilaterali o sinistre, i casi con coinvolgimento di almeno uno dei lobi frontali sono 7 (36,8% del totale).

In tutti i casi la recidiva di malattie si è ripresentata nella sede di malattia primitiva.

Dati		Risultati	
		N.	%
Tempo di recidiva	<i>0-12 mesi</i>	1	5
	<i>13-24 mesi</i>	5	25
	<i>25-36 mesi</i>	4	20
	<i>37-48 mesi</i>	0	0
	<i>49-60 mesi</i>	1	5
	<i>61-72 mesi</i>	2	10
	<i>73-84 mesi</i>	3	15
	<i>85-96 mesi</i>	1	5
	<i>97-108 mesi</i>	2	10
	<i>109-120 mesi</i>	1	5
Tempo medio di recidiva (mesi)		54,4	
Tempo di recidiva, mediana (mesi)		44,5	

Tabella 3: Tempo di recidiva espresso in mesi. La percentuale è calcolata su un totale di 20 casi a causa del paziente con la doppia recidiva.

La suddivisione dei pazienti in base al tempo di recidiva evidenzia una maggior incidenza di recidiva nei primi 36 mesi dall'intervento (10 casi sul totale di 20, il 50%), in particolare il 25% dei casi ha recidivato nel periodo compreso tra 13 e 24 mesi post resezione completa.

Il tempo medio di recidiva del campione in studio è stato di 54,4 mesi.

b. Analisi dei dati istologici

La prima parte dello studio si è concentrata su una analisi istologica dei vetrini con colorazione Ematossilina-Eosina (EE), con il fine di rivalutare le lesioni definendone l'istotipo e aggiornare il grading secondo le ultime linee guida (WHO 2021). I risultati di tale esame sono riportati in Tabella 4.

Dati		Risultati	
		N.	%
Istotipo della lesione primitiva	<i>Transizionale</i>	6	31,8
	<i>Meningoteliale con aspetti microcistici</i>	2	10,5
	<i>Meningoteliale con aspetti a cellule chiare</i>	1	5,2
	<i>Fibroso</i>	4	21,1
	<i>Meningoteliale</i>	3	15,8
	<i>Fibroso con aspetti psammomatosi</i>	1	5,2
	<i>Transizionale con aspetti microcistici</i>	1	5,2
	<i>Meningoteliale con aspetti angiomatici</i>	1	5,2
	Grading	<i>I</i>	19

Tabella 4: Grading e istotipo

L'istotipo più comune ritrovato all'analisi istologica è stato il transizionale, in 6 casi sui 19 totali (31,8%), seguito dal fibroso che si presenta in 4 casi sui 19 (21,1%). Le recidive hanno mantenuto lo stesso istotipo della lesione primitiva in 16 casi sui 19 totali.

In 3 casi invece c'è stata una modifica e queste sono rispettivamente:

- Da una lesione primitiva descritta come meningoteliale a cellule chiare, la recidiva ha presentato la sola componente a cellule chiare. Ciò porta ad immaginare che la recidiva sia originata dalla sola componente minoritaria a cellule chiare del meningioma primitivo

- Da un istotipo originario descritto come transizionale, si è trovata una recidiva con istotipo meningoteliale
- In ultimo, un meningioma che, come primitiva, presentava un istotipo transizionale ha recidivato con aspetti atipici. Contestualmente questa recidiva presenta delle caratteristiche istologiche che permettono di classificarla come un grado II (WHO 2021).

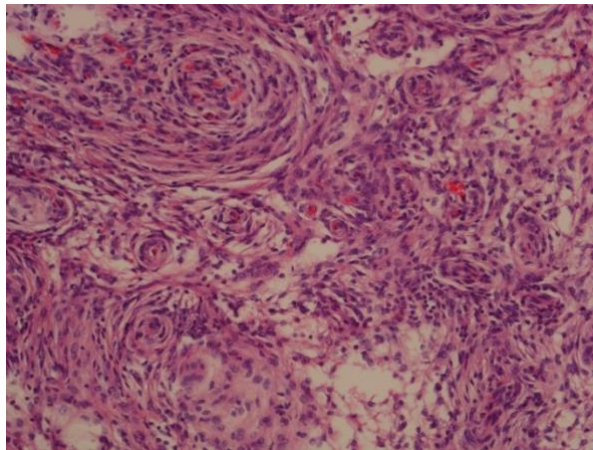


Fig. 11: Meningioma con istotipo transizionale con aspetti microcistici ad ingrandimento 20x

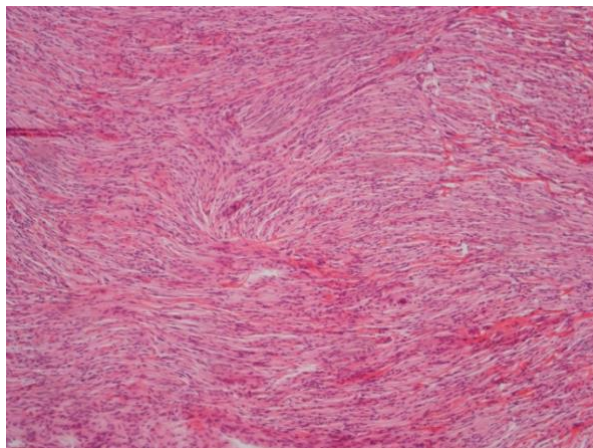


Fig. 12: Meningioma con istotipo fibroso ad ingrandimento 10x

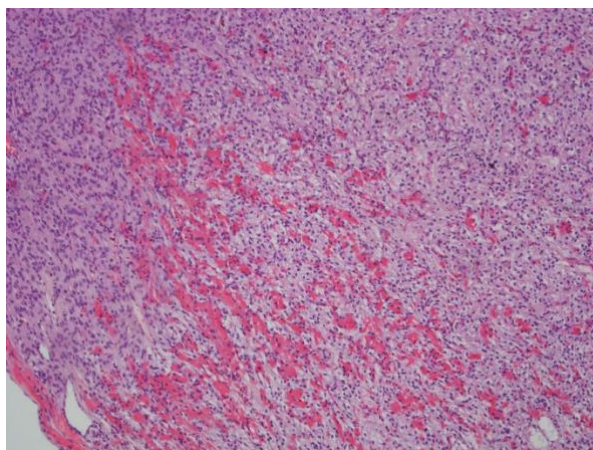


Fig. 13: Meningioma con istotipo meningoteliale con aspetti angiomatici ad ingrandimento 10x

Dati		Risultati	
		N.	%
Indice mitotico primitiva (numero di mitosi/10 HPF)	<i><1</i>	9	47,4
	<i>1</i>	8	42,1
	<i>2</i>	2	10,5
Indice mitotico recidiva (numero di mitosi/10 HPF)	<i><1</i>	13	65
	<i>1</i>	4	20
	<i>2</i>	2	10
	<i>3</i>	0	0
	<i>4</i>	1	5
Invasione del parenchima cerebrale (primitiva)	<i>Assente/Non valutabile</i>	19	100
Invasione del parenchima cerebrale (recidiva)	<i>Assente/Non valutabile</i>	20	100

Tabella 5: Analisi dell'indice mitotico e del rapporto con il parenchima cerebrale sia nelle lesioni primitive che nelle recidive.

L'indice mitotico è stato studiato attraverso un'analisi istologica su vetrino, ricercando figure mitotiche e valutando 10 campi consecutivi ad alto ingrandimento. In tutti i casi dei meningiomi primitivi l'indice mitotico è risultato essere minore di 4, coerentemente con la definizione di grado I secondo il WHO 2021. Nello specifico in 9 casi non sono state osservate mitosi nei campi di studio (<1 mitosi/10 HPF), in 8 casi è stata visualizzata una mitosi e in 2 casi l'indice mitotico è risultato essere di 2 mitosi/10 HPF.

Per quanto riguarda invece lo studio delle recidive, nella maggior parte dei casi (13, il 65%), l'indice mitotico è risultato <1 mitosi/10 HPF. Inoltre, in un caso la recidiva ha presentato un indice di 4 mitosi/10HPF, classificandola perciò come un grado II (istotipo atipico).

Andando a confrontare l'indice mitotico a livello del meningioma primitivo con quello della recidiva si è osservato che in 6 casi l'indice è rimasto invariato, in 8 casi è risultato minore e in 6 casi è risultato maggiore.

A completamento dello studio sull'indice mitotico si è eseguito il test di Wilcoxon, al fine di determinare se vi è stata una variazione significativa tra l'indice mitotico delle lesioni primitive e delle recidive.

Test di Wilcoxon	Valori	
	N.	p-value
	52	0,633

Tabella 6: Test di Wilcoxon dell'indice mitotico

I risultati del precedente test non mostrano una differenza statisticamente significativa tra l'indice mitotico delle lesioni primitive e delle recidive. Pertanto, non possiamo concludere che ci sia una differenza nell'indice mitotico tra questi due gruppi di lesioni.

L'invasione del parenchima cerebrale è un ulteriore parametro da considerare per poter dare un corretto grading alla lesione. La presenza di questa caratteristica permette di classificare il meningioma come un grado II.

In questo studio, tutte le lesioni prese in analisi, sia come neoplasia primitiva che, come recidiva, non presentavano invasione del parenchima o essa non risulta poter essere valutabile data l'assenza del parenchima stessa nell'incluso.

c. Analisi dei dati immunoistochimici

La seconda parte dello studio si è focalizzata sullo studio degli aspetti immunoistochimici. I parametri presi in analisi sono l'indice di proliferazione (KI-67) e la valutazione della perdita della trimetilazione della lisina 27 sull'istone 3 (Loss of H3K27Me3), per tutti i pazienti in analisi. Inoltre, per le pazienti donne di età giovane sono state aggiunte analisi mirate per studiare i recettori per estrogeno (ER) e per progesterone (PR).

I primi dati in analisi riguardano l'indice di proliferazione:

Dati	Valori
<i>Media KI-67 (primitiva)</i>	5,8%
<i>Mediana KI-67 (primitiva)</i>	5%
<i>Media KI-67 (recidiva)</i>	9,5%
<i>Mediana KI-67 (recidiva)</i>	8%

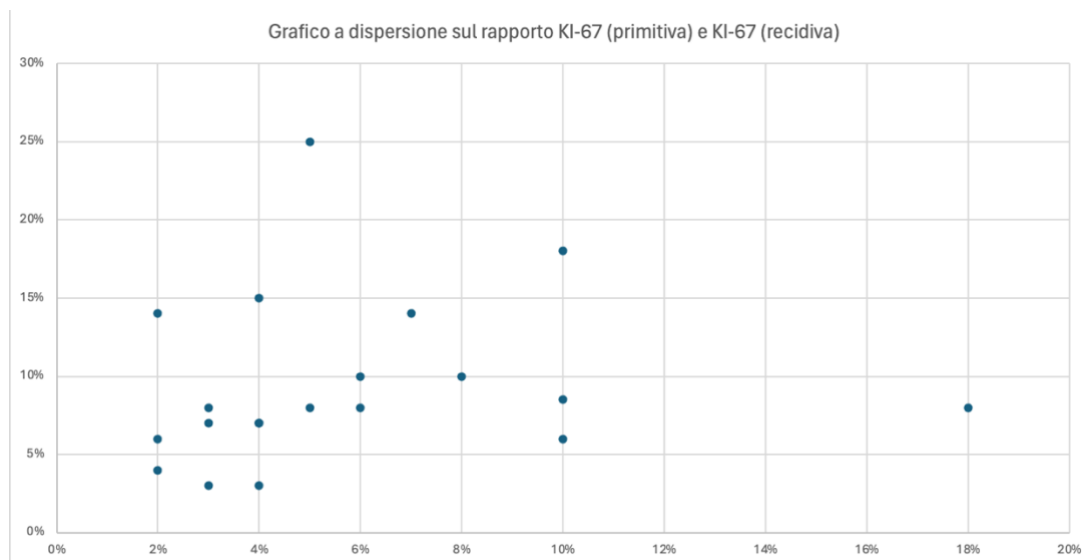
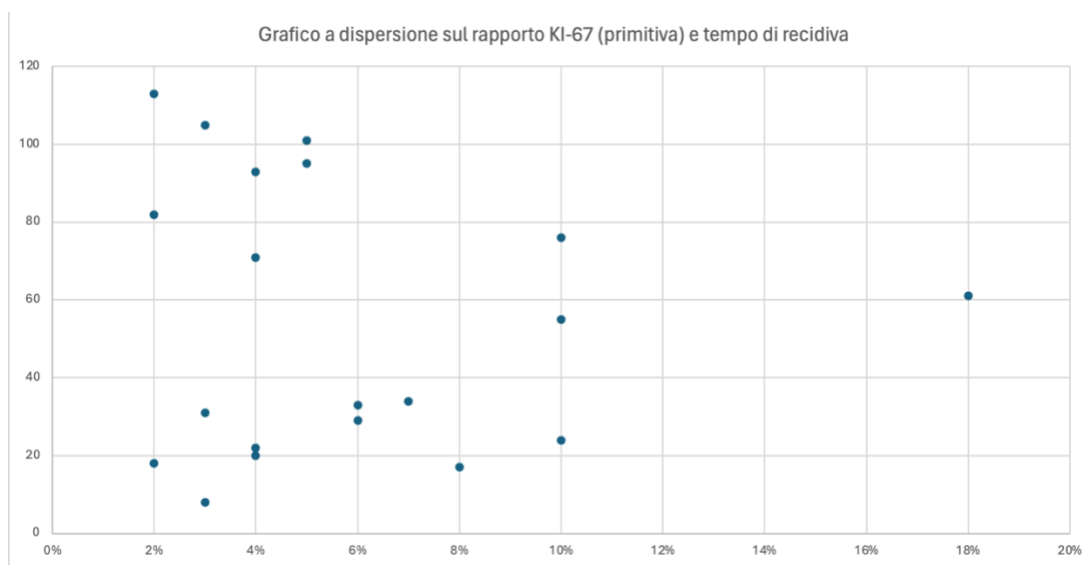
Tabella 7: analisi descrittiva del KI-67

Di seguito la tabella con tutti i dati relativi all'indice di proliferazione, per tutti i pazienti e per tutte le lesioni in analisi.

KI-67 primitiva (%)	KI-67 recidiva (%)
6	8
10	18
10	8,5
4	3 (prima recidiva) 8 (seconda recidiva)
4	7
2	14
7	14
4	7
3	3
2	6
8	10
2	4
3	7
5	8
10	6
18	8
5	25
6	10
4	15

Tabella 8: valori dell'indice di proliferazione in studio

L'analisi ha portato poi allo studio di una possibile correlazione tra i valori dell'indice di proliferazione, nel tumore primitivo e nella recidiva, e il tempo di recidiva. I test di scelta nello studio della correlazione tra due variabili sono quelli di Pearson e Spearman. Data la non linearità delle variabili, il test di riferimento è quello di Spearman. I risultati sono riportati nella tabella seguente.



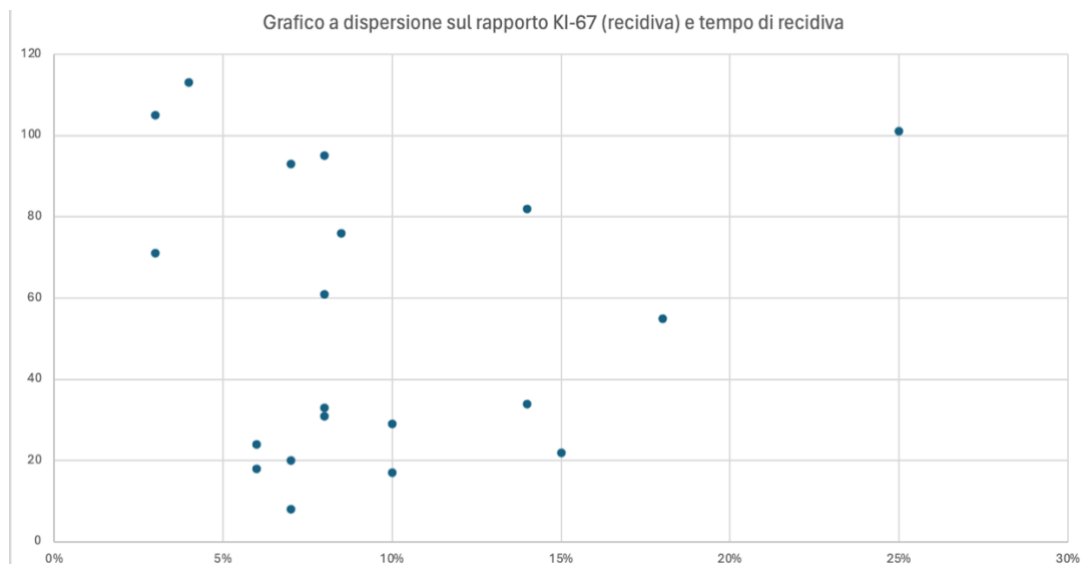


Fig. 14: Grafici a dispersione che dimostrano la non linearità delle variabili

Coefficiente di correlazione di Pearson	Valori	
	N.	p-value
<i>Correlazione tra il KI-67 della primitività e il KI67 della recidiva</i>	0,39	0,09
<i>Correlazione tra il KI-67 della primitività e il tempo di recidiva</i>	0,10	0,66
<i>Correlazione tra il KI-67 della recidiva e il tempo di recidiva</i>	-0,06	0,79

Tabella 9: Correlazione di Pearson

Da questa analisi si evince che non ci sono evidenze statisticamente significative che suggeriscano una correlazione forte tra il KI-67 del tumore primario e della recidiva, né tra il KI67 (primario o recidiva) e il tempo di recidiva nei dati a disposizione, in quanto il p-value risulta maggiore di 0,05 in tutti e 3 i casi. Allo stesso tempo le relazioni tra le variabili risultano essere comunque deboli.

L'indagine successiva è un test delle differenze effettuato con il test di Wilcoxon con l'obiettivo di studiare se fosse presente una differenza significativa tra i valori del KI-67 tra la primitività e la recidiva.

È stato utilizzato il test di Wilcoxon e non il t-test in quanto i valori non presentano una distribuzione normale.

Di seguito i risultati:

Test di Wilcoxon	Valori	
	N.	p-value
	29,5	0,008

Tabella 10: Test di Wilcoxon

Poiché il p-value è inferiore a 0.05, possiamo rifiutare l'ipotesi nulla e concludere che c'è una differenza significativa tra i valori di Ki67 nel tumore primario e nella recidiva.

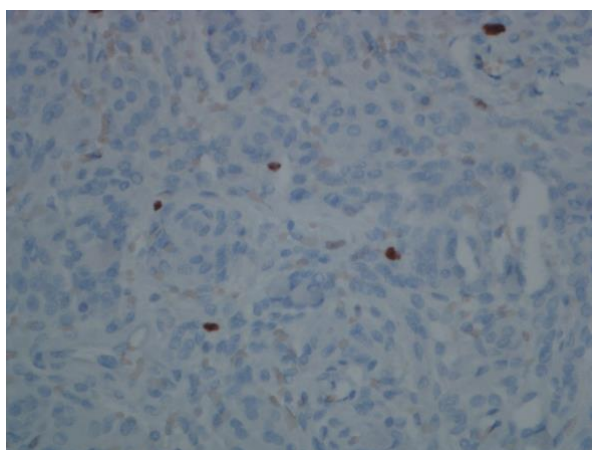


Fig.15: studio immunoistochimico dell'indice di proliferazione. In questo caso il KI-67 è del 2%. L'ingrandimento utilizzato nello studio è 40x.

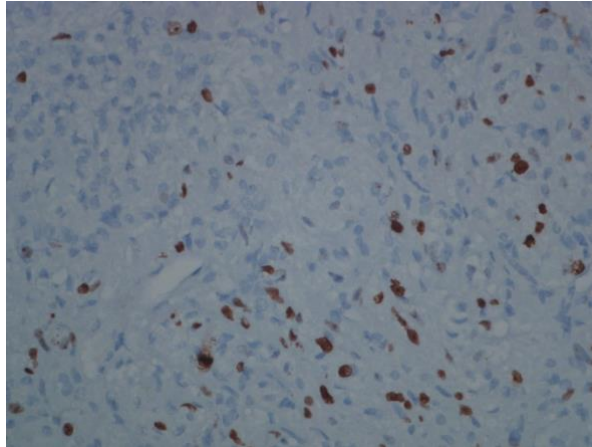


Fig.16: studio immunoistochimico dell'indice di proliferazione. In questo caso il KI-67 è del 18%. L'ingrandimento utilizzato nello studio è 40x.

Inoltre, in due casi, delle donne giovani (età < 50 anni al momento della prima diagnosi), si è studiata la positività ai recettori per estrogeno e progesterone (ER e PR), sia nella lesione primitiva che nella recidiva.

I dati sono riportati in tabella:

Dati	Valori (%)			
	ER (primitiva)	PR (primitiva)	ER (recidiva)	PR (recidiva)
<i>Primo caso</i>	0	75	0	65
<i>Secondo caso</i>	0	20	5	35

Tabella 11: Valori di ER e PR

Avendo a disposizione solo due casi, le analisi statistiche risultano non statisticamente significative.

Nel primo caso il tempo di recidiva è risultato essere di 105 mesi contro i 18 mesi del secondo caso. Ciò porta a pensare che, almeno nel contesto di questo studio, la positività ai recettori per progesterone ed estrogeni non siano correlati a un pattern mutazionale che possa predire il rischio di recidività.

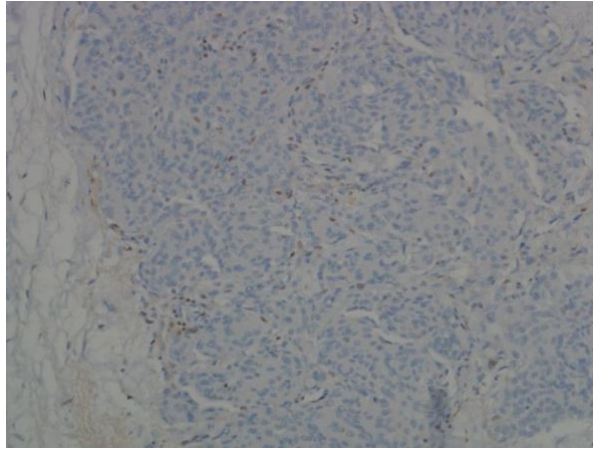


Fig. 17: studio immunoistochimico dell'espressione dei recettori per estrogeno. In questo caso il valore è del 5%. L'ingrandimento dell'immagine è 20x.

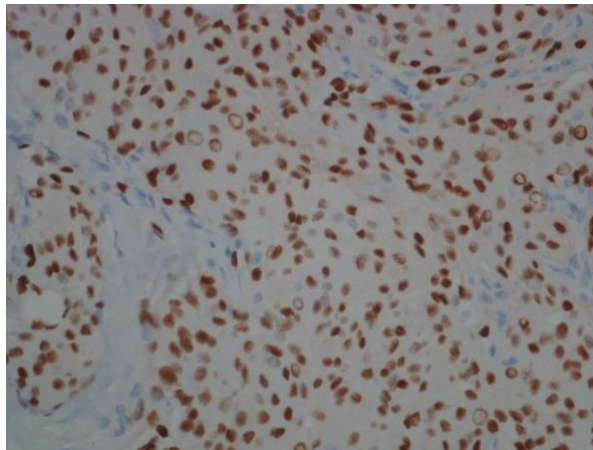


Fig. 18: studio immunoistochimico dell'espressione dei recettori per progesterone. In questo caso il valore è del 75%. L'ingrandimento dell'immagine è 40x.

L'ultima indagine immunoistochimica ha riguardato la valutazione della presenza della trimetilazione sulla lisina 27 dell'istone 3 (H3K27me3).

L'anticorpo utilizzato nello studio si lega all'istone 3 soltanto se è presente la trimetilazione a livello della lisina 27, mentre non riconosce l'istone nelle condizioni in cui questo profilo di metilazione è alterato (perdita completa della metilazione, lisina mono-metilata, lisina di-metilata o presenza della trimetilazione sulla lisina 4, lisina 9 o lisina 36).

Conseguentemente la valutazione è stata effettuata in maniera dicotomica: i campioni che all'indagine immunoistochimica presentavano una mancata colorazione nella totalità delle cellule della lesione rappresentano i campioni con perdita della trimetilazione della lisina 27; contrariamente l'avvenuta colorazione di cellule neoplastiche all'interno della lesione corrisponde a un mantenimento della fisiologica trimetilazione sulla lisina in questione.

Contestualmente, nello studio dei campioni classificati come casi con perdita della trimetilazione, si è valutata l'avvenuta colorazione di cellule di origine vasale, come controllo negativo all'interno del campione stesso.

I dati sono riportati nella seguente tabella:

Paziente	Loss of H3K27me3		Tempo di recidiva
	primitiva	recidiva	
1	+	+	33 mesi
2	-	-	55 mesi
3	-	-	76 mesi
4	+	+	71 mesi (prima recidiva) 31 mesi (tempo tra la prima e la seconda recidiva)
5	+	+	20 mesi
6	+	-	82 mesi
7	-	-	34 mesi
8	+	+	93 mesi
9	+	-	105 mesi
10	+	+	18 mesi
11	+	+	17 mesi
12	+	-	113 mesi
13	+	+	8 mesi
14	+	+	95 mesi
15	-	-	24 mesi
16	-	-	61 mesi
17	-	-	101 mesi
18	-	-	29 mesi
19	-	-	22 mesi

Tabella 12: Valori di Loss of H3K27me3. La legenda è: '+' significa "Perdita della trimetilazione", '-' significa "Presenza della fisiologica trimetilazione". I casi di meningioma primitivo che presentano una perdita della trimetilazione sono 11 (58%). Considerando la recidiva invece i casi con perdita della trimetilazione si riducono a 9 (45%).

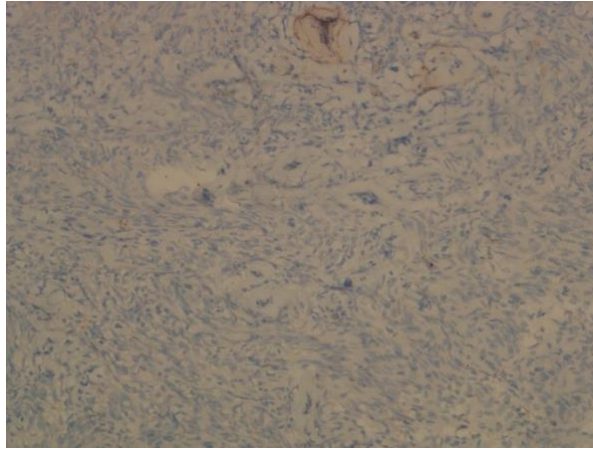


Fig. 19: studio immunohistochimico dello status della trimetilazione della lisina 27 dell'istone H3. In questo caso nessuna cellula risulta positiva, per cui è presente una perdita della trimetilazione. L'ingrandimento dell'immagine è 20x.

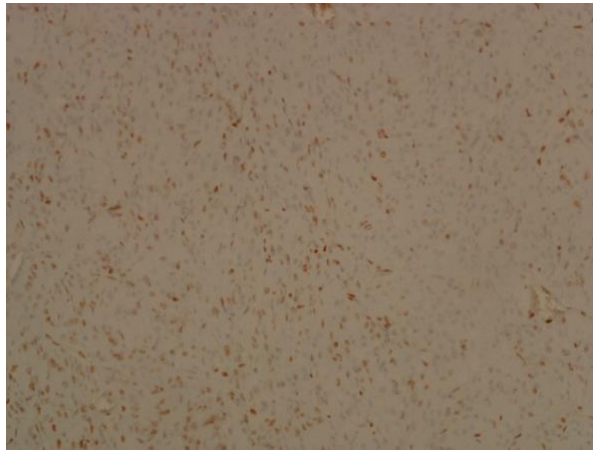


Fig. 20: studio immunohistochimico dello status della trimetilazione della lisina 27 dell'istone H3. In questo caso si vede una diffusa colorazione, sintomo della normale espressione della trimetilazione. L'ingrandimento dell'immagine è 20x.

Il grafico sottostante inoltre testimonia che i tempi di recidiva non sono distribuiti normalmente, non seguono cioè l'andamento di una curva gaussiana.

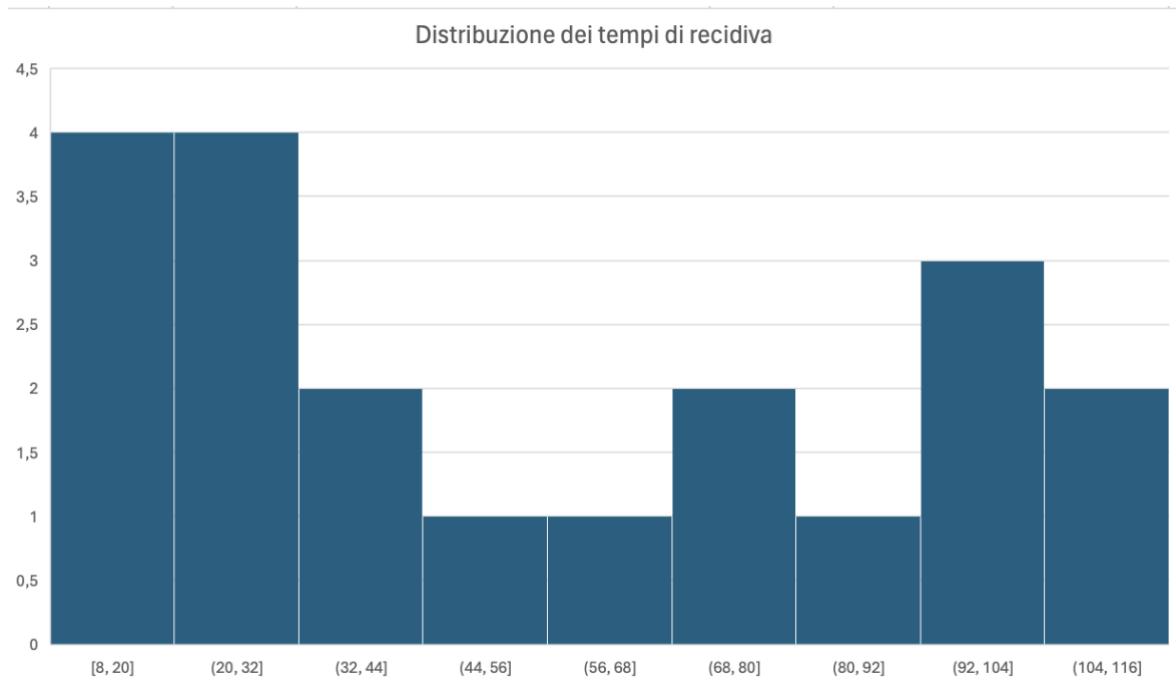


Fig. 21: Istogramma di riepilogo dei tempi di recidiva. I valori sull'asse delle ascisse sono i tempi di recidiva, espressi in mesi e raggruppati a gruppi di 12 mesi. I valori sull'asse delle ordinate sono i numeri di casi che rientrano nell'intervallo temporale identificato in ascisse.

Al fine di valutare se esiste una relazione significativa tra lo stato della metilazione della lisina 27 nella lesione primitiva e nella recidiva, l'esame di scelta è il test chi-quadrato.

Test chi-quadrato	Valori	
	N.	p-value
	8,089	0,00445

Tabella 13: Test chi-quadrato

Basandosi sui risultati ottenuti, si può concludere che c'è evidenza statistica a favore dell'ipotesi che lo status della trimetilazione dell'istone 3 nella lesione primitiva sia associato allo status nella recidiva. Questo è supportato dal valore basso del p-value, che indica che è improbabile che le differenze osservate siano dovute al caso. Pertanto, il test del chi-quadrato suggerisce che esiste una relazione significativa tra queste due variabili categoriali.

In ultima istanza si è confrontato il tempo di sviluppo di una recidiva nei pazienti la cui lesione primitiva presentava una perdita della trimetilazione, e nei pazienti con una espressione fisiologica della trimetilazione dell'istone 3.

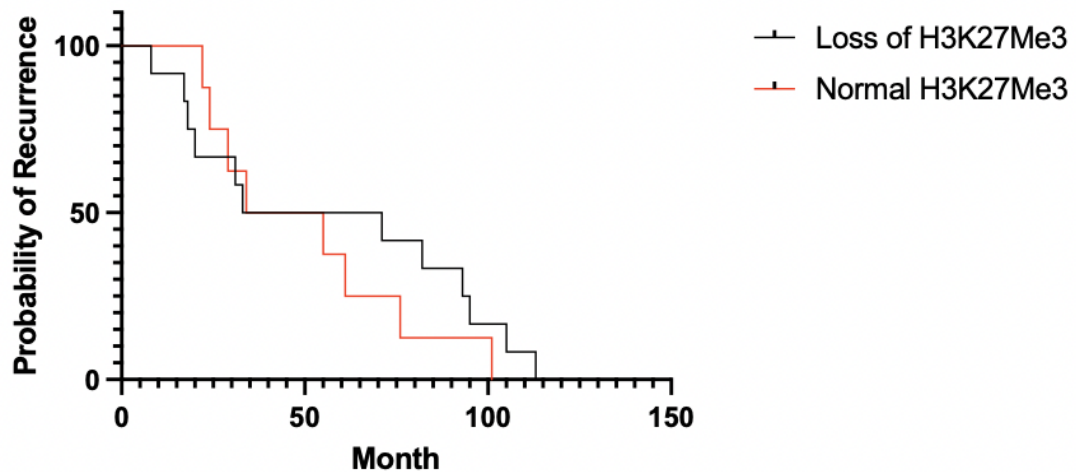


Fig. 22: Curva di confronto tra il tempo libero da recidiva nei casi con una normale espressione della trimetilazione e nei casi con la perdita della stessa.

Alla realizzazione della precedente analisi di sopravvivenza è seguito uno studio con il Log-Rank test al fine di confrontare le due curve.

Test Log-Rank test	Valori
	p-value
	0,4866

Tabella. 14: Test Log-Rank test

Il p-value alto dal Log-Rank Test indica che non abbiamo sufficienti evidenze per concludere che ci siano differenze significative nelle curve di sopravvivenza tra i pazienti con diversi stati di trimetilazione dell'istone 3 nella lesione primaria. Questo suggerisce che, dal punto di vista della sopravvivenza, non vi è un'associazione statisticamente significativa tra lo stato della trimetilazione dell'istone 3 e il tempo di recidiva nei pazienti inclusi nello studio.

d. Analisi dei dati molecolari

L'ultimo ambito di indagine di questo studio è l'ambito molecolare con lo studio dello status mutazionale del promotore di TERT, studiato nelle sole lesioni primitive.

Al fronte dei 19 casi di meningioma primitivo l'analisi molecolare è stata effettuata su 18 casi, mentre un caso è stato escluso a causa della carenza di materiale.

La tabella seguente riporta i risultati dello studio:

Numero caso	Status mutazionale di pTERT
1	Nessuna mutazione, pTERT wild-type
2	Nessuna mutazione, pTERT wild-type
3	Nessuna mutazione, pTERT wild-type
4	Nessuna mutazione, pTERT wild-type
5	Nessuna mutazione, pTERT wild-type
6	Nessuna mutazione, pTERT wild-type
7	Nessuna mutazione, pTERT wild-type
8	Nessuna mutazione, pTERT wild-type
9	Nessuna mutazione, pTERT wild-type
10	Non valutabile per carenza di materiale
11	Nessuna mutazione, pTERT wild-type
12	Nessuna mutazione, pTERT wild-type
13	Nessuna mutazione, pTERT wild-type
14	Mutazione 246 C >T e mutazione 282 C>T
15	Nessuna mutazione, pTERT wild-type
16	Nessuna mutazione, pTERT wild-type
17	Nessuna mutazione, pTERT wild-type
18	Nessuna mutazione, pTERT wild-type
19	Nessuna mutazione, pTERT wild-type

Tabella 15: sintesi dell'analisi molecolare su TERT

Le mutazioni sul promotore di TERT descritte in letteratura, nel contesto dello studio dei meningiomi, sono la 228 C >T e la 250 C >T

Dalla tabella si evince che nella totalità dei casi in studio, le lesioni primitive non presentano una mutazione tipica a livello del promotore di TERT. Suggestendo perciò che la maggior capacità di recidiva delle lesioni in studio non siano dovute ad alterazioni a questo livello.

In un caso si sono riscontrate due mutazioni non canoniche, una mutazione C246T e una C282T.

La mutazione C246T è una mutazione missenso in quanto comporta, a valle del processo di traduzione, la sostituzione della fisiologica glicina con l'arginina.

La mutazione C282T è una mutazione missenso in quanto comporta, a valle del processo di traduzione, la sostituzione della fisiologica glicina con la serina.

Il paziente in questione presenta un tempo di recidiva di 95 mesi, uno dei più alti in studio, dato per cui questa mutazione potrebbe non correlare con una maggior predisposizione della lesione alla recidiva.

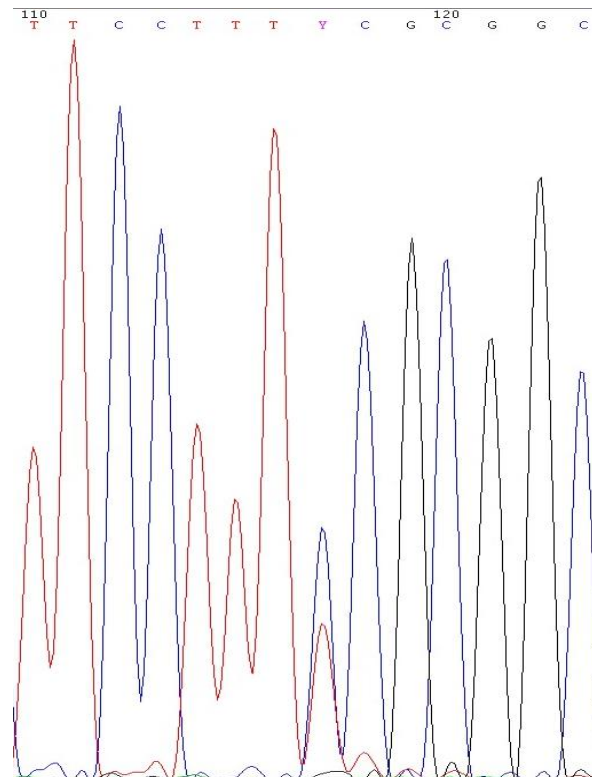


Fig. 23: Elettroferogramma ottenuto in seguito a sequenziamento Sanger. Si può osservare la sostituzione della citosina con la timina, espressa attraverso la sovrapposizione dei due picchi centralmente (la curva rossa rappresenta la timina, la blu la citosina). È la mutazione C282T.

V. Discussione

I meningiomi rappresentano la più frequente neoplasia cerebrale negli adulti. Nella stragrande maggioranza dei casi si tratta di neoplasie benigne, classificate cioè come di grado I WHO, e solo in una minor percentuale presentano un comportamento clinico aggressivo in termini di recidiva (meningiomi atipici o di grado II) o di franco comportamento maligno (meningiomi anaplastici o di grado III).^{1,2} Il comportamento clinico dei meningiomi risulta molto spesso prevedibile in quanto correlato strettamente alla sede, alle dimensioni – che, ovviamente, ne condizionano la radicalità dell'asportazione chirurgica – e soprattutto al grading istologico. Quest'ultimo è basato prevalentemente su parametri morfologici (indice mitotico, infiltrazione del parenchima cerebrale, istotipi specifici, necrosi e atipie cellulari)¹⁰, con l'importante inserimento dello status mutazionale di pTERT e della delezione in omozigosi di CDKN2A/B, introdotti con la classificazione del 2021, che qualora presenti, e indipendentemente dal quadro morfologico determinano una attribuzione al grado III del meningioma.¹¹

Ci sono due aspetti da sottolineare, uno riguarda la valutazione del grading che, come detto, è principalmente basata su parametri morfologici, e quindi soggettivi, cioè soggetti a differenti parametri interpretativi¹³, l'altro riguarda la possibilità di recidiva di meningiomi classificati come grado I istologico, non spiegabile anche in caso di completa asportazione chirurgica del tumore. Ovviamente questo potrebbe dipendere da una sottostima del grading istologico, o, in alternativa, dalla presenza di altri fattori biologici che potrebbero promuovere una recidiva tumorale e giustificare un andamento clinico più aggressivo, anche in presenza di un quadro istologico del tutto rassicurante.

Su questa base abbiamo condotto uno studio retrospettivo su pazienti affetti da meningioma grado I WHO andati incontro a recidiva nella stessa sede del tumore primitivo. Su una coorte iniziale di circa 650 meningiomi ne sono stati selezionati 33, i quali rappresentano i casi di meningioma si grado I WHO, ridotti poi a 19, successivamente all'esclusione dei casi trattati con una resezione subtotale.

Tutti i casi così selezionati sono stati rivalutati istologicamente e riconfermati come appartenenti a grado I WHO. Sono stati inoltre rivalutate istologicamente anche le corrispondenti recidive neoplastiche. Tenendo conto dei dati di letteratura, nonché delle indicazioni relative all'ultima classificazione WHO 2021 abbiamo effettuato analisi molecolare per la ricerca delle mutazioni del promotore di TERT che conferiscono, non solo nei meningiomi, ma anche in altri setting tumorali, una prognosi decisamente

peggiore.^{33,34} Solo in un caso sono state rilevate due mutazioni non canoniche di pTERT di significato clinico non noto: questo caso, per altro, ha mostrato una comparsa di recidiva in un tempo estremamente prolungato (95 mesi) e pertanto queste mutazioni non sembrano avere un significato clinico peggiorativo.

Assai più interessante è risultata invece la valutazione immunohistochimica dello status di trimetilazione della lisina 27 dell'istone 3 (H3K27me3).

La deregolazione della metilazione di H3K27 è associata a comportamento aggressivo in differenti tipi di neoplasie, quali quelle mammarie, della prostata, del colon e soprattutto nei gliomi del sistema nervoso centrale, nei quali la sola presenza di tale alterazione conferisce al glioma stesso una prognosi infausta e a cui viene attribuito un grado IV WHO.¹²⁰

Nella nostra casistica la perdita della trimetilazione della lisina 27 dell'istone 3 di meningiomi di grado I recidivati risulta essere molto alta (il 58%) e tale status si mantiene complessivamente nelle recidive. Questo dato rafforza quanto riportato in letteratura da vari autori dai quali risulta un incrementato tasso di recidiva per i meningiomi di grado II, più raramente di grado I, ma non per i meningiomi di grado III.^{30,120,121} La peggior prognosi associata alla perdita della trimetilazione dell'istone 3 potrebbe essere correlata al fatto che la funzione fisiologica della normale presenza della trimetilazione sia l'inibizione dell'espressione di determinati geni che, se non sottoposti a meccanismi di controllo favoriscono i processi di cancerogenesi. In particolare, questa trimetilazione è coinvolta nell'espressione di geni del riparo del dsDNA con meccanismi di ricombinazione omologa.¹²⁰

Peraltro, la maggior parte degli studi si riferiscono al tasso di recidiva nei meningiomi di grado II con solo pochi casi inseriti in studi, anche ampi, relativi a meningiomi di grado I.

VI. Conclusioni

Dai risultati del nostro studio, seppur condotto su una casistica relativamente limitata, sembrerebbe emergere l'importanza della valutazione dello status di metilazione della lisina 27 dell'istone H3 con metodica immunohistochimica, possibilmente da effettuare anche su tutti i casi di meningioma di grado I, quale parametro predittivo di possibile recidiva neoplastica.

Infatti, la sola radicalità della escissione chirurgica, peraltro ottenuta in tutti i casi da noi studiati, che risultavano essere nettamente prevalenti in sedi chirurgicamente accessibili, e la valutazione del grading istologico, non sembrano sufficienti per un corretto inquadramento del comportamento biologico dei meningiomi morfologicamente non aggressivi.

VII. Bibliografia

1. Ogasawara, C., Philbrick, B. D. & Adamson, D. C. Meningioma: A review of epidemiology, pathology, diagnosis, treatment, and future directions. *Biomedicines* vol. 9 (2021).
2. Ostrom, Q. T. *et al.* CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro-Oncology* vol. 21 (2019).
3. Phillips, D., Auguste, K. I. & Gupta, N. Meningiomas in children. in *Handbook of Clinical Neurology* vol. 169 (2020).
4. Thevandiran, D. *et al.* Paediatric meningiomas in Singapore — Case series of a rare entity. *J. Clin. Neurosci.* **73**, (2020).
5. Bi, W. L., Prabhu, V. C. & Dunn, I. F. High-grade meningiomas: Biology and implications. *Neurosurg. Focus* **44**, (2018).
6. Ostrom, Q. T. *et al.* Relative survival after diagnosis with a primary brain or other central nervous system tumor in the National Program of Cancer Registries, 2004 to 2014. *Neuro-Oncology Pract.* **7**, (2020).
7. Torp, S. H., Solheim, O. & Skjulsvik, A. J. The WHO 2021 Classification of Central Nervous System tumours: a practical update on what neurosurgeons need to know— a minireview. *Acta Neurochir. (Wien)*. **164**, 2453–2464 (2022).
8. Goldbrunner, R. *et al.* EANO guideline on the diagnosis and management of meningiomas. *Neuro. Oncol.* **23**, (2021).
9. Maggio, I. *et al.* Discovering the molecular landscape of meningioma: The struggle to find new therapeutic targets. *Diagnostics* **11**, 1–12 (2021).
10. Louis, D. N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* vol. 131 (2016).
11. 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 (2022).
12. Toland, A., Huntoon, K. & Dahiya, S. M. Meningioma: A Pathology Perspective. *Neurosurgery* vol. 89 at <https://doi.org/10.1093/neuros/nyab001> (2021).
13. Rogers, C. L. *et al.* Pathology concordance levels for meningioma classification and grading in NRG Oncology RTOG Trial 0539. *Neuro. Oncol.* **18**, (2016).
14. Sahm, F. *et al.* DNA methylation-based classification and grading system for

- meningioma: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol.* **18**, (2017).
15. Birzu, C., Peyre, M. & Sahm, F. Molecular alterations in meningioma: prognostic and therapeutic perspectives. *Current Opinion in Oncology* vol. 32 at (2020).
 16. Choy, W. C. *et al.* The molecular genetics and tumor pathogenesis of meningiomas and the future directions of meningioma treatments. *Neurosurgical Focus* vol. 30 at <https://doi.org/10.3171/2011.2.FOCUS11116> (2011).
 17. Brastianos, P. K. *et al.* Genomic sequencing of meningiomas identifies oncogenic SMO and AKT1 mutations. *Nat. Genet.* **45**, (2013).
 18. Wellenreuther, R. *et al.* Analysis of the neurofibromatosis 2 gene reveals molecular variants of meningioma. *Am. J. Pathol.* **146**, (1995).
 19. Clark, V. E. *et al.* Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO. *Science (80-.)*. **339**, (2013).
 20. Boetto, J., Bielle, F., Sanson, M., Peyre, M. & Kalamarides, M. SMO mutation status defines a distinct and frequent Molecular subgroup in olfactory groove meningiomas. *Neuro. Oncol.* **19**, (2017).
 21. Narang, A., Maheshwari, C., Aggarwal, V., Bansal, P. & Singh, P. Gorlin-Goltz Syndrome with Intracranial Meningioma: Case Report and Review of Literature. *World Neurosurg.* **133**, (2020).
 22. Yuzawa, S. *et al.* Clinical impact of targeted amplicon sequencing for meningioma as a practical clinical-sequencing system. *Mod. Pathol.* **29**, (2016).
 23. Aizer, A. A. *et al.* A prognostic cytogenetic scoring system to guide the adjuvant management of patients with atypical meningioma. *Neuro. Oncol.* **18**, (2016).
 24. Reuss, D. E. *et al.* Secretory meningiomas are defined by combined KLF4 K409Q and TRAF7 mutations. *Acta Neuropathol.* **125**, (2013).
 25. Clark, V. E. *et al.* Recurrent somatic mutations in POLR2A define a distinct subset of meningiomas. *Nat. Genet.* **48**, (2016).
 26. Shankar, G. M. *et al.* Germline and somatic BAP1 mutations in high-grade rhabdoid meningiomas. *Neuro. Oncol.* **19**, (2017).
 27. Shah, A. A., Bourne, T. D. & Murali, R. BAP1 protein loss by immunohistochemistry: A potentially useful tool for prognostic prediction in patients with uveal melanoma. *Pathology* **45**, (2013).
 28. Koopmans, A. E. *et al.* Clinical significance of immunohistochemistry for detection of BAP1 mutations in uveal melanoma. *Mod. Pathol.* **27**, (2014).
 29. Williams, E. A. *et al.* Frequent inactivating mutations of the PBAF complex gene

- PBRM1 in meningioma with papillary features. *Acta Neuropathol.* **140**, (2020).
30. Samal, S., Patnaik, A., Sahu, F. M. & Purkait, S. Altered expression of epigenetic modifiers EZH2, H3K27me3, and DNA methyltransferases in meningiomas—Prognostic biomarkers for routine practice. *Folia Neuropathol.* **58**, (2020).
 31. Juratli, T. A. *et al.* DMD genomic deletions characterize a subset of progressive/higher-grade meningiomas with poor outcome. *Acta Neuropathol.* **136**, (2018).
 32. Georgescu, M. M. *et al.* Mutation status and epithelial differentiation stratify recurrence risk in chordoid meningioma—a multicenter study with high prognostic relevance. *Cancers (Basel).* **12**, (2020).
 33. Goutagny, S. *et al.* High incidence of activating TERT promoter mutations in meningiomas undergoing malignant progression. *Brain Pathol.* **24**, (2014).
 34. Huang, F. W. *et al.* Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science (80-.).* **339**, (2013).
 35. Sahm, F. *et al.* TERT Promoter Mutations and Risk of Recurrence in Meningioma. *J. Natl. Cancer Inst.* **108**, (2016).
 36. Lu, V. M. *et al.* The prognostic significance of TERT promoter mutations in meningioma: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neuro-Oncology* vol. 142 at <https://doi.org/10.1007/s11060-018-03067-x> (2019).
 37. Mellai, M. *et al.* Human tert promoter mutations in atypical and anaplastic meningiomas. *Diagnostics* **11**, 1–14 (2021).
 38. Heaphy, C. M. *et al.* Prevalence of the alternative lengthening of telomeres telomere maintenance mechanism in human cancer subtypes. *Am. J. Pathol.* **179**, (2011).
 39. Kim, M. S. *et al.* Results of immunohistochemical staining for cell cycle regulators predict the recurrence of atypical meningiomas. *J. Neurosurg.* **121**, (2014).
 40. Guyot, A. *et al.* Analysis of CDKN2A gene alterations in recurrent and non-recurrent meningioma. *J. Neurooncol.* **145**, (2019).
 41. Gauchotte, G. *et al.* Prognostic value of histopathological features and loss of H3K27me3 immunolabeling in anaplastic meningioma: A multicenter retrospective study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **79**, 754–762 (2020).
 42. Katz, L. M. *et al.* Loss of histone H3K27me3 identifies a subset of meningiomas with increased risk of recurrence. *Acta Neuropathol.* **135**, (2018).
 43. Bi, W. L. *et al.* Genomic landscape of high-grade meningiomas. *npj Genomic Med.* **2**, (2017).

44. Yuzawa, S., Nishihara, H. & Tanaka, S. Genetic landscape of meningioma. *Brain Tumor Pathol.* **33**, (2016).
45. Al-Mefty, O., Kersh, J. E., Routh, A. & Smith, R. R. The long-term side effects of radiation therapy for benign brain tumors in adults. *J. Neurosurg.* **73**, (1990).
46. Umansky, F., Shoshan, Y., Rosenthal, G., Fraifeld, S. & Spektor, S. Radiation-induced meningioma. *Neurosurgical Focus* vol. 24 (2008).
47. Zhang, D. *et al.* Body mass index and risk of brain tumors: A systematic review and dose-response meta-analysis. *European Journal of Clinical Nutrition* vol. 70 at <https://doi.org/10.1038/ejcn.2016.4> (2016).
48. Takahashi, H. *et al.* Mendelian randomization provides support for obesity as a risk factor for meningioma. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
49. Korhonen, K. *et al.* Female predominance in meningiomas can not be explained by differences in progesterone, estrogen, or androgen receptor expression. *J. Neurooncol.* **80**, (2006).
50. Qi, Z. Y. *et al.* Reproductive and exogenous hormone factors in relation to risk of meningioma in women: A meta-analysis. *PLoS One* **8**, (2013).
51. Shu, X. *et al.* Association of hormone replacement therapy with increased risk of meningioma in women: A hospital-based multicenter study with propensity score matching. *Asia. Pac. J. Clin. Oncol.* **15**, (2019).
52. Ji, Y. *et al.* Double-blind phase III randomized trial of the antiprogestin agent mifepristone in the treatment of unresectable meningioma: SWOG s9005. in *Journal of Clinical Oncology* vol. 33 (2015).
53. Samanic, C. M. *et al.* Occupational exposure to pesticides and risk of adult brain tumors. *Am. J. Epidemiol.* **167**, (2008).
54. Wiemels, J. L. *et al.* Reduced allergy and immunoglobulin e among adults with intracranial meningioma compared to controls. *International Journal of Cancer* vol. 129 at <https://doi.org/10.1002/ijc.25858> (2011).
55. Ren, Y., Chari, D. A., Vasilijic, S., Welling, D. B. & Stankovic, K. M. New developments in neurofibromatosis type 2 and vestibular schwannoma. *Neuro-Oncology Adv.* **3**, (2021).
56. Goutagny, S. *et al.* Long-term follow-up of 287 meningiomas in neurofibromatosis type 2 patients: Clinical, radiological, and molecular features. *Neuro. Oncol.* **14**, (2012).
57. Asgharian, B. *et al.* Meningiomas May Be a Component Tumor of Multiple

- Endocrine Neoplasia Type 1. *Clin. Cancer Res.* **10**, (2004).
58. Vernooij, M. W. *et al.* Incidental Findings on Brain MRI in the General Population. *N. Engl. J. Med.* **357**, (2007).
 59. Wang, N. & Osswald, M. Meningiomas: Overview and New Directions in Therapy. *Seminars in Neurology* vol. 38 (2018).
 60. Meling, T. R., Da Broi, M., Scheie, D. & Helseth, E. Meningiomas: skull base versus non-skull base. *Neurosurg. Rev.* **42**, (2019).
 61. Englot, D. J. *et al.* Seizures in supratentorial meningioma: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurosurgery* vol. 124 (2016).
 62. Marosi, C. *et al.* Meningioma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **67**, 153–171 (2008).
 63. Bellot, L., Le Guyader, F. & Mouriaux, F. Foster Kennedy syndrome secondary to a large meningioma. *Journal Francais d'Ophthalmologie* vol. 42 (2019).
 64. Pintea, B. *et al.* Differences in clinical presentation, intraoperative findings and outcome between petroclival and lateral posterior pyramid meningioma. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **141**, (2016).
 65. Ian R. Whittle, Colin Smith, Parthiban Navoo, D. C. Meningiomas. *Lancet Neurol.* (2004).
 66. Bošnjak, R., Derham, C., Popović, M. & Ravnik, J. Spontaneous intracranial meningioma bleeding: Clinicopathological features and outcome. *J. Neurosurg.* **103**, (2005).
 67. Nowosielski, M. *et al.* Diagnostic challenges in meningioma. *Neuro. Oncol.* **19**, (2017).
 68. Goldbrunner, R. *et al.* EANO guideline on the diagnosis and management of meningiomas. *Neuro. Oncol.* **23**, 1821–1834 (2021).
 69. Huang, R. Y. *et al.* Imaging and diagnostic advances for intracranial meningiomas. *Neuro. Oncol.* **21**, (2019).
 70. Nagai Yamaki, V. *et al.* Dural-based lesions: is it a meningioma? *Neuroradiology* **63**, (2021).
 71. Lyndon, D., Lansley, J. A., Evanson, J. & Krishnan, A. S. Dural masses: meningiomas and their mimics. *Insights into Imaging* vol. 10 (2019).
 72. Buerki, R. A. *et al.* An overview of meningiomas. *Future Oncology* vol. 14 (2018).
 73. Galldiks, N., Lohmann, P., Albert, N. L., Tonn, J. C. & Langen, K. J. Current status of PET imaging in neuro-oncology. *Neuro-Oncology Adv.* **1**, (2019).
 74. Boulagnon-Rombi, C. *et al.* Immunohistochemical approach to the differential

- diagnosis of meningiomas and their mimics. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **76**, (2017).
75. Menke, J. R. *et al.* Somatostatin receptor 2a is a more sensitive diagnostic marker of meningioma than epithelial membrane antigen. *Acta Neuropathologica* vol. 130 (2015).
 76. Perry, A., Scheithauer, B. W. & Nascimento, A. G. The immunophenotypic spectrum of meningeal hemangiopericytoma: A comparison with fibrous meningioma and solitary fibrous tumor of meninges. *Am. J. Surg. Pathol.* **21**, (1997).
 77. Tihan, T., Viglione, M., Rosenblum, M. K., Olivi, A. & Burger, P. C. *Solitary Fibrous Tumors in the Central Nervous System A Clinicopathologic Review of 18 Cases and Comparison to Meningeal Hemangiopericytomas.* *Arch Pathol Lab Med* vol. 127 (2003).
 78. Parajón, A. & Vaquero, J. Meningeal intracranial epithelioid hemangioendothelioma: Case report and literature review. *J. Neurooncol.* **88**, (2008).
 79. Carney, E. M. *et al.* PAX2(-)/PAX8(-)/inhibin A(+) immunoprofile in hemangioblastoma: A helpful combination in the differential diagnosis with metastatic clear cell renal cellcarcinoma to the central nervous system. *Am. J. Surg. Pathol.* **35**, (2011).
 80. Wang, F., Qiao, G., Lou, X., Song, X. & Chen, W. Malignant transformation of intracranial meningeal melanocytoma. Case report and review of the literature. *Neuropathology* **31**, (2011).
 81. Tang, Y. *et al.* Correlation of apparent diffusion coefficient with Ki-67 proliferation index in grading meningioma. *Am. J. Roentgenol.* **202**, (2014).
 82. Abry, E., Thomassen, I. T., Salvesen, Ø. O. & Torp, S. H. The significance of Ki-67/MIB-1 labeling index in human meningiomas: A literature study. *Pathol. Res. Pract.* **206**, (2010).
 83. Yang, C. *et al.* Ki67 targeted strategies for cancer therapy. *Clinical and Translational Oncology* vol. 20 (2018).
 84. Kamranzadeh, H. *et al.* Association between Ki-67 expression and clinicopathological features in prognosis of breast cancer: A retrospective cohort study. *J. Res. Med. Sci.* **24**, (2019).
 85. Liu, N., Song, S. Y., Jiang, J. B., Wang, T. J. & Yan, C. X. The prognostic role of Ki-67/MIB-1 in meningioma: A systematic review with meta-analysis. *Medicine*

- (United States) vol. 99 (2020).
86. Telugu, R. B. *et al.* Histopathological and immunohistochemical evaluation of meningiomas with reference to proliferative markers p53 and Ki-67. *J. Clin. Diagnostic Res.* **10**, (2016).
 87. Lee, E. J., Park, J. H., Park, E. S. & Kim, J. H. “Wait-and-See” Strategies for Newly Diagnosed Intracranial Meningiomas Based on the Risk of Future Observation Failure. *World Neurosurg.* **107**, (2017).
 88. Zhao, L. *et al.* An Overview of Managements in Meningiomas. *Frontiers in Oncology* vol. 10 (2020).
 89. Ehresman, J. S. *et al.* The Relevance of Simpson Grade Resections in Modern Neurosurgical Treatment of World Health Organization Grade I, II, and III Meningiomas. *World Neurosurg.* **109**, (2018).
 90. Materi, J., Mampre, D., Ehresman, J., Rincon-Torroella, J. & Chaichana, K. L. Predictors of recurrence and high growth rate of residual meningiomas after subtotal resection. *J. Neurosurg.* **134**, (2021).
 91. Chotai, S. & Schwartz, T. H. The Simpson Grading: Is It Still Valid? *Cancers* vol. 14 at <https://doi.org/10.3390/cancers14082007> (2022).
 92. Paulsen, F. *et al.* Fractionated stereotactic radiotherapy in patients with optic nerve sheath meningioma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **82**, (2012).
 93. Song, D. *et al.* Postoperative Adjuvant Radiotherapy in Atypical Meningioma Patients: A Meta-Analysis Study. *Frontiers in Oncology* vol. 11 (2021).
 94. Karsy, M., Guan, J., Cohen, A., Colman, H. & Jensen, R. L. Medical Management of Meningiomas. Current Status, Failed Treatments, and Promising Horizons. *Neurosurgery Clinics of North America* vol. 27 at (2016).
 95. Le Rhun, E., Taillibert, S. & Chamberlain, M. C. Systemic therapy for recurrent meningioma. *Expert Review of Neurotherapeutics* vol. 16 (2016).
 96. Lekanne Deprez, R. H. *et al.* Frequent NF2 gene transcript mutations in sporadic meningiomas and vestibular schwannomas. *Am. J. Hum. Genet.* **54**, (1994).
 97. Pachow, D. *et al.* MTORC1 inhibitors suppress meningioma growth in mouse models. *Clin. Cancer Res.* **19**, (2013).
 98. Shapiro, I. M. *et al.* Merlin deficiency predicts FAK inhibitor sensitivity: A synthetic lethal relationship. *Sci. Transl. Med.* **6**, (2014).
 99. Brastianos, P. K. *et al.* Alliance A071401: Phase II Trial of Focal Adhesion Kinase Inhibition in Meningiomas with Somatic NF2 Mutations. *J. Clin. Oncol.* **41**, (2023).

100. Von Spreckelsen, N. *et al.* KLF4 K409Q-mutated meningiomas show enhanced hypoxia signaling and respond to mTORC1 inhibitor treatment. *Acta Neuropathol. Commun.* **8**, (2020).
101. Weller, M. *et al.* Durable control of metastatic AKT1-Mutant WHO grade 1 meningothelial meningioma by the AKT inhibitor, AZD5363. *J. Natl. Cancer Inst.* **109**, (2017).
102. Shankar, G. M. & Santagata, S. BAP1 mutations in high-grade meningioma: Implications for patient care. *Neuro. Oncol.* **19**, (2017).
103. Graillon, T. *et al.* Octreotide therapy in meningiomas: In vitro study, clinical correlation, and literature review. *Journal of Neurosurgery* vol. 127 at <https://doi.org/10.3171/2016.8.JNS16995> (2017).
104. Terabe, M. & Wu, J. Rethinking immunotherapy in meningiomas. *Neuro-Oncology* vol. 23 (2021).
105. Yeung, J. *et al.* Targeting the CSF1/CSF1R axis is a potential treatment strategy for malignant meningiomas. *Neuro. Oncol.* **23**, (2021).
106. Garzon-Muvdi, T., Bailey, D. D., Pernik, M. N. & Pan, E. Basis for Immunotherapy for Treatment of Meningiomas. *Front. Neurol.* **11**, 1–11 (2020).
107. Gooden, M. J. M., De Bock, G. H., Leffers, N., Daemen, T. & Nijman, H. W. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: A systematic review with meta-analysis. *British Journal of Cancer* vol. 105 (2011).
108. Proctor, D. T. *et al.* Identification of PD-L2, B7-H3 and CTLA-4 immune checkpoint proteins in genetic subtypes of meningioma. *Oncoimmunology* **8**, (2019).
109. Du, Z. *et al.* Increased expression of the immune modulatory molecule PDL1 (CD274) in anaplastic meningioma. *Oncotarget* **6**, (2015).
110. Fang, L. *et al.* The immune cell infiltrate populating meningiomas is composed of mature, antigen-experienced T and B cells. *Neuro. Oncol.* **15**, (2013).
111. Wach, J. *et al.* Proliferative Potential, and Inflammatory Tumor Microenvironment in Meningioma Correlate with Neurological Function at Presentation and Anatomical Location—From Convexity to Skull Base and Spine. *Cancers (Basel)*. **14**, (2022).
112. Berghoff, A. S. *et al.* Prognostic impact of genetic alterations and methylation classes in meningioma. *Brain Pathology* vol. 322022).
113. Garzon-Muvdi, T., Bailey, D. D., Pernik, M. N. & Pan, E. Basis for Immunotherapy for Treatment of Meningiomas. *Frontiers in Neurology* vol. 11 (2020).

114. Haddad, A. F. *et al.* WHO Grade I Meningioma Recurrence: Identifying High Risk Patients Using Histopathological Features and the MIB-1 Index. *Front. Oncol.* **10**, (2020).
115. Teranishi, Y. *et al.* Clinical significance of NF2 alteration in grade I meningiomas revisited; prognostic impact integrated with extent of resection, tumour location, and Ki-67 index. *Acta Neuropathol. Commun.* **10**, (2022).
116. Youngblood, M. W. *et al.* Associations of meningioma molecular subgroup and tumor recurrence. *Neuro. Oncol.* **23**, (2021).
117. Kessler, R. A. *et al.* Metastatic Atypical and Anaplastic Meningioma: A Case Series and Review of the Literature. *World Neurosurg.* **101**, (2017).
118. Mawrin, C. & Perry, A. Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *Journal of Neuro-Oncology* vol. 99 at <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0342-2> (2010).
119. Louis, D. N. *et al.* The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Neuro. Oncol.* **23**, 1231–1251 (2021).
120. Nassiri, F. *et al.* Loss of H3K27me3 in meningiomas. *Neuro. Oncol.* **23**, (2021).
121. Cello, G., Patel, R. V., McMahon, J. T., Santagata, S. & Bi, W. L. Impact of H3K27 trimethylation loss in meningiomas: a meta-analysis. *Acta Neuropathologica Communications* vol. 11 (2023).