



SAPIENZA

UNIVERSITA' DI ROMA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE
XXXVI CICLO

“VESCICOLE EXTRACELLULARI IN BIOPSIA LIQUIDA
E CAMPIONI TISSUTALI NEI GLIOMI DIFFUSI DELL'ADULTO”

DOTTORANDO

Dr. Francesco Fiorentino

DOCENTE GUIDA

Prof.ssa Antonella Calogero

COORDINATORE DEL DOTTORATO
Prof. Maurizio Sorice

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Alla mia famiglia

Ai miei amici

Al Prof. Felice Giangaspero

Alla mia volontà di combattere, cercare, trovare e non cedere mai

RINGRAZIAMENTI

Alla Prof.ssa Antonella Calogero per la sua guida costante in questa interessante e proficua esperienza di ricerca.

Al Prof. Vincenzo Petrozza per la vicendevole stima e per la profonda e sincera disponibilità con la quale mi ha permesso di frequentare la UOC da lui diretta nell'ambito del mio progetto di ricerca.

Al Prof. Claudio Di Cristofano, punto di riferimento nella mia carriera formativa e professionale, per la proficua collaborazione, la disponibilità e il supporto costante.

Al Prof. Alfredo Berardelli, per il profondo legame che ci lega e per la sua guida ferma e costante di ogni tappa della mia formazione in seno a questo ateneo.

Al Prof. Angelo Pompucci per la profonda, vicendevole, stima, l'affettuosa amicizia, la sincera disponibilità e la proficua collaborazione nel gruppo multidisciplinare di neuro-oncologia presso la ASL di Latina.

Al Dr. Stefano Nardi per la disponibilità con la quale ha incoraggiato il mio interesse per la ricerca.

A Paolo, Luca, Elena e Daniela per il supporto fornito in ogni evenienza del mio percorso nel triennio di dottorato.

A Italo, Lino, Claudia, Paolo, Silvia, Pietro, Donatella, Alessandra per avermi sopportato e supportato, per sopportarmi e supportarmi con il cuore di amici veri.

Al Prof. Felice Giangaspero, Maestro di neuropatologia per il mondo intero e -per mia fortuna- anche per me, per aver condiviso le fasi iniziali del mio percorso di dottorato e per aver vegliato dal Cielo sulla sua conclusione.

INDICE

Riassunto	Pag. 5
Introduzione	Pag. 7
Progetto di ricerca	Pag. 23
Materiali e metodi	Pag. 25
Risultati	Pag. 30
Discussione	Pag. 35
Conclusioni	Pag. 39
Bibliografia	Pag. 40

RIASSUNTO

I gliomi diffusi sono i più frequenti tumori primitivi maligni del Sistema Nervoso Centrale e rappresentano un gruppo eterogeneo di neoplasie a prognosi infausta. A un progressivo aumento dell'insorgenza di tali tumori non è corrisposto un avanzamento sul piano diagnostico e terapeutico. A oggi non sono ancora del tutto noti i fattori di rischio, non sono disponibili test di screening e la sola analisi istologica è considerata l'unica metodica dirimente per poter porre diagnosi di certezza. Un ostacolo importante al corretto management del paziente affetto da neoplasia gliale è rappresentato dall'intrinseca eterogeneità intratumorale che permette alle cellule gliali neoplastiche di poter sviluppare sottopopolazioni con alterata risposta terapeutica, diversa capacità invasiva e differente potenziale di crescita nel giro di poche settimane o mesi. Risulta pertanto indispensabile la disponibilità di uno strumento mininvasivo che possa evidenziare tali cambiamenti molecolari in maniera altrettanto dinamica. Un ruolo promettente è da pochi anni attribuito alla liquid biopsy, test eseguito su un campione di sangue in grado di poter discriminare diversi biomarker tumorali rilasciati in circolo. Tra questi biomarker, un interesse sempre maggiore è rivolto alle vescicole extracellulari (EVs), principali molecole coinvolte nel signaling intercellulare, in grado di poter superare la barriera ematoencefalica e raggiungere la circolazione sistemica.

Sulla base di queste osservazioni e dei dati di letteratura, obiettivo del lavoro è stato quello di confrontare per la prima volta in una casistica di pazienti adulti affetti da glioma il DNA estratto dalle vescicole extracellulari isolate dal plasma con il DNA rilevato nel tessuto tumorale, allo scopo di stabilire un grado di concordanza per poter fornire dati che possano validare l'impiego di una metodica poco invasiva come la biopsia liquida nel management dei pazienti neurooncologici.

E' stata selezionata complessivamente una casistica di 36 pazienti, 26 pazienti affetti da neoplasia cerebrale e 10 pazienti di controllo. Di ogni paziente, previo consenso informato, sono stati acquisiti: dati clinico-anamnestici; dati radiologici; un prelievo ematico; analisi istopatologica. Si è proceduto

all'isolamento delle EVs dai campioni di sangue e all'estrazione del DNA sia dalle EVs che dal tessuto tumorale. L'estrazione di DNA di livello elevato in termini quantitativi e qualitativi è stata ottenuta in n° 10 casi di pazienti affetti da neoplasia gliale e in n° 5 casi della coorte di controllo. La concentrazione di DNA contenuto all'interno delle vescicole extracellulari nei pazienti affetti da glioma è risultata significativamente minore ($p < 0,01$) rispetto alla concentrazione di DNA contenuto nelle vescicole extracellulari nei pazienti sani. Non sono state rilevate mutazioni patogenetiche qualitativamente significative nelle vescicole extracellulari isolate dal sangue dei pazienti afferenti al gruppo di controllo. La correlazione tra le mutazioni patogenetiche rilevate nel DNA estratto dalle vescicole extracellulari e quelle rilevate nel DNA estratto dal tessuto tumorale relativo ha mostrato corrispondenza che raggiunge l'80% per quanto riguarda mutazioni di NF1. La mutazione patogenetica più frequentemente osservata è stata NF1 c.2568C>G.

Sulla base delle nostre osservazioni, il nostro studio supporta la possibile validità della biopsia liquida come tecnica poco invasiva al fine di identificare fattori diagnostici, prognostici e predittivi in questo tipo di neoplasie e pone l'attenzione su un possibile ruolo decisivo della mutazione patogenetica NF1 c.2568C>G nell'evoluzione del glioblastoma IDH-wild type.

INTRODUZIONE

1 EPIDEMIOLOGIA E PROGNOSI DEI GLIOMI DIFFUSI DELL'ADULTO

I tumori cerebrali hanno una prima suddivisione in primitivi e metastatici. Questi ultimi hanno una incidenza pari a circa 10 volte i primi [1,2].

I gliomi sono i più frequenti tumori primitivi del Sistema Nervoso Centrale considerando la popolazione complessiva [1,2]. Nella popolazione pediatrica i gliomi sono i più frequenti tumori primitivi del Sistema Nervoso Centrale. Nella popolazione adulta i gliomi sono secondi in ordine di frequenza tra i tumori primitivi del Sistema Nervoso Centrale, dopo i meningiomi [1, 2] [Fig.1]. Dei tumori primitivi del Sistema Nervoso Centrale maligni, il più frequente è il glioblastoma [Fig. 2]. Il tasso medio di incidenza annua aggiustato per età dei gliomi è di per 100.000 abitanti è di circa 5. Il genere maschile è più colpito del genere femminile [1].

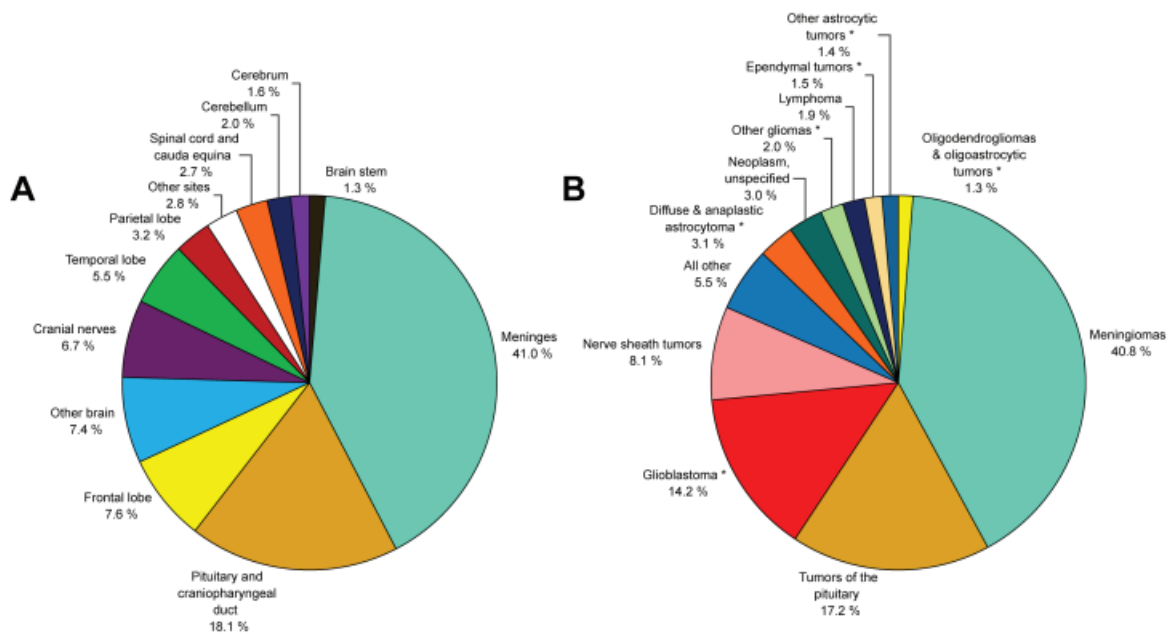


Figura 1. Distribuzione di tutti i tumori primitivi del Sistema Nervoso Centrale in base alla sede e in base all'istologia (Q.T. Ostom et al., Neuro-Oncology 25(S4), iv1-iv99, 2023)

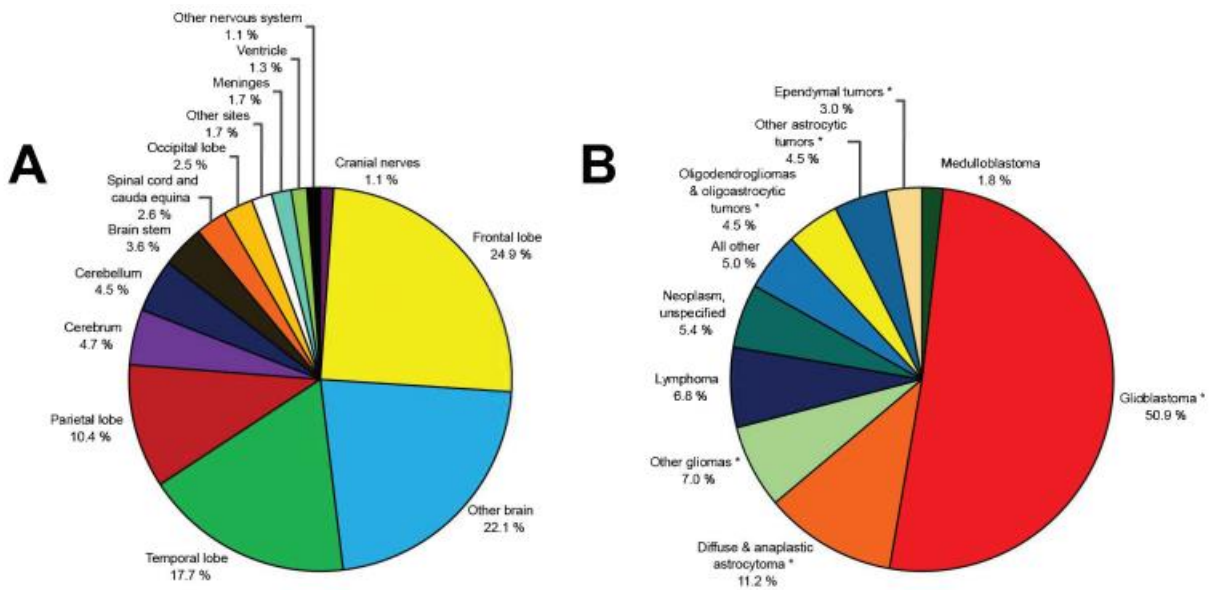


Figura 2. Distribuzione dei tumori primitivi maligni del Sistema Nervoso Centrale in base alla sede e in base all'istologia (Q.T. Ostom et al., *Neuro-Oncology* 25(S4), iv1–iv99, 2023)

La sede, il grado, l'aspetto istologico e l'istogenesi molecolare di questi tumori differiscono considerevolmente. La prognosi dipende da molteplici fattori. Età, Performance Status e grado istologico rappresentano i fattori prognostici più rilevanti per le neoplasie gliali [1,2].

I gliomi diffusi dell'adulto sono suddivisi in tre gruppi:

- oligodendrogliomi (derivanti dagli oligodendrociti);
- astrocitomi (derivanti dagli astrociti);
- glioblastoma (derivante dagli astrociti).

Astrocitomi e oligodendrogliomi vengono a loro volta divisi in gradi patologici. Il glioblastoma rappresenta per definizione il grado più alto (4). Le nuove conoscenze di biologia molecolare disponibili integrano diversi dati molecolari con il contesto clinico e il quadro patologico, rendendo tali lesioni entità clinico-patologiche molecularmente definite [2].

Gli oligodendrogliomi sono gliomi diffusamente infiltranti composti da cellule morfologicamente simili agli oligodendrociti maturi. Sono relativamente poco comuni, in quanto rappresentano circa il 5% dei gliomi.

Gli oligodendrogliomi vengono più comunemente osservati negli adulti, con un picco di incidenza tra i 30 e i 60 anni e coinvolgono tipicamente la giunzione grigia-bianca della corteccia, nonostante siano stati osservati casi al cervello e al midollo spinale. Questi tumori si distinguono in lesioni di grado 2 e lesioni di grado 3 [1, 2].

La diagnosi di oligodendroglioma prevede il riscontro di due alterazioni molecolari specifiche: la mutazione sui geni IDH1 o IDH2 e la delezione dei cromosomi 1p e 19q [2]. Oltre al suo valore diagnostico, tali alterazioni molecolari assumono ruolo fondamentale nel predire la prognosi e la risposta alla chemioterapia [3, 4, 5, 6]. I pazienti con oligodendroglioma hanno una prognosi migliore rispetto a quelli con astrocitoma [1, 2].

Gli astrocitomi dell'adulto sono tipicamente lesioni emisferiche, ma possono insorgere nel tronco cerebrale e nel midollo spinale. Tali lesioni sono caratterizzate dalla presenza di mutazione dei geni IDH1 o IDH2. Vengono suddivisi in gradi (2, 3, 4) sulla base di caratteristiche istopatologiche; in tale contesto, la presenza di delezione in omozigosi per i geni CDKN2A/CDKN2B qualifica la lesione di grado 4, indipendentemente dalle caratteristiche istopatologiche [2]. Le lesioni di grado 2 insorgono in pazienti di età compresa tra i 20 e i 30 anni. La storia naturale di tali lesioni è di recidivare, nell'arco di 4-5 anni in media, come lesioni di grado superiore [1,2].

Il glioblastoma è la forma più frequente di neoplasia primitiva maligna nel SNC. Insorge prevalentemente oltre i 50 anni. La prognosi dei pazienti con glioblastoma è infausta. Con gli attuali trattamenti di radio e chemioterapia dopo la resezione chirurgica la sopravvivenza media è di soli 8-10 mesi e meno del 10% dei pazienti è ancora vivo dopo due anni [1, 2]. Tali tumori prevedono istogenesi peculiare e indipendente dalla mutazione dei geni IDH1 o IDH2. Per tale ragione l'ultima

classificazione WHO li definisce glioblastoma IDH-wild type. Tali lesioni sono sempre di grado 4 [2].

2 GRADING E CLASSIFICAZIONE

I tumori del SNC rappresentano entità clinicopatologiche molecolarmente definite. Pertanto essi vengono classificati sulla base delle loro caratteristiche cliniche, istologiche, citogenetiche e biomolecolari. La classificazione attualmente utilizzata è quella “World Health Organization (WHO)”, che elenca più di 50 entità clinico-patologiche che variano notevolmente in comportamento biologico, decorso clinico e risposta alla terapia [2].

La classificazione WHO attribuisce a ogni neoplasia un grading, che rappresenta una scala di malignità biologica, e varia dal grado 1 al grado 4 [2].

Tale grado di malignità dipende dalla cellularità del tumore, pleomorfismo, presenza di atipie nucleari, attività mitotica, necrosi e proliferazione vascolare, alterazioni biomolecolari specifiche [2].

Il grading è un fattore chiave nel definire la scelta della terapia, determinante nella decisione di impiegare la radioterapia o specifici protocolli chemioterapici. La definizione del grading è dunque una componente essenziale di quella combinazione di criteri utilizzati per prevedere la risposta alla terapia e la prognosi. Altri criteri includono: età del paziente, Performance Status, localizzazione del tumore, caratteristiche radiologiche, alterazioni genetiche [2, 7].

3 ANATOMIA PATOLOGICA DEI GLIOMI DIFFUSI DELL’ADULTO

Gli **oligodendrogliomi** hanno predilezione per gli emisferi cerebrali e la sostanza bianca. Istologicamente hanno l'aspetto caratteristico di un tappeto di cellule monomorfe, con nucleo tondeggianti e citoplasma chiaro [Fig. 3]. Si associa una fine trama di capillari. La diagnosi di oligodendroglioma prevede il riscontro di due alterazioni molecolari specifiche: la mutazione sui geni IDH1 o IDH2 e la delezione dei cromosomi 1p e 19q [Fig. 4]. Esistono lesioni di grado 2 e lesioni di

grado 3. Queste ultime sono caratterizzate da attività mitotica, presenza eventuale di necrosi, proliferazione microvascolare [2].

Gli **astrocitomi** sono neoplasie tipicamente emisferiche. Istologicamente sono costituiti da elementi astrocitari atipici [Fig.5]. La diagnosi di astrocitoma prevede il riscontro di mutazione sui geni IDH1 o IDH2. Il grado di queste lesioni varia da 2 a 4 sulla base di caratteristiche istopatologiche e molecolari. Le lesioni di grado maggiore sono caratterizzate da attività mitotica, presenza eventuale di necrosi, proliferazione microvascolare. La presenza di delezione in omozigosi per i geni CDKN2A/CDKN2B [Fig. 6] qualifica la lesione di grado 4, indipendentemente dalle caratteristiche istopatologiche [2].

Il **glioblastoma IDH-wild type** rappresenta il tumore cerebrale primitivo maligno più frequente. Insorge tipicamente dopo i 50 anni e rappresenta la forma tumorale cerebrale a prognosi più infausta. Istologicamente è costituito da elementi astrocitari marcatamente atipici. Si osservano mitosi, necrosi e proliferazione microvascolare [Fig. 7]. L'istogenesi di tale neoplasia è indipendente dalla mutazione dei geni IDH1 e IDH2 [2].

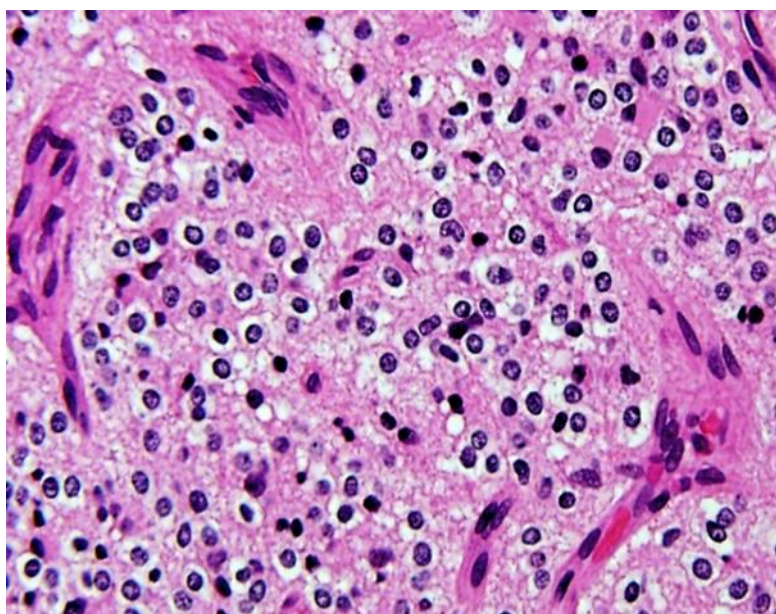


Figura 3. Oligodendroglioma IDH-mutato, 1p19q co-deleto (grado 2 CNS WHO 2021)

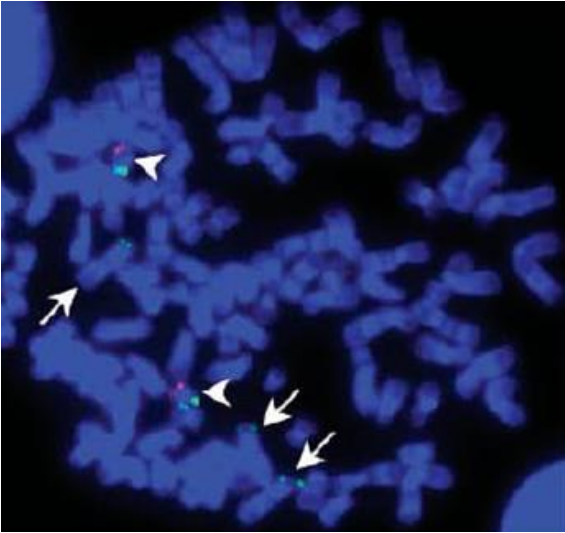


Figura 4. Co-delezione 1p19q identificata mediante FISH

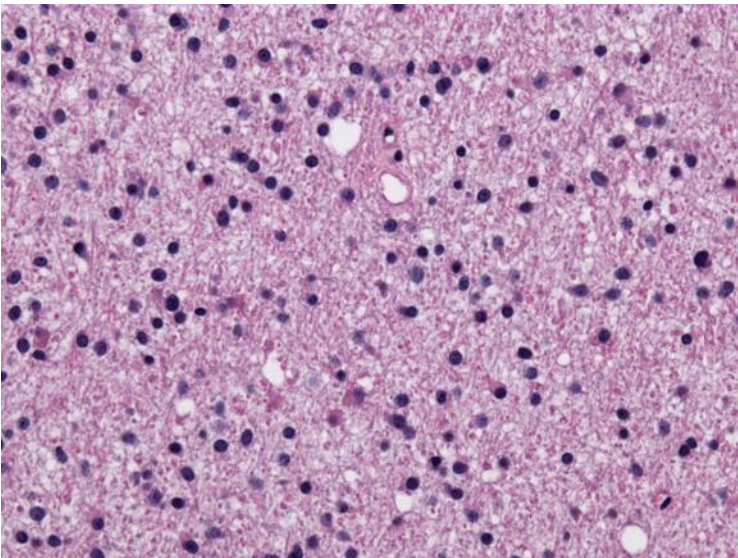


Figura 5. Astrocitoma IDH-mutato (grado 2 CNS WHO 2021)

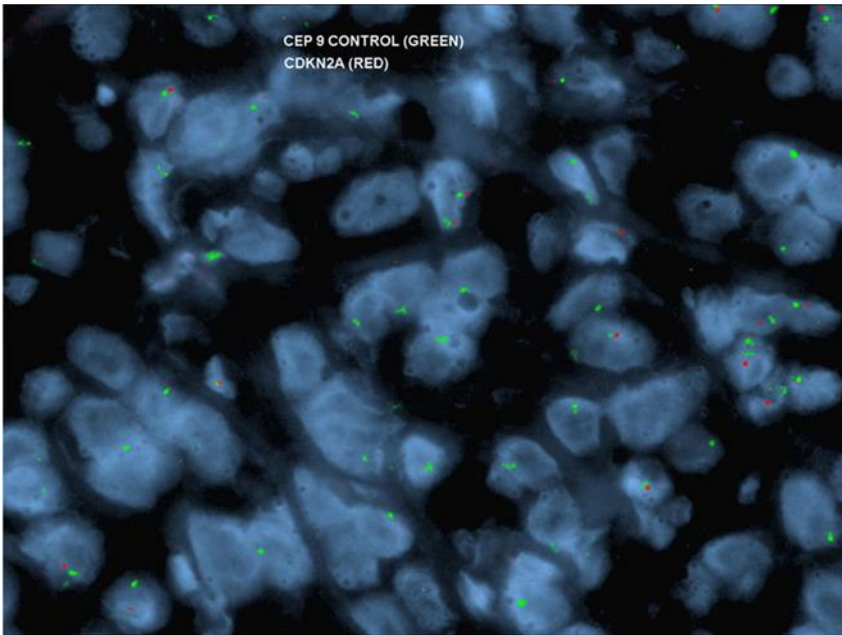


Figura 6. Delezione in omozigosi di CDKN2A identificata mediante FISH

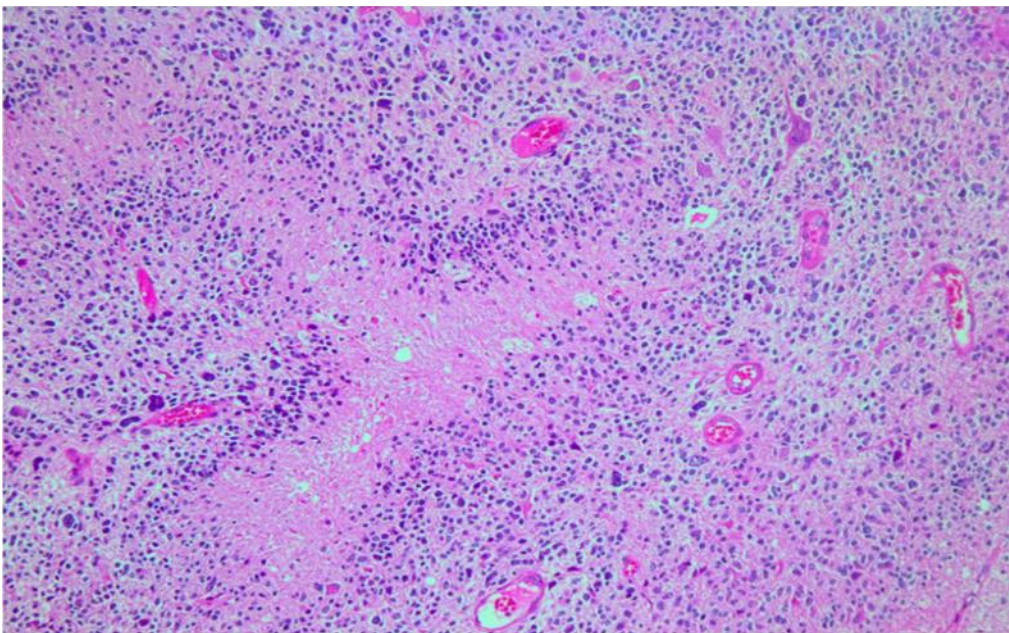


Figura 7. Glioblastoma IDH-wild type (grado 4 CNS WHO 2021)

4 BIOLOGIA MOLECOLARE DEI GLIOMI DIFFUSI DELL'ADULTO

I gliomi diffusi dell'adulto si sviluppano come risultato di alterazioni genetiche che si accumulano nel corso della progressione neoplastica. Tali alterazioni sono alla base delle differenze che si osservano in termini di comportamento biologico e prognosi tra le diverse forme di gliomi diffusi

dell'adulto, e talvolta anche nell'ambito dello stesso istotipo. La dimostrazione della presenza di mutazioni dei geni IDH1 o IDH2 in una percentuale di gliomi diffusi dell'adulto [3] è risultata di cruciale importanza nella comprensione dell'istogenesi di tali tumori. L'IDH è un enzima coinvolto nel ciclo di Krebs che catalizza la reazione di conversione da isocitrato ad α -chetoglutarato. La mutazione di IDH porta alla formazione di enzimi inefficaci ai fini della reazione catalitica, con accumulo di molecole di 2-OH-glutarato, metabolita in grado di favorire l'oncogenesi [8]. È stato dimostrato che tale mutazione rappresenta un evento *driver* nella trasformazione neoplastica [9]. La mutazione più frequente è a carico del codone R132 a livello del residuo di istidina [3].

Pertanto, i gliomi diffusi dell'adulto vengono oggi distinti in IDH-mutati (oligodendrogliomi, astrocitomi) e in IDH-*wild type* (glioblastoma).

Il glioblastoma IDH-*wild type* è una neoplasia con elevata eterogeneità genotipica [2]. Mutazioni più frequentemente osservate sono amplificazione di EGFR, mutazione del promotore di TERT e alterazioni cromosomiche (guadagno del cromosoma 7, perdita del cromosoma 10, spesso in combinazione), alterazioni del pathway PI3K-AKT-mTOR [2].

Gli oligodendrogliomi IDH-mutati sono associati alla codelezione del braccio corto del cromosoma 1 e del braccio lungo del cromosoma 19 [2]. Tale alterazione molecolare, oltre a rappresentare elemento diagnostico delle neoplasie oligodendrogliali, risulta fattore prognostico e predittivo positivo [2,4,5,6].

Gli astrocitomi IDH-mutati sono associati a mutazioni del gene oncosoppressore TP53, del gene ATRX, iperespressione di PDGF e PDGFR e perdita del cromosoma 22 [2,7]. La progressione neoplastica è associata alla perdita di funzione di oncosoppressori come p14ARF, amplificazione di CDK4 o CDK6, inattivazione di RB1 [7]. La delezione in omozigosi dei geni oncosoppressori CDKN2A o CDKN2B è dimostrato evento a prognosi così negativa che gli astrocitomi IDH-mutati con tale alterazione vengono classificati come grado 4 [2].

La metilazione del promotore della O-Metilguanina-DNA metiltransferasi (MGMT) è un'alterazione molecolare che si osserva in una percentuale variabile di gliomi diffusi (45-75%), sia di basso che di alto grado, ed è associata a una maggiore responsività ad alcuni chemioterapici e a una sopravvivenza maggiore [6,10].

Uno studio di espressione genica [11] ha evidenziato che i gliomi diffusi mostrano tre diversi profili di espressione genica: mesenchimale, proliferativo e proneurale.

I profili mesenchimale e proliferativo sono più frequentemente espressi nelle neoplasie astrocitarie, in particolare in quelle di alto grado, e nei glioblastomi. Il profilo mesenchimale si caratterizza per iperespressione di fattori che promuovono la neoangiogenesi, come VEGF e i suoi recettori (VEGFR1 e VEGFR2), iperespressione della proteina YKL40 e di CD44. Il profilo proliferativo si caratterizza per iperespressione di marcatori di proliferazione cellulare, come il PCNA e la TOP2A. Sia nel profilo mesenchimale che in quello proliferativo si osservano iperespressione di EGFR, mutazione di PTEN, delezione del cromosoma 10, guadagno di funzione del cromosoma 7 e sono caratterizzati dall'attivazione della via AKT di trasduzione del segnale. Dall'analisi della sopravvivenza è emerso che i profili di espressione genica mesenchimale e proliferativo si associano a una prognosi scarsa.

Il profilo proneurale è più frequentemente espresso nelle neoplasie oligodendrogliali e si caratterizza per l'espressione dei geni OLIG2 e DDL3 e per l'attivazione della via Notch di trasduzione del segnale. L'analisi di espressione genica dei tumori con profilo proneurale ha dimostrato che tali cellule neoplastiche hanno un profilo genico simile ai neuroblasti. Infine, l'espressione di un profilo proneurale correla in modo statisticamente significativo con una prognosi migliore.

5 VESICOLE EXTRACELLULARI (EVs)

Le vescicole extracellulari (EVs) sono delle nanoparticelle rivestite da membrana di dimensioni comprese tra i 30 e i 1000 nanometri (nm). Si ritiene che esse siano attivamente rilasciate dalla maggior parte, se non dalla totalità, delle cellule dell'organismo. Il loro contenuto, solitamente, riflette

lo stato molecolare della cellula che le rilascia in circolo e varia da lipidi e proteine ad acidi nucleici, in particolare: DNA ed RNA [12].

Esistono 3 sottoclassi principali di EVs, così suddivise in base alla loro dimensione, densità e composizione biochimica:

1. Gli esosomi (30 – 100 nm) [Figg. 10, 11, 12] derivanti dagli endosomi;
2. Le microvescicole (100 – 1000 nm) che prendono la loro origine dalla membrana plasmatica;
3. I corpi apoptotici (1000 – 5000 nm) che, a differenza dei precedenti, si formano esclusivamente nel momento in cui vengono attivati i meccanismi di morte cellulare programmata [13].

Nonostante questa distinzione, la International Society for Extracellular Vesicles raccomanda tuttavia che il termine “vescicola extracellulare” venga adoperato sia riferendosi agli esosomi che alle microvescicole, poiché non è ancora fisicamente o biochimicamente distinguibile l’origine della membrana componente la vescicola, sia essa endosomiale o plasmatica [14].

Gli esosomi e le microvescicole riconoscono una biogenesi a tratti comune condividendo il processo di traffico di membrana ed i pathway dell’ESCRT (endosomal complex required for transport) [Fig. 8].

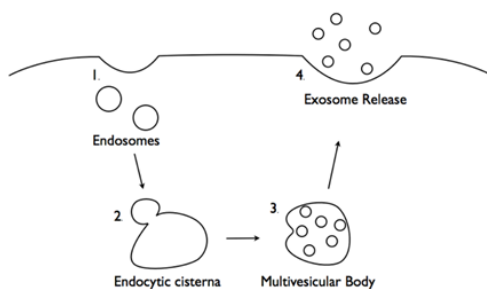


Figura 8. Biogenesi e rilascio degli esosomi

La formazione e il rilascio dei corpi apoptotici si avvale di meccanismi differenti e non ancora del tutto chiariti [13,15,16,17,18,19,20,22].

La biogenesi degli esosomi e delle microvescicole suggerisce che il contenuto al loro interno includa una quantità significativa di proteine dei complessi ESCRT e altre proteine accessorie (Alix, TSG101, HSC70 e HSP90 β).

L'origine delle microparticelle tramite budding della membrana plasmatica cellulare lascia intendere che il loro contenuto proteico sia prevalentemente citosolico o comunque ricco in proteine associate a membrana, in particolar modo le tetraspanine.

Altre proteine comunemente riscontrate nelle microparticelle sono proteine del citoscheletro: heat shock protein, integrine ed altre contenenti modificazioni post traslazionali quali glicosilazione e fosforilazione.

Nei corpi apoptotici, invece, sono prevalentemente contenuti organelli intatti, cromatina e una piccola quota di proteine glicosilate [23,24,25,26].

6 RUOLO DELLE EVs NEI TUMORI

Le EVs svolgono funzioni importantissime durante le diverse tappe nei processi biologici e molecolari dei tumori. Tra i diversi ruoli principalmente dimostrati si menziona la loro azione nella promozione delle metastasi a distanza, nella transizione epitelio mesenchimale (EMT), nell'angiogenesi, nel remodelling della matrice extracellulare, nell'induzione dello stato di dormienza tumorale (tumor dormancy) e nell'immunomodulazione.

Il ruolo angiogenetico è stato dimostrato nei glioblastomi, in cui le EVs che trasportano mRNA e miRNA, insieme a proteine angiogenetiche, vengono accolte da cellule riceventi, promuovendo sia la crescita tumorale che la proliferazione delle cellule endoteliali stesse [27].

Un ruolo simile è stato studiato nel carcinoma del pancreas, in cui gli esosomi esprimenti la tetraspanina 8 erano in grado di reclutare proteine e mRNA cargo che attivavano nelle cellule endoteliali riceventi l'espressione di geni correlati all'angiogenesi [28].

Negli ultimi anni, infatti, è stato rivolto un particolare interesse nei confronti del ruolo potenziale che il miRNA e l'mRNA contenuti all'interno delle EVs potessero regolare la comunicazione e l'interazione cellula – cellula, in particolar modo permettendo una regolazione dell'espressione genica nella cellula ricevente, come dimostrato per i mastociti [29] e negli esosomi derivanti da astrociti. Questi ultimi sembrano in grado di promuovere metastasi a distanza, le quali, a loro volta, possono “comunicare” con il microambiente circostante e regolare in maniera paracrina la crescita del tumore stesso [30].

Anche gli esosomi isolati da carcinoma colon rettale metastatico hanno dimostrato un ruolo nella realizzazione di un microambiente favorevole all'attecchimento di metastasi reclutando cellule stromali esprimenti CXCR-4 [31].

È generalmente riconosciuto che lo sviluppo di metastasi a distanza sia correlato ad un alto rischio di complicanze trombotiche, che si rivelano causa principale di morte nei pazienti affetti da neoplasia in stadi terminali [32]. Sono stati riscontrati alti livelli di microvescicole circolanti contenenti diversi fattori in grado di promuovere la cascata coagulativa, principalmente il fattore tissutale (TF), ed è stato così dimostrato che il rilascio di EVs coinvolte nella coagulazione non sia esclusivo delle piastrine ma condiviso anche con cellule infiammatorie o tumorali [33].

Il rilascio di EVs anche da parte dello stroma peritumorale è in grado di influenzare la progressione e la motilità delle cellule tumorali al suo interno, come dimostrato, ad esempio, nel carcinoma mammario. Il rilascio di EVs da parte dei fibroblasti cancer-associated (CAFs) è in grado di permettere la disseminazione delle cellule tumorali mammarie attraverso il pathway Wnt-planar cell polarity (Wnt-PCP) [34].

Il remodelling della matrice extracellulare (ECM), invece, necessario all'acquisizione di un fenotipo più aggressivo per i tumori, sembra riconoscere un ruolo per esosomi contenenti molecole di fibronectina [35].

Gli studi di Ono et al. hanno dimostrato come le cellule di carcinoma mammario metastatico inserite in co coltura insieme a human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) secernenti esosomi con miR-23b, permettessero l'induzione di uno stato di dormienza tumorale nella nicchia metastatica, tramite la diminuzione dell'espressione di MARCKS, un regolatore del ciclo e della motilità cellulare [36].

Il ruolo delle EVs nella transizione epitelio – mesenchimale (EMT) è stato studiato da Tauro et al. dove l'overespressione di HRAS in cellule epiteliali renali canine promuoveva il packaging di marker mesenchimali (vimentine e MMPs) negli esosomi, inducendo la EMT nelle cellule riceventi [37].

Durante la condizione ipossica, nelle cellule tumorali di carcinoma mammario, l'aumento del rilascio di esosomi potrebbe essere regolato dall'hypoxia-inducible factor 1- α (HIF1- α) [37].

Il ruolo immunomodulatorio, infine, può sia coinvolgere direttamente il signaling tra le cellule del sistema immunitario, che il trasferimento di antigeni immunitari alle cellule dendritiche (DCs) per la presentazione dell'antigene alle cellule T, inducendo in tal modo una risposta immunitaria primaria di tipo citotossico [38].

L'interazione locale tra il tumore e le cellule dell'immunità innata è, infatti, in grado di stabilire se la neoplasia verrà contenuta localmente o potrà riuscire ad invadere siti in vicinanza o a distanza [39].

Anche Chen et al. hanno dimostrato che in condizioni di heat shock, cellule provenienti da linfoma B nel topo, rilasciano esosomi con al loro interno MHC, CD40, CD86, TANTES ed IL-1b, in grado di indurre maturazione delle DCs portando all'attivazione della risposta CD4⁺ e CD8⁺ contro il tumore stesso [40].

7 EVs COME BIOMARKER TUMORALI NEL GLIOMA

Nei tumori della glia, le EVs furono identificate per la prima volta nel 1981 da Trams et al. [41].

Allora, la considerazione comune che tali vescicole trasportassero esclusivamente scarti cellulari e materiale apoptotico non ha neanche lontanamente lasciato presupporre un loro ruolo nelle neoplasie gliali.

In letteratura è stato descritto un ruolo delle EVs derivanti da cellule gliali neoplastiche nella stimolazione alla proliferazione cellulare, nell'angiogenesi [42], nella risposta delle cellule gliali a stimoli ipossici [43], nel trasferimento di materiale oncogenetico in grado di indurre in alcune cellule una trasformazione e una resistenza alla terapia [44], nel mantenimento continuo dell'eterogeneità intratumorale [43].

8 LA BIOPSIA LIQUIDA

L'impegno della biopsia liquida [Fig. 9] in questi ultimi decenni ha suscitato interesse in diverse tipologie di tumore perché, a differenza delle biopsie tissutali tradizionali, tale metodica può essere ripetuta nel tempo in maniera regolare, con un minimo rischio per il paziente che viene sottoposto al prelievo e risultando per esso minimamente invasiva.

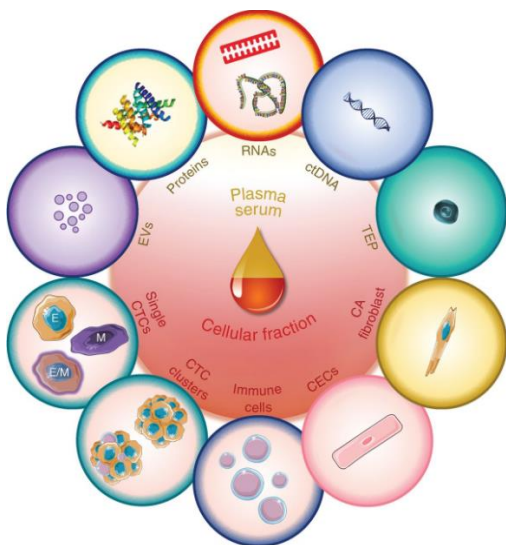


Figura 9. Biopsia liquida: elementi rilevabili (C. Alix-Panabières and K. Pantel, *Cancer Discov* 2021;11:858–73)

Nell'ultimo decennio la biopsia liquida è stata applicata in ricerca anche nelle neoplasie gliali [45] [Fig. 10].

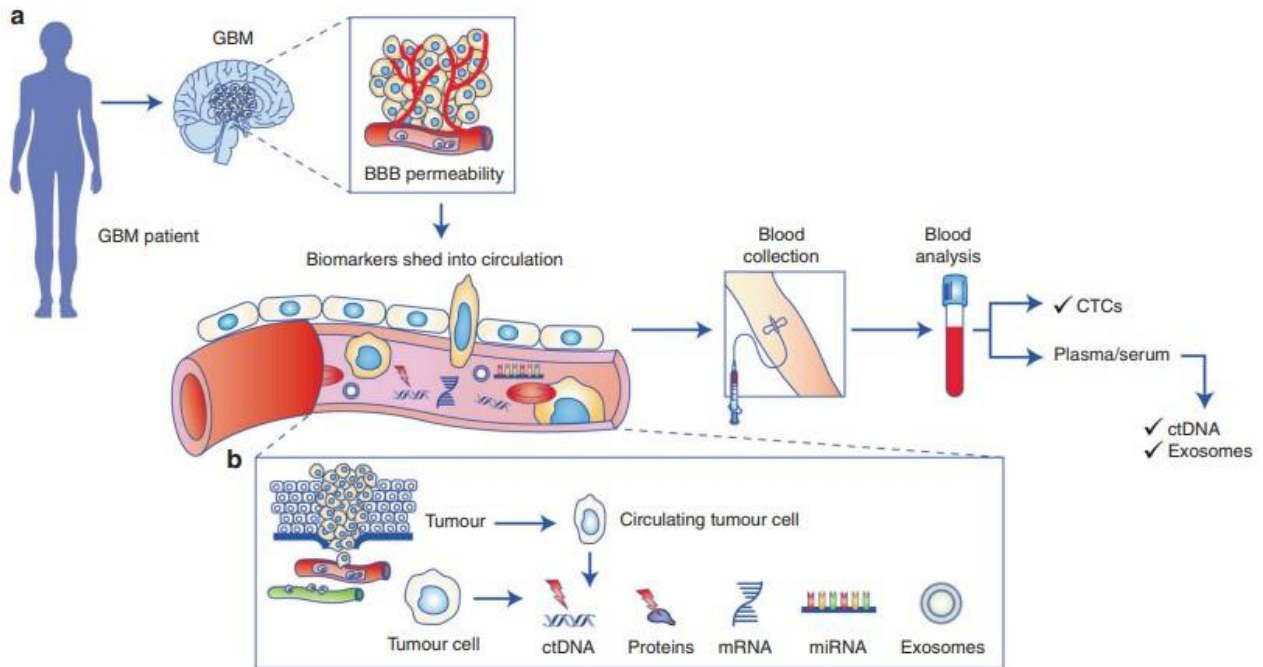


Figura 10. Biopsia liquida nel glioblastoma (J. Muller Bark et al., British Journal of Cancer (2020) 122:295–305)

Le EVs rilasciate dai gliomi possono essere isolate da quasi tutti i fluidi corporei, principalmente il sangue, la saliva e le urine [46].

Sebbene il glioma sia localizzato nel sistema nervoso centrale, sono stati individuati materiali derivanti dalle cellule gliali neoplastiche nella circolazione sistemica, tra cui soprattutto cellule tumorali circolanti o circulating tumor cells (CTCs) [47,48], proteine solubili [49], acidi nucleici circolanti, in particolare DNA tumorale circolante (ctDNA) con al suo interno il gene IDH mutato [50].

Sono state rilevate alterazioni di EGFR e della variante III di EGFR da vescicole extracellulari isolate dal liquor cefalorachidiano di pazienti affetti da glioma diffuso [51].

Garcia et al. hanno dimostrato come le vescicole extracellulari siano in grado di superare la barriera ematoencefalica e raggiungere il circolo sistemico, diventando dunque delle promettenti future protagoniste nelle metodiche di biopsia liquida [52].

PROGETTO DI RICERCA

Il progetto di ricerca è stato realizzato presso il Polo Pontino di Latina dell'Università "Sapienza".

In tale contesto, è stato formato un gruppo multidisciplinare che, integrando diversi profili specialistici, a tutt'oggi si incarica di assistere i pazienti affetti da neoplasia cerebrale.

Tale realtà, allo scopo di fornire la migliore assistenza possibile, ha consentito di creare un'ampia banca dati di neoplasie cerebrali dell'adulto. La casistica annuale annovera circa 110 interventi di neurochirurgia oncologica. Tale dato non ha subito limitazioni negli anni segnati dalla pandemia di CoViD19.

I dati epidemiologici raccolti nella realtà territoriale di Latina in termini di incidenza, prognosi e risposta ai trattamenti terapeutici non si discostano da quanto noto in letteratura.

Le criticità maggiori riguardano il glioblastoma IDH-*wild type* in relazione alla sua prognosi infausta e alla scarsa risposta ai trattamenti terapeutici. Tali limiti sono, come già detto, il risultato dell'estrema eterogeneità genotipica di queste neoplasie. Un eventuale monitoraggio costante delle variazioni al corredo genetico di tali lesioni si profila cruciale per poter ottimizzare l'assistenza ai pazienti affetti da questi tumori, allo scopo di individuare fattori prognostici/predittivi sempre più mirati.

Questo auspicabile obiettivo ha due limiti principali:

- la necessità di acquisire campioni tissutali per la valutazione del genotipo tumorale richiede interventi altamente invasivi;
- non ci sono sufficienti dati di correlazione tra il materiale genetico acquisibile mediante metodiche poco invasive (biopsia liquida) e il genotipo effettivo delle neoplasie gliali.

Sulla base di queste osservazioni e dei dati di letteratura, riportati in seno all'introduzione, obiettivo del lavoro è stato quello di confrontare per la prima volta in una casistica di pazienti adulti affetti da glioma il DNA estratto dalle vescicole extracellulari isolate dal plasma con il DNA

rilevato nel tessuto tumorale, allo scopo di stabilire un grado di concordanza per poter fornire dati che possano validare l'impiego di una metodica poco invasiva come la biopsia liquida nel *management* dei pazienti neurooncologici.

MATERIALI E METODI

E' stata prospetticamente reclutata una popolazione di pazienti adulti (età >20 anni) con sospetto di neoplasia gliale.

I criteri d'inclusione per la costituzione del campione sono stati i seguenti:

- Imaging suggestivo di neoplasia gliale;
- Possibilità di poter effettuare l'intervento chirurgico di resezione parziale o completa della lesione o eventualmente una sua biopsizzazione;
- Esclusione di metastasi da altro tumore.

Per ogni paziente sono stati acquisiti:

- Dati clinici;
- Imaging pre- e post-operatorio;
- Prelievo ematico;
- Biopsia lesionale;
- Dati istologici.

Il criterio che ha permesso di mantenere arruolata tale coorte di pazienti in maniera longitudinale nello studio è stata la conferma istopatologica di neoplasia gliale.

Nello studio è stata inoltre compresa una popolazione di 10 casi controllo (6 maschi e 4 femmine) con nessuna evidenza di patologia in atto.

Ai controlli è stato prelevato un campione di sangue (10 ml) per poterne valutare il contenuto di DNA nelle EVs plasmatiche in condizioni basali e poterlo comparare con quello della coorte affetta da neoplasia gliale.

I criteri d'inclusione per la coorte di controllo sono stati i seguenti:

- Età superiore ai 20 anni;
- Assenza gravidanza;
- Assenza di tumore;
- Assenza di epatite virale;
- Assenza di infezione da HIV;
- Assenza di infiammazione sistemica;
- Nessuna procedura chirurgica o trauma recente.

ANALISI ISTOPATOLOGICA

I campioni di tessuto prelevati durante l'intervento chirurgico sono stati fissati in formalina, processati con processore automatizzato e inclusi in paraffina. Dalle inclusioni in paraffina sono state allestite sezioni istologiche dello spessore di 2 µm. Sono state effettuate colorazione con ematossilina/eosina e colorazioni immunoistochimiche con anticorpi monoclonali murini anti-GFAP, -OLIG2, -ATRX, -EGFR, -IDH1(R132H), -Ki67. I tumori sono stati classificati e gradati secondo la classificazione WHO 2021.

ISOLAMENTO DEL DNA DAL TESSUTO NEOPLASTICO

Sulle sezioni istologiche allestite sono state identificate, mediante osservazione con microscopio ottico, le aree tumorali. Sono state effettuate corrispondenti macrodissezioni manuali da 10 µm.

Il DNA all'interno del tessuto dissezionato è stato estratto mediante l'utilizzo del "QIAamp DNA Mini Kit" (QIAGEN) secondo i protocolli dell'azienda.

PRELIEVO EMATICO, SEPARAZIONE DEL PLASMA E ISOLAMENTO DELLE VESCICOLE EXTRACELLULARI DAI CAMPIONI DI SANGUE

Il prelievo ematico è stato raccolto il giorno dell'intervento tramite prelievo venoso in fossa cubitale e collezionato in provette vacutainer "PAXgene" dell'azienda QIAGEN (10ml).

L'estrazione del plasma è stata effettuata mediante centrifugazioni seriate a 2000g per 10 minuti a 4°C, entro 4 ore dal prelievo.

Una volta separato, il plasma è stato nuovamente centrifugato a 3000g per 15 minuti a 4°C e conservato a temperatura di - 80°C.

Le EVs contenute all'interno del plasma sono state isolate mediante l'utilizzo dell' "ExoEasy Maxi Kit" (QIAGEN). Per l'estrazione del DNA al loro interno, è stato utilizzato il "QIAamp MinElute Virus spin Kit" (QIAGEN). Per entrambe le procedure sono stati rispettati i protocolli previsti dall'azienda produttrice dei kit.

Le EVs sono state caratterizzate mediante osservazione al microscopio elettronico [Fig. 11].

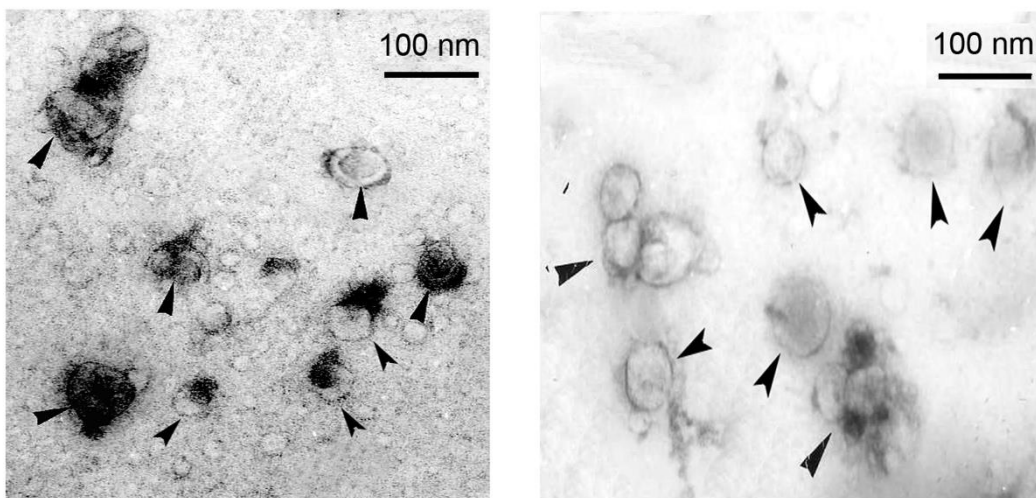


Figura 11. Vescicole extracellulari all'osservazione al microscopio elettronico

VALUTAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI DNA

La concentrazione di DNA nei campioni è stata valutata mediante il fluorimetro “Qubit 4” (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

ANALISI IN NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)

L’analisi in NGS è stata effettuata mediante lo strumento “GeneReader” (QIAGEN) utilizzando il seguente custom panel: “QIAct GliomaProject DNA Panel CP153” (QIAGEN).

Il pannello ha permesso di indagare lo stato mutazionale dei seguenti geni:

- ATRX (NM_000489.4 NP_000480.3);
- CDKN2A (NM_000077.4 NP_000068.1);
- H3F3A (NM_002107.4 NP_002098.1);
- IDH1 (NM_001282386.1 NP_001269315.1);
- IDH2 (NM_002168.3 NP_002159.2);
- NF1 (NM_000267.3 NP_000258.1);
- PTEN (NM_000314.6 NP_000305.3);
- TERT (NM_198253.2 NP_937983.2);
- TP53 (NM_000546.5 NP_000537.3).

I risultati del sequenziamento sono stati analizzati tramite il Clinical Insight (QCI, QIAGEN) che include i seguenti database come riferimento:

QIAGEN Clinical Insight-Interpret (5.5.20190807), Ingenuity Knowledge Base (Utopia 190824.002), CADD (v1.4), Allele Frequency Community (2018-12-15), EVS (ESP6500SI-V2), Refseq Gene Model (2018-07-10), JASPAR (2013-11), Ingenuity Knowledge Base Snapshot Timestamp (2019-08-24 18:08:27.0), Vista Enhancer hg18 (2012-07), Vista Enhancer hg19 (2012-07), Clinical Trials (Utopia 190824.002), PolyPhen-2 (v2.2.2), 1000 Genome Frequency

(phase3v5b), ExAC (0.3.1), iva (Jun 28 11:10 iva-1.0.1085.jar), PhyloP hg18 (2009-11), PhyloP hg19 (2009-11), DbSNP (151), TargetScan (7.2), GENCODE (Release 28), CentoMD (5.3), OMIM (May 26, 2017), gnomAD (2.0.1), BSIFT (2016-02-23), TCGA (2013-09-05), Clinvar (2019-01-02), DGV (2016-05-15), COSMIC (v87), HGMD (2018.4), SIFT4G (2016-02-23).

ANALISI STATISTICA

I valori sono stati riportati come media \pm deviazione standard (SD). Lo Student's t-test è stato utilizzato per confrontare le variabili quantitative continue. Un valore $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo. L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata mediante il software GraphPad Prism v.6.

RISULTATI

La coorte selezionata è composta da un totale di 26 pazienti affetti da neoplasia gliale; nello specifico: 14 maschi e 12 femmine, di età media pari a circa 60 anni.

La RM preoperatoria ha permesso di definire la sede della lesione neoplastica in tutti i casi (n=26), mostrando la seguente localizzazione:

- Lobo frontale: 30,8%;
- Lobo temporale: 34,6%
- Lobo parietale: 23,1%
- Lobo occipitale: 11,5%.

La modalità di resezione chirurgica è risultata così suddivisa:

- Resezione gross total: 46,2%
- Resezione near total: 42,3%
- Biopsia: 11,5%

La sopravvivenza libera da progressione (PFS) è risultata in media di 13.23 mesi. La sopravvivenza complessiva (OS) è risultata in media di 15,92 mesi.

I campioni, in seguito all'analisi istopatologica, sono risultati così caratterizzati:

- 20 glioblastoma IDH-wild type (grado 4 WHO) (77%)
- 3 astrocitoma IDH-mutato (grado 3 WHO) (11,5%)
- 3 oligodendroglioma IDH-mutato (grado 2 WHO) (11,5%)

Ai fini del lavoro sono stati presi in considerazione i 20 casi di glioblastoma IDH-wild type, includendo gli altri 6 casi nel gruppo di controllo.

L'estrazione di DNA di livello elevato, sia in termini qualitativi che in termini di concentrazione (>0.5 ng/ μ L) è stata possibile solo in una parte dei casi (n = 10 pazienti con neoplasia gliale, n = 5 coorte di controllo).

In questa coorte di pazienti con neoplasia gliale (n = 10) la sopravvivenza libera da progressione (PFS) è risultata in media di 8.5 mesi. La sopravvivenza complessiva (OS) è risultata in media di 10,5 mesi [Tab.1].

Characteristics	Patients (n = 10)
Median age, years	64.6 (± 16.06)
Gender (%)	
Male	70
Female	30
Tumor location, (%)	
Frontal lobe	20
Right temporal lobe	20
Left temporal lobe	20
Temporo-parietal lobe	10
Occipital	20
Frontoparietal lobe	10
Surgical resection, (%)	
Gross total	30
Near total	40
Partial	10
Biopsy	20
Median tumor volume, cm ³ (\pm SD)	
Total Flair	85.3 (± 5.55)
Non-enhancing (t1 Post-contrast)	12.26 (± 25.66)
Enhancing (t1 Post-contrast)	17.26 (± 25.66)
Enhancing + Non-enhancing (t1 Post-contrast)	31.32 (± 34.67)
Karnofsky Performance Status (KPS), (%)	
Preoperative	
90\100	70
80\70	20
<60	10
Karnofsky Performance Status (KPS), (%)	
Preoperative	
90\100	70
80\70	20
<60	10
Progression (%)	
Yes	90
No	10
Free survival, months	8.2 (± 11.37)
Survival, months	10.5 (± 8.14)

Tabella 1. Caratteristiche di base della coorte di casi per i quali è stata possibile l'estrazione di DNA di livello quantitativamente e qualitativamente elevato

Il pannello NGS per i geni ATRX, CDKN2A, H3F3A, IDH1, IDH2, NF1, PTEN, TERT e TP53 è stato eseguito nei campioni da cui è stata possibile l'estrazione di DNA di livello elevato (n = 10 pazienti con neoplasia gliale, n = 5 coorte di controllo).

La concentrazione di DNA contenuto all'interno delle EVs nei pazienti affetti da glioma è stata confrontata con la concentrazione di DNA contenuto nelle EVs nei pazienti sani. La concentrazione di DNA contenuto all'interno delle EVs nei pazienti affetti da glioma è risultata significativamente minore ($p < 0,01$) rispetto alla concentrazione di DNA contenuto nelle EVs nei pazienti sani [Fig. 12].

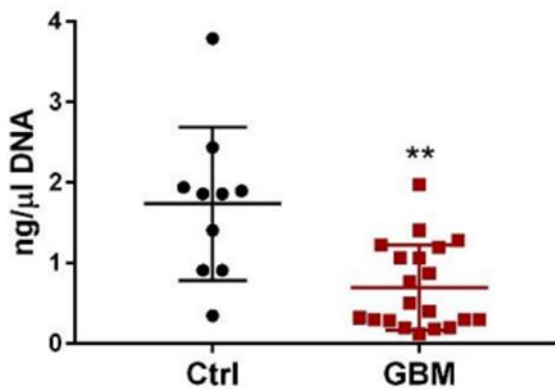


Figura 12. Confronto tra la concentrazione di DNA estratto dalle vescicole extracellulari dei pazienti con glioblastoma IDH-wild type e la concentrazione di DNA estratto dalle vescicole extracellulari isolate dai pazienti del gruppo di controllo ** $p < 0,01$

Il DNA contenuto nelle EVs dei casi controllo (n = 5) è risultato qualitativamente negativo per mutazioni patogenetiche associate ai geni delle neoplasie gliali [Fig. 13].

	GL18-2	GL18-3	GL18-8	GL18-11	GL18-12	GL18-13	GL18-15	GL19-17	GL19-24	GL19-28	C1	C2	C3	C4	C5
IDH1															
TP53															
NF1															
TERT															
ATRX															

Figura 13. Mutazioni rilevate nel DNA estratto dalle vescicole extracellulari

Nelle EVs dei pazienti affetti da glioma (n = 10) il gene più frequentemente mutato è risultato NF1 (10/10 casi; 100%).

Sono state inoltre osservate le seguenti mutazioni:

- IDH1: mutato in una EV (1/10 pazienti; 10%);
- TP53: mutato in una EV (1/10 pazienti; 10%);
- TERT: mutato in tre EVs (3/10 pazienti; 30%);
- ATRX: mutato in una EV (1/10 pazienti; 10%) [Fig. 13].

Il gene che ha mostrato più varianti patogenetiche all'analisi in NGS delle EVs dei pazienti affetti da glioblastoma IDH-wild type è risultato essere NF1 [Tab. 2].

Gene	Nucleotide Change	Amino Acid Change
NF1	c.233delA c.1466A>G c.1658A>G c.2027delC c.2568C>G c.3033delA c.3859T>C c.2297T>C	p.Asn78fs p.Tyr489Cys p.His553Arg p.Pro678fs p.Ser856Arg p.Thr1013fs p.Phe1287Leu p.Ile766Thr
IDH1	c.395G>A	p.Arg132His
TP53	c.700T>A c.1146delA c.841G>T	p.Tyr234Asn p.Lys382fs p.Asp281Tyr
ATRX	c.1074delA c.2658_2659delGA	p.Lys358fs p.Glu886fs
TERT	c.336delC	p.Glu113fs

Tabella 2. Varianti genomiche delle mutazioni patogenetiche osservate

L'analisi comparativa tra le mutazioni presenti nel DNA delle EVs (n = 10) con il loro corrispettivo tessuto tumorale (n = 10) ha rilevato i seguenti risultati:

- 1 campione mutato sul gene IDH1 (1/10; 10%) sia nelle EVs che nel tessuto tumorale;
- 8 campioni mutati sul gene NF1 sia nelle EVs che nel tessuto tumorale (8/10; 80%);

- 2 campioni mutati sul gene TERT sia nelle EVs che nel tessuto tumorale (2/10; 20%);
- 1 campione mutato sul gene ATRX sia nelle EVs che nel tessuto tumorale (1/10; 20%);
- 1 campioni mutati sul gene TERT solo nelle EVs (1/10; 10%);
- 2 campioni mutati sul gene NF1 solo nelle EVs (2/10; 20%);
- 2 campioni mutati sul gene TP53 solo nel tessuto tumorale (2/10; 20%); 1 campione mutato sul gene TP53 solo nelle EVs (1/10; 10%);
- 1 campione mutato sul gene ATRX solo nel tessuto tumorale (1/10; 10%) [Fig. 14].

	GL18-2		GL18-3		GL18-8		GL18-11		GL18-12		GL18-13		GL18-15		GL19-17		GL19-24		GL19-28	
	EVs	TISSUE	EVs	TISSUE	EVs	TISSUE	EVs	TISSUE	EVs	TISSUE	EVs	TISSUE	EVs	TISSUE	EVs	TISSUE	EVs	TISSUE	EVs	TISSUE
IDH1																				
TP53																				
NF1																				
TERT																				
ATRX																				

Figura 14. Confronto tra le mutazioni rilevate nel DNA estratto dalle vescicole extracellulari isolate dal plasma dei pazienti con glioblastoma IDH-wild type con le mutazioni rilevate nel DNA estratto dal tessuto neoplastico

Il gene che ha mostrato più varianti patogenetiche all'analisi in NGS nel tessuto tumorale dei pazienti affetti da glioblastoma IDH-wild type è risultato essere NF1 [Tab. 2].

La mutazione patogenetica più frequente sul gene NF1 nella nostra coorte di glioblastoma IDH-wild type (n=10) è risultata c.2568C>G corrispondente a p.S856R. Tali mutazioni sono state considerate come positive quando la variant allele frequency (VAF) era superiore alla soglia dello 0,5% [Fig. 15].

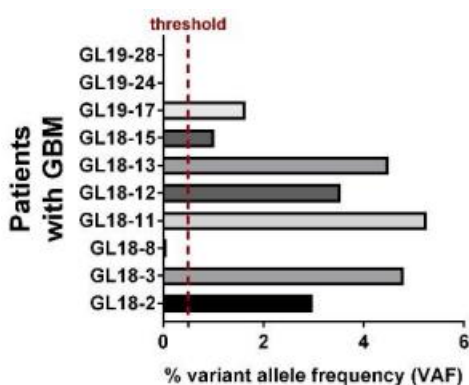


Figura 15. Frequenza di variante allelica (VAF, espressa in %) della variante patogenetica c.2568C>G del gene NF1 rilevata nel DNA estratto dalle vescicole extracellulari isolate dal plasma dei pazienti con glioblastoma IDH-wild type

DISCUSSIONE

Lo sviluppo di nuovi marcatori biologici non invasivi si profila necessario per tutti i tumori, ma principalmente per quelli come il glioblastoma IDH-*wild type* in ragione della sua peculiare localizzazione anatomica. Inoltre, la biologia del glioblastoma IDH-*wild type* è poco conosciuta ed estremamente eterogenea: da qui la crescente necessità di trovare nuovi marcatori per supportare la classificazione di questo tumore, per seguirne la progressione e per guidare la terapia.

Le vescicole extracellulari rappresentano un valido supporto diagnostico nel contesto delle metodiche di biopsia liquida. Il ricco carico di acidi nucleici, compreso il DNA, è uno strumento molto utile che può essere sfruttato per rivelare informazioni sulla progressione della malattia, nonché per comprendere la potenziale evoluzione delle mutazioni genomiche conseguenti ai trattamenti clinici, che sono note per indurre resistenza e aumentare l'aggressività.

E' noto che il glioblastoma IDH-*wild type* risulti resistente alle terapie convenzionali a causa di molteplici meccanismi che vanno da caratteristiche biologiche simili alle cellule staminali all'immunosoppressione [53, 54, 55, 56] e a secernere un elevato numero di EVs [57]. Inoltre, le EVs possono essere rilasciate in qualsiasi fase del tumore, esercitando molteplici funzioni biologiche, tra cui la modulazione dello stress ossidativo [58, 59] e trasportando un carico di DNA più stabile rispetto alla forma libera circolante, grazie alla protezione esercitata dalla membrana cellulare. Ciò rappresenta un vantaggio importante, in quanto le tecniche di sequenziamento genico richiedono l'integrità del DNA. Gli acidi nucleici liberi isolati dal sangue sono maggiormente esposti a potenziale contaminazione che può derivare da più fonti cellulari [60].

Era stata già osservata una correlazione tra il DNA contenuto in vescicole extracellulari derivate dal sangue ottenute da pazienti con glioma e volume tumorale e attività mitotica [61].

Nel nostro studio si è analizzata questa correlazione aumentando il numero di osservazioni e focalizzando l'attenzione sul glioblastoma IDH-*wild type* (grado 4), il tumore cerebrale più

aggressivo e il più frequente tra i maligni. Sebbene sia riconosciuto che i pazienti con glioblastoma IDH-*wild type* mostrino un incremento delle vescicole extracellulari [62], approfondimenti sul loro carico di DNA sono attualmente considerati fondamentali per seguire l'evoluzione di un tumore biologicamente molto eterogeneo e dinamico. Il numero di vescicole extracellulari circolanti nei pazienti con glioblastoma IDH-*wild type* ha un ruolo durante il *follow-up* dei pazienti, ma è soggetto a profonde variazioni post-operatorie e chemioterapiche o fenomeni di disseminazione [63]. Risulta pertanto cruciale rafforzare il ruolo dell'analisi molecolare del carico di materiale genetico rispetto alla sola analisi quantitativa delle EVs.

Abbiamo riscontrato una diminuzione del contenuto di DNA nelle EVs isolate dal gruppo di pazienti con glioblastoma IDH-*wild type* in confronto alle EVs isolate dai pazienti afferenti al gruppo di controllo. Questo risultato è in linea con una precedente pubblicazione che mostra che la quantità di DNA localizzato all'interno delle vescicole extracellulari derivate da glioblastoma IDH-*wild type* è inferiore al DNA sulla membrana esterna [64], sebbene altri abbiano evidenziato che gli esosomi tumorali, compreso il glioblastoma IDH-*wild type*, trasportano una maggiore quantità di DNA [65, 66]. Tali discrepanze possono derivare dall'eterogeneità e dalla diversità di contenuto di DNA nelle vescicole extracellulari circolanti e dalla diversa metodologia di isolamento.

Abbiamo trovato prove di coerenza tra il profilo mutazionale genomico contenuto nelle vescicole extracellulari e quello trovato in campioni di tessuto abbinati, suggerendo che il carico a base di DNA delle EVs potrebbe essere utile per riflettere la profonda intra-eterogeneità del glioblastoma IDH-*wild type* [67, 68], consentendo una potenziale caratterizzazione quantitativa e qualitativa del genoma tumorale. Per quanto noto in letteratura, solo due studi riportano l'analisi mutazionale del DNA genomico isolato da vescicole extracellulari derivate dal sangue periferico di pazienti con glioblastoma IDH-*wild type* [64, 69]. Generalmente, l'analisi mutazionale delle vescicole extracellulari di pazienti con glioblastoma IDH-*wild type* si riferisce a un pannello di mutazioni ben riconosciute, tra cui IDH1 e EGFR [3, 69, 70]. Nel nostro studio, abbiamo focalizzato su ulteriori

geni di attuale interesse nel glioblastoma IDH-*wild type* [71]. Abbiamo osservato una tendenza di tutti i pazienti a manifestare mutazioni patogenetiche del gene NF1 sia nelle EVs sia nel tessuto tumorale correlato. In altri studi, le mutazioni di NF1 sono l'espressione di un sottotipo del tumore [64]. In particolare, NF1 è stato recentemente scoperto come un regolatore del segnale RAS/MAK e rappresenta una caratteristica nel profilo mesenchimale nel glioblastoma IDH-*wild type* [72]. Questa è una scoperta chiave, poiché la differenza di contributo tra cellule tumorali e microambiente tumorale (rappresentato anche dalle vescicole extracellulari) non è stato ancora chiaramente definito nel glioblastoma IDH-*wild type*. In linea con questo articolo, abbiamo scoperto che la variante allelica più frequente della mutazione patogenetica di NF1 è stata la c.2568C>G, che è stata descritta solo nelle neoplasie epatiche e colpisce la via delle MAPK, il cui ruolo è riconosciuto nella proliferazione delle cellule tumorali. Abbiamo anche trovato ulteriori varianti patogenetiche che finora sono state descritte per altri tipi di tumore e che devono essere completamente verificati nel glioblastoma IDH-*wild type*. E' stato suggerito un valore prognostico delle microparticelle circolanti nei pazienti con glioblastoma [73], rafforzato anche da osservazioni chiave, tra cui la trasformazione degli astrociti e il trasferimento orizzontale di acidi nucleici all'interno del microambiente tumorale, con conseguente proliferazione della controparte tumorale [74]. Sulla base del ruolo delle vescicole extracellulari nel glioblastoma IDH-*wild type*, l'indice di progressione tumorale (TPI) è attualmente proposto come nuovo marcatore predittivo che consideri le alterazioni molecolari rintracciabili nelle EVs, consentendo una migliore distinzione tra cellule tumorali e tessuto sano [75]. Pertanto, è ipotizzabile che ulteriori mutazioni patogenetiche saranno incluse in futuro. Ad oggi, sono applicate ulteriori tecniche come la FISH e l'immunoistochimica, oltre l'NGS, con risultati spesso discordanti. L'elevata sensibilità e specificità dell'NGS offrono una strategia versatile per ottenere un pannello accurato di marcatori utili per scopi diagnostici [76]. La metodica NGS consente di testare simultaneamente più geni e diversi pannelli di geni possono essere progettati in base a diverse esigenze cliniche e di ricerca [77]. Il gold standard per i gliomi è quello di integrare tali tecniche per definire con precisione la diagnosi e la scelta terapeutica.

Questo studio ha diverse limitazioni. Per raggiungere un'adeguata validazione pro-diagnostica di EVs circolanti nel glioblastoma IDH-*wild type* e per correlare potenzialmente il risultato con i parametri clinici dei pazienti è necessaria una dimensione del campione più elevata.

La presenza di un gruppo multidisciplinare che si occupa di tumori cerebrali nel territorio del Polo Pontino, potendo contare su una casistica ampia e approfonditamente, potrà allargare significativamente l'ampiezza del nostro campione, anche rendendo possibile l'acquisizione di un maggior numero di campioni di sangue periferico per l'estrazione delle EVs.

Non è stato possibile acquisire campioni di sangue seriatati nel tempo. Pertanto, sarà importante esaminare i potenziali cambiamenti nel carico molecolare del DNA contenuto nelle vescicole extracellulari parallelamente a una più profonda stratificazione dei pazienti e dei sottotipi di GBM. In particolare, è stata effettuata la valutazione NGS sul gene TERT piuttosto che sulla regione del promotore. Infatti, mutazioni non codificanti di questo questi ultimi sono considerati fattori chiave descritti ad alta frequenza e che rappresentano elementi per caratterizzare il glioblastoma IDH-*wild type* [78, 79, 80].

CONCLUSIONI

Questo studio dimostra una corrispondenza tra le mutazioni rilevate nelle EVs isolate dai campioni di sangue dei pazienti affetti da glioblastoma IDH-*wild type* con quelle rilevate nel tessuto neoplastico. La corrispondenza è risultata dell'80% per quanto riguarda il gene NF1. Tale dato supporta la possibile validità della biopsia liquida come tecnica poco invasiva al fine di identificare fattori diagnostici, prognostici e predittivi in questo tipo di neoplasie.

L'elevata frequenza della mutazione patogenetica NF1 c.2568C>G che abbiamo rilevato suggerisce un possibile ruolo nella patogenesi, nella evoluzione e nel rapporto con il microambiente del glioblastoma IDH-*wild type*, aprendo prospettive interessanti per futuri lavori.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Q.T. Ostrom et al., CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2016—2020, *Neuro-Oncology* 25(S4), iv1–iv99, 2023
- [2] WHO Classification of Tumors of Central Nervous System, 6th ed., 2021
- [3] H. Yan et al., IDH1 and IDH2 mutations in gliomas, *New England Journal of Medicine* 2009; 360.8
- [4] M.J. van den Bent et al., Chromosomal anomalies in oligodendroglial tumours are correlated with clinical features, *Cancer* 2003 1:97 (5): 1276-1284
- [5] J.G. Cairncross et al., Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas, 1998, *Journal of National Cancer Institute* 90: 1473-1479
- [6] A.A. Brandes et al., Correlations between O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation status, 1p and 19q deletions, and response to temozolomide in anaplastic and recurrent oligodendroglioma: a prospective GICNO study, *Journal of Clinical Oncology*, 2006 10:24(29):4746-4753
- [7] M.J. Riemenschneider et al., Molecular diagnostics of gliomas: state of the art, *Acta neuropathologica* 2010; 120: 567-584
- [8] L. Dang et al., Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate, *Nature* 2009 Dec 10;462(7274):739-744
- [9] T. Watanabe et al., IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas, *Am J Pathol.* 2009 Apr;174(4):1149-53
- [10] M. E. Hegi et al., MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma, *New England Journal of Medicine*, 2005, 10;352(10):997-1003

- [11] H.S. Phillips et al., Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis, *Cancer cell*, 9, 3.2006
- [12] M. Yanez-Mo et al., Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions, *J Extracell Vesicles* 2015 4:27066
- [13] J.C. Akers et al., Biogenesis of extra-cellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol* 2013 113(1):1–11
- [14] C. Théry et al., Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 2018 7(1):1535750
- [15] M.P. Bebelman et al., Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacol Ther* 2018, 188:1–11
- [16] G. Raposo & W. Stoorvogel, Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373–383 (2013)
- [17] K. Carayon et al., Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation, *J. Biol. Chem.* 286, 34426–34439 (2011).
- [18] E. Segura et al., Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses, *Blood Cells Mol. Dis.* 35, 89–93 (2005).
- [19] W.M. Henne et al., The ESCRT pathway, *Dev Cell* (2021) 21(1):77–91
- [20] S. Stuffers et al., Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs, *Traffic* 2009 10(7):925–937
- [21] B.J. Tauro et al., Two distinct populations of exosomes are released from LIM1863 colon carcinoma cell-derived organoids, *Mol. Cell. Proteom.* 2013;12:587–598

- [22] J.F. Kerr et al., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, 1972 *Br J Cancer* 26(4):239–257
- [23] B.J. Tauro et al., Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes, *Methods*. 2012;56:293–304
- [24] J. Escola et al., Selective Enrichment of Tetraspan Proteins on the Internal Vesicles of Multivesicular Endosomes and on Exosomes Secreted by Human B-lymphocytes, *J. Biol. Chem.* 1998;273:20121–20127
- [25] H.F. Heijnen H.F. et al., Activated platelets release two types of membrane vesicles: Microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules, *Blood* 1999;94:3791–3799
- [26] C. Théry et al., Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles, *J. Immunol.* 2001;166:7309–7318.
- [27] J. Skog et al., Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers, *Nature cell biology*, 2008;10:1470–1476
- [28] I. Nazarenko et al., Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation, *Cancer research*, 2010;70:1668–1678
- [29] H. Valadi et al., Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells, *Nature cell biology*, 2007;9:654–659
- [30] L. Zhang et al., Microenvironment-induced PTEN loss by exosomal microRNA primes brain metastasis outgrowth, *Nature*, 2015;527:100–104
- [31] X. Wang et al., Investigation of the roles of exosomes in colorectal cancer liver metastasis, *Oncology reports*, 2015;33:2445–2453

- [32] P.D. Stein, Incidence of venous thromboembolism in patients hospitalized with cancer, *The American journal of medicine*, 2006;119:60–68
- [33] J. Rak, Microparticles in cancer, *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 2010;36:888–906
- [34] V. Luga et al., Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration, *Cell*, 2012;151:1542–1556
- [35] B.H. Sung, Directional cell movement through tissues is controlled by exosome secretion, *Nature communications*, 2015;6:7164
- [36] M. Ono et al., Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells, *Science signaling*, 2014;7:ra63
- [37] B.J. Tauro et al., Oncogenic H-ras reprograms Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell-derived exosomal proteins following epithelial-mesenchymal transition, *Molecular & cellular proteomics: MCP*. 2013;12:2148–2159
- [38] L. Zitvogel et al., Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes, *Nature medicine* 1998;4:594–600
- [39] A. Benito-Martin et al., The new deal: a potential role for secreted vesicles in innate immunity and tumor progression, *Frontiers in immunology*, 2015;6:66
- [40] W. Chen et al., Efficient induction of antitumor T cell immunity by exosomes derived from heat-shocked lymphoma cells, *European journal of immunology*, 2006;36:1598–1607
- [41] E.G. Trams et al., Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles, *BBA Biomembr* 645(1):63–70
- [42] J. Skog et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers, *Nat Cell Biol* 10(12):1470–1476

- [43] P. Kucharzewska et al., Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development, 2013 Proc Natl Acad Sci USA 110
- [44] K. Al-Nedawi et al., Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells, 2008 Nat Cell Biol 10(5):619–624
- [45] M.G. Best et al., Liquid biopsies in patients with diffuse glioma, Acta Neuropathol 2015 129(6):849–865
- [46] S. Boukouris, S. Mathivanan, Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers, Proteomics Clinical applications, 2015;9:358–367
- [47] F. Gao et al., Circulating tumor cell is a common property of brain glioma and promotes the monitoring system. Oncotarget 2016 7(44):71330–71340
- [48] S.J. Bagley et al., Clinical Utility of Plasma Cell-Free DNA in Adult Patients with Newly Diagnosed Glioblastoma: A Pilot Prospective Study, Clin. Cancer Res. 2020, 26, 397–407
- [49] A. Ilhan et al., Angiogenic factors in plasma of brain tumour patients, Anticancer Res 2009 29(2):731–736
- [50] B. Boisselier et al., Detection of IDH1 mutation in the plasma of patients with glioma, Neurology 2012 79(16):1693–1698
- [51] J.M. Figueroa et al. Detection of wild-type EGFR amplification and EGFRvIII mutation in CSF-derived extracellular vesicles of glioblastoma patients. Neuro Oncol. 2017, 19, 1494–1502
- [52] N. Garcia-Romero et al., DNA sequences within glioma-derived extracellular vesicles can cross the intact blood–brain barrier and be detected in peripheral blood of patients, Oncotarget 2017 8(1):1416–1428

- [53] M. Cenciarini, et al., Dexamethasone in Glioblastoma Multiforme Therapy: Mechanisms and Controversies. *Front. Mol. Neurosci.* 2019, 12, 65
- [54] S.Y. Lee et al., Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme, *Genes Dis.* 2016, 3, 198–210
- [55] P. Rosa et al., BK channels blockage inhibits hypoxia-induced migration and chemoresistance to cisplatin in human glioblastoma cells, *J. Cell. Physiol.* 2018, 233, 6866–6877
- [56] E.K. Noch et al., Challenges in the Treatment of Glioblastoma: Multisystem Mechanisms of Therapeutic Resistance, *World Neurosurg.* 2018, 116, 505–517
- [57] C.A. Whitehead et al, Extracellular vesicles and their role in glioblastoma, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2019, 1–26
- [58] J. Ho et al., Extracellular Vesicles and Cancer Therapy: Insights into the Role of Oxidative Stress, *Antioxidants* 2022, 11, 1194
- [59] M. Miceli et al., Synthesis of Benzofuran-2-One Derivatives and Evaluation of Their Antioxidant Capacity by Comparing DPPH Assay and Cyclic Voltammetry. *Molecules* 2018, 23, 710.
- [60] F. Salvianti et al., The pre-analytical phase of the liquid biopsy. *New Biotechnol.* 2020, 55, 19–29.
- [61] A. Piazza et al., Circulating Exosomal-DNA in Glioma Patients: A Quantitative Study and Histopathological Correlations-A Preliminary Study. *Brain Sci.* 2022, 12, 500
- [62] M. Del Bene et al., Extracellular vesicles: The key for precision medicine in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2022, 24, 184–196
- [63] Q. Sabbagh et al., Counting on extracellular vesicles for glioblastoma patients, *Oncogene* 2020, 39, 6043–6052

- [64] C.L. Maire et al., Genome-wide methylation profiling of glioblastoma cell-derived extracellular vesicle DNA allows tumor classification, *Neuro Oncol.* 2021, 23, 1087–1099
- [65] D.R. Santiago-Dieppa et al., Extracellular vesicles as a platform for ‘liquid biopsy’ in glioblastoma patients, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2014, 14, 819–825
- [66] M.R. Fernando et al., New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes, *PLoS ONE* 2017, 12, e0183915
- [67] F. Torrisi et al., The Hallmarks of Glioblastoma: Heterogeneity, Intercellular Crosstalk and Molecular Signature of Invasiveness and Progression, *Biomedicines* 2022, 10, 806
- [68] A.P. Patel et al., Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 2014, 344,1396–1401
- [69] N. Garcia-Romero et al., DNA sequences within glioma-derived extracellular vesicles can cross the intact blood-brain barrier and be detected in peripheral blood of patients, *Oncotarget* 2017, 8, 1416–1428
- [70] C. Degli Esposti et al., Exosomes from Plasma of Neuroblastoma Patients Contain Doublestranded DNA Reflecting the Mutational Status of Parental Tumor Cells, *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 3667
- [71] J. Liu et al., Significance of TERT and ATRX mutations in glioma. *Oncol. Lett.* 2019, 17, 95–102
- [72] C. Marques et al., NF1 regulates mesenchymal glioblastoma plasticity and aggressiveness through the AP-1 transcription factor FOSL1. *eLife* 2021, 10, e64846
- [73] G. Reynes et al., Circulating endothelial cells and procoagulant microparticles in patients with glioblastoma: Prognostic value, *PLoS ONE* 2013, 8, e69034

- [74] A. Zeng et al., Extracellular Vesicles Facilitate Transformation of Astrocytes via Reprogramming Oncogenic Metabolism, *iScience* 2020, 23, 101420
- [75] H. Shao et al., Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy, *Nat. Med.* 2012, 18, 1835–1840
- [76] E. Tirro et al., A Custom DNA-Based NGS Panel for the Molecular Characterization of Patients With Diffuse Gliomas: Diagnostic and Therapeutic Applications. *Front. Oncol.* 2022, 12, 861078
- [77] G. Broggi et al., Glioblastoma, IDH-Wild Type With FGFR3-TACC3 Fusion: When Morphology May Reliably Predict the Molecular Profile of a Tumor. A Case Report and Literature Review, *Front. Neurol.* 2022, 13, 823015
- [78] C.J. Barger et al., Conserved features of TERT promoter duplications reveal an activation mechanism that mimics hotspot mutations in cancer, *Nat. Commun.* 2022, 13, 5430
- [79] P.J. Killela et al., TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013, 110, 6021–6026
- [80] N. Olympios et al., TERT Promoter Alterations in Glioblastoma: A Systematic Review, *Cancers* 2021, 13, 1147