

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA, EMATOLOGIA E PATOLOGIA**

Ciclo 35

Settore Concorsuale: 06/A4 - ANATOMIA PATOLOGICA

Settore Scientifico Disciplinare: MED/08 - ANATOMIA PATOLOGICA

**DIAGNOSTICA INTEGRATA NEI GLIOMI DI BASSO GRADO DI ETA'
PEDIATRICA: ASTROCITOMA PILOCITICO E VIA DELLE MAP-KINASI**

Presentata da: Viscardo Paolo Fabbri

Coordinatore Dottorato
Manuela Ferracin

Supervisore
Maria Pia Foschini

Esame finale anno 2023

DIAGNOSTICA INTEGRATA NEI GLIOMI DI BASSO GRADO DI ETA' PEDIATRICA: ASTROCITOMA PILOCITICO E VIA DELLE MAP-KINASI

INDICE

1. Introduzione

- 1.1 Epidemiologia*
- 1.2 Clinica*
- 1.3 Neuroimaging*
- 1.4 Anatomia Patologica*
- 1.5 Patologia Molecolare*
- 1.6 Trattamento*
- 1.7 Prognosi*

2. Scopo della tesi

3. Materiali e metodi

3.1 PARTE RETROSPETTIVA

- 3.1.1 Selezione dei campioni*
- 3.1.2 Revisione istologica*
- 3.1.3 Raccolta dei dati neuroradiologici*
- 3.1.4 Raccolta dei dati neurochirurgici*
- 3.1.5 Raccolta dei dati clinici*

3.2 PARTE SPERIMENTALE

- 3.2.1 Valutazione FISH della duplicazione in tandem e fusione dei geni BRAF-KIAA 1549*
 - 3.2.2 Valutazione immunoistochimica della mutazione BRAF V600E*
 - 3.2.3 Valutazione mediante sequenziamento Next Generation Sequencing (NGS) del gene BRAF*
- #### **3.2.3 COMMITATO ETICO**

4. Risultati

- 4.1 Popolazione*
- 4.2 Sede del tumore*
- 4.3 Manifestazioni cliniche*
- 4.4 Neuroimaging*
- 4.5 Revisione istologica ed immunoistochimica*
- 4.6 Trattamento*
- 4.7 Follow-up*
- 4.8 Risultati FISH della duplicazione in tandem e fusione dei geni BRAF-KIAA 1549*
- 4.9 Risultati dell'indagine immunoistochimica della mutazione BRAF V600E*
- 4.10 Risultati sequenziamento NGS del gene BRAF*

5. Discussione

6. Conclusioni

7. Bibliografia

8. Figure

9. Grafici

1. INTRODUZIONE

La nuova Classificazione dei Tumori del Sistema Nervoso Centrale (SNC), pubblicata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel 2021 [1], è basata sul principio della diagnosi integrata multidisciplinare.

Neuroradiologia, neuropatologia e patologia molecolare rappresentano i cardini dell'iter diagnostico dei tumori cerebrali primitivi.

Ciascuna disciplina fornisce dati a vari livelli, che dovranno poi essere coniugati in un'unica interpretazione.

Tale principio è ampiamente visibile nella diagnostica delle lesioni gliali.

Nella nuova classificazione i gliomi sono stati suddivisi radiologicamente in base al tipo di crescita: infiltrativa (diffusa) o espansiva.

Ai gliomi diffusi appartengono sia quelli dell'età adulta (astrocitoma IDH mutato, oligodendroglioma, glioblastoma IDH wild-type) sia quelli dell'età pediatrica (tumore neuroepiteliale polimorfo di basso grado, glioma diffuso di basso grado con alterazioni di MYB or MYBL1, glioma angiocentrico e glioma diffuso di basso grado con alterazioni del MAPK pathway), la cui distinzione avviene successivamente su base morfologica e molecolare.

Ai gliomi espansivi appartengono invece sia alcune lesioni gliali pure sia le lesioni miste glioneuronali e neuronali.

Delle prime fa parte l'astrocitoma pilocitico (AP) comprende il 5,1% di tutti i gliomi [2].

1.1 EPIDEMIOLOGIA

Dai dati del CBTRUS (Central Brain Tumours Registry of the United States), l'AP rappresenta il tumore primitivo cerebrale più frequente tra gli 0 ed i 19 anni con circa 4,8 nuovi casi all'anno per un milione di abitanti, senza una significativa predilezione di genere [2, 3].

L' AP è associato con maggiore frequenza in alcune sindromi ereditarie come la Neurofibromatosi di tipo 1 (alterazione germline del gene NF1) o la sindrome di Noonan (alterazione germline di geni coinvolti nella via delle MAP-Kinasi come PTPN11, SOS1, KRAS, NRAS, RAF1 etc.).

La sede di insorgenza più frequente è il cervelletto (67%) seguita dal compartimento sovratentoriale (36%), dal tratto ottico e dall'ipotalamo (10%), dal tronco encefalico (8%) e infine dal midollo spinale (2%) [3,4].

1.2 CLINICA

La presentazione clinica dell'AP varia a seconda della sede e dalla dimensione della neoplasia.

Calo del visus e deficit campimetrico sono associati ad una localizzazione sulle vie ottiche.

Disturbi endocrini (pubertà precoce, obesità, diabete insipido e squilibri elettrolitici) sottendono ad una lesione ipotalamica.

Nausea, vomito, atassia sono più tipici di una localizzazione sottotentoriale.

La sintomatologia è spesso insidiosa, indice della lenta crescita del tumore e dalle limitate capacità del bambino di riferire i propri disturbi.

1.3 NEUROIMAGING

Alla Tomografia Computerizzata, usata per lo più nell'ambito dello studio in urgenza del paziente, l'AP appare una lesione ben circoscritta iso-ipodensa [5].

Alla Risonanza Magnetica esso appare più frequentemente come massa espansiva, iso-ipointensa nelle sequenze T1-pesate, iper-intensa nelle T2 e FLAIR [5].

A livello del cervelletto l'AP spesso si presenta come lesione cistica con nodulo ipercaptante.

I tumori che interessano il tratto ottico assumono invece un caratteristico aspetto fusiforme.

Lesioni con caratteristiche radiologiche "atipiche" (ad esempio con presenza di necrosi) sono state occasionalmente descritte in letteratura e possono essere erroneamente interpretate come lesioni di alto grado [5].

1.4 ANATOMIA PATOLOGICA

All'esame macroscopico l'AP presenta limiti ben definiti rispetto al tessuto circostante.

Esso si presenta con superficie di taglio bianco-grigiastro, con formazioni cistiche e

microcistiche.

Depositi di calcio o emosiderina (esito di micro-emorragie) non sono infrequenti nel contesto della lesione.

Dal punto di vista istopatologico l'elemento diagnostico principale è rappresentato dalla bifasicità del processo, ossia dalla presenza di aree fibrillari compatte alternate ad aree mixoidi, lasse, microcistiche [4].

Le aree compatte sono caratterizzate dalla presenza di elementi allungati con citoplasma eosinofilo di aspetto piloide, associate a fibre di Rosenthal e corpi granulari eosinofili (depositi di materiale amorfo denso e filamenti gliali).

Le aree lasse sono invece costituite da elementi rotondeggianti talora con citoplasma chiaro, simil-oligodendrogliali.

Generalmente assenti sono i caratteri istologici di malignità, ossia elevato indice mitotico, necrosi a palizzata e proliferazione vascolare tumorale.

Focolai di necrosi coagulativa sono descritti soprattutto nelle lesioni di grandi dimensioni e sono prive di un significato prognostico.

Trama vascolare prominente (c.d. proliferazione vascolare lineare) soprattutto alla periferia della lesione, rende ragione della ipercaptazione radiologica.

All'indagine immunohistochemica le cellule tumorali mostrano diffusa positività per GFAP (Proteina Glio-Fibrillare Acida) ed OLIG2 con indice proliferativo (MIB-1) inferiore generalmente al 5%.

Negativi invece sono i markers di differenziazione neuronale (Sinaptofisina, Cromogranina, NeuN).

1.4.1 DIAGNOSI DIFFERENZIALI MORFOLOGICHE

La diagnostica differenziale dell'astrocitoma pilocitico è molto ampia e prende in considerazione sia lesioni neoplastiche sia processi non neoplastici.

I già citati gliomi diffusi di età pediatrica presentano un quadro neuroradiologico infiltrativo, non comune a quello dell'AP.

Alcuni tumori misti glioneuronali (ganglioglioma, tumore glioneuronale formante rosette) presentano caratteristiche sovrapponibili, tra cui la lenta crescita espansiva, l'aspetto cistico talora con nodulo murale ipercaptante e, a livello istologico, la presenza di

fibre di Rosenthal o corpi granulari eosinofili. Tuttavia queste entità si differenziano per la presenza di una doppia componente tumorale, dimostrabili tanto alla morfologia quanto all'immunoistochimica: neuronale e gliale.

Tra le patologie non tumorali vanno senza dubbio ricordate le gliosi reattive post-ischemiche o infiammatorie, nonché alcune malattie genetiche come la malattia di Alexander, caratterizzate dall'abbondante deposizione di fibre di Rosenthal.

Il dato neuroradiologico di un processo espansivo integrato al dato istologico di ipercellularità, bifasicità, di atipie citologiche e di attività proliferativa significativa (per quanto minime), possono aiutare nella corretta interpretazione del preparato.

1.5 PATOLOGIA MOLECOLARE

Come in altri tumori di basso grado in età pediatrica, i geni principalmente coinvolti nella patogenesi dell'AP riguardano la via delle Mitogen-Activated Protein Kinase (MAP-K) [4, 6, 7].

Tale pathway regola l'induzione della mitosi nelle cellule eucariotiche (Figura 1).

Le alterazioni più frequenti riguardano indubbiamente il gene di BRAF: la principale anomalia è rappresentata dalla duplicazione in tandem di circa 2Mb del cromosoma 7q34 che genera il prodotto di fusione BRAF-KIAA 1549 (70%) (Figura 2).

Seguono mutazioni puntiformi del gene, di cui BRAF V600E è la più rappresentata (18%).

Sono inoltre riportate mutazioni di FGFR1, KRAS, NF1, NTRK, RAF1, ROS-1.

Tali alterazioni possono avere frequenza diverse in base alla sede di insorgenza della neoplasia (Figura 3).

Per definizione, l'AP non presenta mutazioni del gene IDH (patognomoniche dei gliomi diffusi dell'adulto) e mutazioni dell'istone H3.3 (associata a gliomi pediatrici di alto grado).

1.5.1 IL GENE BRAF

BRAF è un importante enzima (chinasi) che controlla la proliferazione cellulare.

Il gene di BRAF è situato sul cromosoma 7, in posizione q34.

In seguito ad un complesso fenomeno di splicing alternativo si originano diverse

molecole di mRNA maturo, la cui traduzione condurrà a tre isoforme alternative di RAF, ovvero A-Raf, B-Raf e C-Raf.

Tutte esse partecipano alla cascata di traduzione del segnale RAS-RAF-MEK-ERK [7].

Il legame del ligando in maniera specifica e appropriata al recettore tirosin-chinasico a monte della cascata, porta a una autofosforilazione del recettore stesso e alla induzione dell'interazione con la proteina RAS.

Ciò porta alla successiva attivazione della proteina RAS, appartenente alla famiglia delle proteine ad attività GPTasica, che passa alternativamente, e in risposta appunto ai diversi segnali stimolatori, dalla sua forma inattiva a quella attiva.

Dopo essere stata attivata, la proteina RAS fosforila RAF che a sua volta lega e fosforila MEK. Questa cascata di attivazione di chinasi localizzate più a valle culmina con la fosforilazione di ERK la quale trasloca nel nucleo dove fosforila specifici fattori di trascrizione che, a loro volta, attivano l'espressione genica.

Sebbene tutte e tre le isoforme (A-RAF, B-RAF e C-RAF) siano in grado di attivare la cascata delle MAP chinasi, l' isoforma BRAF ha destato maggiore interesse nel campo dell'oncologia dei tumori solidi per la notevole incidenza di mutazioni (Figura 4).

Le mutazioni di C-RAF e A-RAF sono al contrario rare e per la loro attività oncogenica, è necessaria la concomitante presenza di almeno due mutazioni.

1.6 TRATTAMENTO

Il trattamento di elezione dell'AP è di tipo chirurgico [8].

A seconda della sede, esso può raggiungere un'asportazione totale, subtotale o parziale della massa.

Mentre una resezione totale è auspicabile nelle lesioni sottotentoriali, nelle regioni sovratentoriali difficilmente tale obiettivo è perseguibile.

In casi particolari (intervento chirurgico non praticabile, asportazioni incomplete con perseveranza dei sintomi, malattie recidivanti) possono essere intrapresi trattamenti farmacologici secondo il protocollo SIOP (Società Internazionale di Oncologia Pediatrica) del 2004 che prevede cicli di vincristina e carboplatino, con possibilità di aggiungere etoposide.

Il protocollo SIOP 2004 prevede in casi selezionati (comunque a partire dagli 8 anni)

l'utilizzo di radioterapia frazionata.

Target-therapy indirizzate verso la via delle MAP-Kinasi (in particolare farmaci anti-BRAF dabrafenib o anti-MEK trametinib) sono in fase di studio e rappresentano una nuova frontiera dell'oncologia medica [6, 8]

1.7 PROGNOSI

Secondo la Classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità del 2021, l'AP appartiene alle lesioni di grado 1 [1].

Generalmente la sopravvivenza globale è elevata e supera il 90% a 10 anni di follow-up [2].

Tuttavia in letteratura sono disponibili pochi dettagli sul tasso di recidive della neoplasia sia a 10 anni sia oltre [9] nonché sull'incidenza di progressione a forme anaplastiche, correlata per lo più ad alcuni fattori come pregresse terapie radianti [10].

2. SCOPO DELLA TESI

Scopo della tesi è:

- a) la revisione di un'ampia casistica di pazienti affetti da astrocitoma pilocitico (AP), valutandone in particolare il tasso di recidive e l'eventuale insorgenza di complicanze in un lungo periodo di follow-up, superiore anche a 10 anni.
- b) l'approfondimento della diagnostica integrata di questo tumore, effettuando indagini di biologia molecolare richieste dalle linee guida indicate nella nuova Classificazione dei Tumori del SNC [1].

3. MATERIALI E METODI

Lo studio è suddiviso in due parti:

a) una parte osservazionale, retrospettiva su un campione di 100 pazienti in età pediatrica con diagnosi di astrocitoma pilocitico dal 1992 al 2021, dei quali

- è stata eseguita la revisione istologica dei preparati;
- è stata eseguita la revisione degli esami neuroradiologici;
- è stata eseguita la revisione della storia clinica disponibile (terapia e follow-up).

b) una parte sperimentale: sono state eseguite indagini di immunoistochimica e patologia molecolare per valutare le principali alterazioni sulla via delle MAP-Kinasi della casistica raccolta

- mediante tecnica di Fluorescent In Situ Hybridization (FISH), lo studio della duplicazione in tandem del cromosoma 7q34 con prodotto di fusione BRAF-KIAA 1549.
- immunoistochimica per la valutazione della presenza di mutazione BRAF V600E;
- mediante tecnica di Next Generation Sequencing (NGS), lo studio del gene BRAF;

3.1 PARTE RETROSPETTIVA

3.1.1 SELEZIONE DEI CAMPIONI

Tramite la consultazione dei sistemi di refertazione informatici dell' U.O. di Anatomia e Istologia Patologia dell' Ospedale Bellaria di Bologna sono stati identificati tutti i casi di AP in età pediatrica (0-18 anni) nel periodo compreso tra 01/01/1992 e 31/12/2021.

Sono stati inclusi nello studio i casi che presentavano i seguenti criteri:

- disponibilità dei preparati istologici;
- disponibilità di tessuto incluso in paraffina;

Di ogni caso a disposizione si è poi provveduto a ricercare:

- le informazioni neuroradiologiche (Programma Interaziendale di Neuroradiologia con Tecniche ad elevata complessità e di Neurochirurgia Pediatrica dell' IRCCS – Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna).
- le informazioni neurochirurgiche (U.O. di Neurochirurgia Pediatrica, IRCCS – Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna).

- le informazioni clinico-oncologiche (U.O. di Emtologia ed Oncologia Pediatrica del Policlinico S.Orsola-Malpighi di Bologna).

3.1.2 REVISIONE ISTOLOGICA

Sono stati revisionati i preparati istologici conservati in Ematossilina-Eosina relativi ai casi selezionati e conservati nell'archivio dell' U.O. di Anatomia e Istologia Patologia dell' Ospedale Bellaria di Bologna, applicando i criteri diagnostici della Classificazione dei Tumori del SNC 2021 dell' OMS [1].

Per ogni caso sono stati valutati la presenza di aspetto bifasico (aree compatte e lasse), la cellularità, l'indice mitotico, la proliferazione vascolare tumorale e la presenza necrosi.

E' stata eseguita inoltre la rivalutazione delle seguenti indagini immunohistochimiche eseguite sulle sezioni FFPE (formalin fixed and Paraffin Embedded):

- a) Proteina Glio-Fibrillare Acida (GFAP): unità proteica essenziale di cui sono costituiti i filamenti intermedi delle cellule glisli ed in particolar modo degli astrociti;
- b) Fattore di trascrizione degli oligodendrociti (OLIG2): proteina di della famiglia bHLH (basic helix-loop-helix) con funzioni anti-neurogeniche o pro-neurogeniche a seconda delle fasi di maturazione del SNC. Inizialmente ritenuta presente solo negli oligodendrociti, è divenuto nel tempo un comune marker nucleare di differenziazione gliale.
- c) Sinaptofisina: proteina delle vescicole sinaptiche, indicante una differenziazione neuronale della cellula.
- d) Ki67: marker proliferativo codificato dal gene MKI67.

Tutti gli anticorpi sono stati eseguiti su sezioni di 2 micron di spessore con la procedura standard dell'immunocoloratore automatica Ventana (Ventana XT autostainer, Ventana Medical System, Tuscon, AZ, USA).

3.1.3 RACCOLTA DEI DATI NEURORADIOLOGICI

Sono stati consultati i referti di Risonanze Magnetiche (RM) con e senza mezzo di contrasto (mdc) eseguite presso il Programma Interaziendale di Neuroradiologia con Tecniche ad elevata complessità – Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna.

Considerando le sequenze principali dell'esame (T1. T2, DWI – diffuson weighted

imaging) si sono valutati la sede, i caratteri morfologici del processo (natura solida o cistica, bordi espansivi o infiltrativi, omogeneità o disomogeneità della lesione), l'impregnazione contrastografica.

Sono stati consultati sia gli esami all'esordio sia durante il follow-up della malattia.

3.1.4 RACCOLTA DEI DATI NEUROCHIRURGICI

Sono state consultate le informazioni relative agli interventi chirurgici eseguiti presso U.O. di Neurochirurgia Pediatrica, IRCCS – Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna.

In particolare esecuzione di procedura chirurgica diagnostica o terapeutica ed eventuale debulking ottenuto [11]:

- radicale o *gross total resection* (GTR): la neoplasia viene eradicata completamente all'intervento chirurgico senza residui visibili ai controlli neuroradiologici immediatamente successivi alla procedura.

- subtotale *subtotal resection* (STR): la neoplasia viene eradicata all'intervento chirurgico con un residuo visibile ai controlli neuroradiologici immediatamente successivi alla procedura e valutati.

La resezione della neoplasia varia dal 25 al 90% del suo volume.

- parziale (o biptica): la resezione è <25% del volume totale della neoplasia.

Sono stati consultati sia i dati del primo intervento sia di eventuali re-interventi.

3.1.5 RACCOLTA DEI DATI CLINICI

Sono state consultate le informazioni cliniche presso l' U.O. di Emtologia ed Oncologia Pediatrica del Policlinico S.Orsola-Malpighi di Bologna.: sintomi all'esordio, eventuali terapie medico-oncologiche eseguite, recidive e periodi liberi da malattia, eventuali decessi.

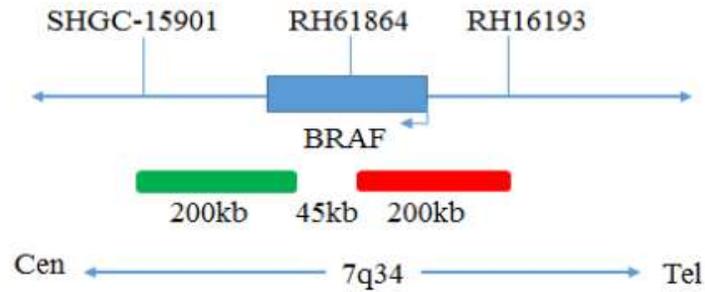
3.2 PARTE SPERIMENTALE

3.2.1 VALUTAZIONE FISH DELLA DUPLICAZIONE IN TANDEM E FUSIONE DI BRAF-KIAA 1549

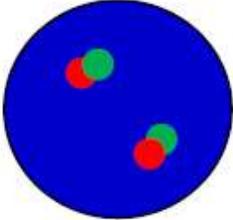
La valutazione della duplicazione in tandem e fusione di BRAF-KIAA 1549 è stata

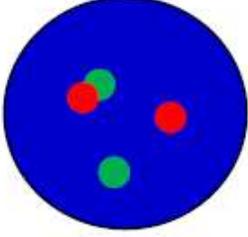
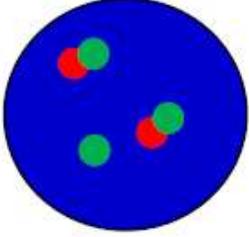
effettuata a partire da materiale FFPE mediante BRAF (7q34) Gene Break Apart Probe Detection Kit (Wuhan HealthCare Biotechnology Co., Gaoxin Boulevard, Optics Valley Biolake, Building B6, 4/5F. Wuhan, Hubei, 430075, PR of China).

Il kit consiste in una sonda *dual color* per BRAF:



L'interpretazione del segnale avviene mediante l'osservazione al microscopio a fluorescenza Olympus BX6 (Olympus, Melville, NY) in camera oscura:

 BRAF signal	 BRAF signal
	Negative: 2 Fusions (Negative: 2F)

	<p>Positive: 1 Orange ; 2 Green ; 1 Fusion [Positive: 1R-2G-1F]</p>
	<p>Positive: 1 Green ; 2 Fusions [Positive: 1G-2F]</p>

3.2.2 VALUTAZIONE IMMUNOISTOCHEMICA DELLA MUTAZIONE BRAF V600E

La valutazione immunohistochemica della presenza della proteina mutata BRAF V600E è stata eseguita su sezioni di 2 micron di spessore da materiale FFPE con la procedura standard dell'immunocoloratore automatica Ventana (Ventana XT autostainer, Ventana Medical System, Tuscon, AZ, USA).

Si ritiene positiva un' immunoreattività citoplasmatica intensa e omogenea.

3.2.3 VALUTAZIONE MEDIANTE SEQUENZIAMENTO Next Generation Sequencing (NGS) DEL GENE BRAF

Il DNA è stato estratto utilizzando il kit NucleoSpin Tissue mini kit (Machery-Nagel GmbH, Dueren, Germany).

Le librerie di Next Generation Sequencing sono state preparate seguendo il protocollo descritto da Morandi L et al. [13].

In breve, l'esone 15 del gene BRAF è stato amplificato utilizzando adattatori Nextera; il barcoding è stato effettuato utilizzando una seconda reazione di PCR da 8 cicli di amplificazione.

Le librerie sono state caricate su piattaforma Illumina MiSEQ in modo da allocare almeno 2000 letture per ogni paziente.

Al termine della corsa i risultati sono stati valutati in cloud computing utilizzando la piattaforma GalaxyProject [14], ed in particolare attraverso i tool BWA-MEM e IGV.

3.3 COMITATO ETICO

Approvazione dello studio da parte del Comitato Etico di area vasta Emilia centro, numero 467-2021-OSS-AUSLBO-21070-ID2239.

4. RISULTATI

4.1 POPOLAZIONE

Sono stati selezionati 100 pazienti, di cui 54 di sesso femminile (54%) e 46 di sesso maschile (46%).

L'età media al momento del primo intervento chirurgico è stata di 8 anni (range: 8 – 213 mesi).

4 pazienti di sesso femminile risultavano affette da Neurofibromatosi di tipo 1 (4%).

4.2 SEDE DEL TUMORE

Al momento della diagnosi, 58 AP risultavano localizzati in sede sottotentoriale (58%) , 41 in sede sovratentoriali (41%) e 1 (1%) con morfologia “a clessidra” transtentoriale (1%) (Grafico 1).

Dei tumori sottotentoriali, 47 erano localizzati al cervelletto, 6 nel tronco encefalico, 5 nel midollo spinale (1 a livello cervicale con estensione al tratto toracico, 3 a livello toracico ed 1 con estensione cervico-lombare).

Per quanto riguarda le neoplasie sovratentoriali, 12 a livello dei lobi cerebrali (5 nel lobo frontale, 2 lobo temporale, 4 lobo parietale, 1 lobo occipitale), 2 nella regione del III ventricolo, 1 nella ghiandola pineale, 3 nel talamo, 17 in regione sellare (ipotalamo e chiasma ottico), 6 nel nervo ottico .

4.3 MANIFESTAZIONI CLINICHE

Di 53 pazienti su 100 è stato possibile reperire notizie dettagliate sulla sintomatologia all'esordio della malattia.

Nei 26 casi di AP sottotentoriale cerebellare sono state riscontrate le seguenti condizioni: ipertensione endocranica (n=12), ipertensione endocranica associata ad atassia (n=9), atassia (n=1), atassia e disturbi endocrinologici (n=1), reperto occasionale in assenza di sintomi specifici (n=3).

In 4 pazienti con localizzazione al tronco encefalico sono state descritte crisi epilettiche (n=1), deficit dei nervi cranici (n=1) e ipertensione endocranica con disturbi motori (n=4).

Disturbi nella marcia, dismetrie e scoliosi ingravescente sono stati descritti in 1 paziente con malattia a livello del midollo spinale toracico.

Per quanto riguarda la sede sovratentoriale emisferica, i pazienti hanno sviluppato crisi epilettiche (n=4), crisi epilettiche ed ipertensione endocranica n=4), ipertensione endocranica (n=1).

Deficit visivi (n=7), disturbi endocrinologici della sfera dell'accrescimento (n=1) ed ipertensione endocranica (n=1) sono stati i quadri clinici manifestati dalle lesioni di chiasma ottico ed ipotalamo.

Gli AP a carico dei nervi ottici sono esorditi con papilledema ed esoftalmo (n=2).

In un paziente affetto da NF1, l'AP è stato diagnosticato in corso di screening con RM.

4.4 NEUROIMAGING

E' stata rivalutata la RM all'esordio in 63 casi su 100.

L'aspetto dell'AP in 54 casi si è rivelato solido-cistico (85% dei casi rivalutati), di cui 28 cerebellari, 9 sovratentoriali, 10 ipotalamo e chiasma, 3 tronco encefalico, 4 midollo spinale (Figura 5A).

In 6 (10%) casi la massa tumorale appariva esclusivamente solida di cui 3 cerebellari, 1 sovratentoriale, 2 del nervo ottico (Figura 5B).

In 3 casi (5%) la morfologia era invece esclusivamente cistica, di cui 2 cerebellari e 1 sovratentoriale (Figura 4C).

Disomogeneità nel campo magnetico nelle sequenze pesate in T1 e T2 è stata riscontrata in 7 casi (11%).

Il pattern di crescita è stato descritto come espansivo in 59 casi (94%), mentre in 4 neoplasie era di tipo diffuso (6%): in particolare la crescita infiltrativa è stata riscontrata nei rari casi di AP del nervo ottico.

In 60 casi è stato possibile risalire anche alle dimensioni delle lesioni, con un asse maggiore di cm 4 (range: 1,2 – 7 cm).

In 57 tumori si è osservata impregnazione contrastografica dopo iniezione endovenosa di mezzo di contrasto (90%), a testimonianza della ricca vascolarizzazione di questa neoplasia.

4.5 REVISIONE ISTOLOGICA ED IMMUNOISTOCHEMICA

In 50 casi su 100 (50%) si è potuto evidenziare il pattern bifasico tipico dell'AP, caratterizzato da aree densamente fibrillari ed aree di aspetto lasso, microcistico.

Le aree fibrillari sono caratterizzate tutte da elementi fusati, ovalari e di aspetto pilode; le aree microcistiche e lasse presentano cellule rotondeggianti con citoplasma chiaro, simil-oligodendrogliali (Figura 6A).

Le fibre di Rosenthal ed i corpi granulari eosinofili sono stati ritrovati rispettivamente in 75 (75%) e 60 casi (60%) e sono maggiormente presenti nelle aree più fibrillari della neoplasia (Figura 6B).

In 53 AP si è evidenziato un lieve pleomorfismo cellulare, mentre solo in un caso (a livello dell'ipotalamo) si sono osservate atipie severe con nucleoli prominenti.

Nel 97% dei casi (97 casi su 100) il numero di mitosi è $< 2/10$ HPF; i 3 casi in cui il numero di mitosi era $> 5/10$ HPF hanno mostrato una successiva ripresa di malattia (2 casi sovratentoriali ed 1 caso cerebellare).

La trama vascolare è ben evidente nelle aree più periferiche del tumore in 84 casi su 100 (84%): strutture vascolari ialine con pareti ispessite ed endoteli iperplastici sono apprezzabili nel 91% dei casi (77 su 84), mentre nel restante 9% (7 casi su 84) assumono aspetto simil-glomeruloide.

In 7 casi (7%) sono state identificate aree di necrosi con aspetto coagulativo ma solo in un caso il tumore (sede parietale) ha avuto nel tempo una progressione.

Ulteriori reperti osservati sono stati depositi di microcalcificazioni (16%) presenti prevalentemente nei tumori cerebellari (n= 11) rispetto ai tumori in altre sedi (n=4 emisferici, n=1 chiasmatico) ed 1 caso con estesa infiltrazione leptomeningea cerebellare.

Tutte le neoplasie testate per immunohistochemica (81 su 100) sono risultate estesamente e diffusamente positive a livello citoplasmatico con anticorpo anti-GFAP (Figura 6C) e a livello nucleare con anti-Olig2 (Figura 6D).

La positività per Sinaptofisina, sebbene presente nel back-ground fibrillare della neoplasia in maniera aspecifica, non ha mai colorato in maniera intensa e nitida le cellule neoplastiche (presente al contrario nei neuroni corticali intrappolati o limitrofi).

L'indice proliferativo Ki67n (valutato su 400 cellule) presenta un valore medio del 4% (range 0-10%). In 33 casi su 100 (33%) il Ki67 è stato valutato tra il 5-10% ma solo in 4

casi si è associata una progressione di malattia (1 a livello ipotalamico, 1 a livello emisferico, 1 a livello del tronco in circa 12 mesi ed 1 a livello del midollo spinale dopo resezioni subtotali).

4.6 TRATTAMENTO

Di 92 pazienti su 100 (92%) è stato possibile ottenere informazioni sulla strategia terapeutica adottata.

In tutti i casi è stato eseguito un approccio chirurgico: radicale in 36 pazienti (40%), subtotale in 40 (43%) e parziale in 16 (17%).

Negli AP cerebellari la rimozione totale è stata raggiunta in 30 casi, subtotale in 10, parziale in 6.

In sede sovratentoriale 1 solo caso ha avuto una *gross total resection* (GTR), 9 sub-totale e di 7 parziale.

Di 13 AP in sede ipotalamo/chiasmatica, dei 6 del tronco encefalico e di 5 del midollo spinale, tutti hanno ricevuto un'asportazione parziale.

I 5 tumori dei nervi ottici sono invece stati asportati tutti completamente.

In 6 pazienti su 92 (7%) è stata eseguita chemioterapia adiuvante.

Tutti e 6 questi casi avevano ricevuto un'asportazione parziale del tumore: 2 in sede emisferica con estensione al chiasma, 4 in regione ipotalamo-chiasmatica.

In 4 pazienti è stata eseguita la sola radioterapia adiuvante (5%): 2 del tronco-encefalico, 1 emisferico e 1 del chiasma ottico.

In 5 pazienti (7%) è stata eseguita una successiva terapia combinata chemio e radio: 4 tumori in regione ipotalamica, 1 del tronco.

4.7 FOLLOW-UP

Dei 92 pazienti di cui era noto l'approccio terapeutico, è stato possibile valutare i follow-up di 80 casi.

La durata media del follow-up è di 116 mesi (range: 7-324 mesi).

In 28 pazienti il follow-up è stato superiore ai 10 anni (range: 120 mesi-324 mesi).

Per quanto riguarda l'*overall survival* (OS), nessuno dei pazienti risulta deceduto.

Riprese o recidive di patologia si sono evidenziate in 25 pazienti su 80 (31%).

In 24 casi su 25 la progressione è avvenuta in seguito ad intervento sub-totale o parziale (96%).

24 progressioni di malattia sono avvenute entro i primi 10 anni di follow-up (media: 45 mesi, range 3-108 mesi) mentre 1 solo caso è avvenuto oltre i 10 anni (132 mesi).

In dettaglio (Grafico 2):

- di 36 AP cerebellari, 6 hanno mostrato ripresa di malattia dopo chirurgia subtotale o parziale ed 1 dopo chirurgia totale, con una *progression free survival* (PFS) di 63 mesi (range: 8-132 mesi);
- di 15 tumori emisferici, 7 hanno avuto progressione della malattia dopo asportazione sub-totale o parziale, con una PFS di 35 mesi (range: 3-108 mesi);
- Non è stata evidenziata progressione di 4 casi di AP del nervo ottico trattati con chirurgia radicale. In 1 solo caso, una paziente affetta da NF1 ha mostrato un secondo AP circa 156 mesi in sede talamica;
- 7 tumori su 13 a livello ipotalamico e del chiasma ottico hanno evidenziato una progressione di malattia dopo intervento parziale, con PFS di 19 mesi (range: 9-72 mesi).
- 2 tumori su 6 del tronco-encefalico operati in maniera sub-totale o parziale, hanno mostrato progressione con PFS di 71 mesi (range: 70-72 mesi).
- dei 5 tumori del midollo spinale, 1 solo ha evidenziato una recidiva a 43 mesi.

Le curve di Kaplan-Meier a 10 anni evidenzino come sebbene la PFS sia del 77,5% a 5 anni e del 61,1% a 10 anni, vi sia una netta differenza nell'andamento della patologia tra le resezioni totali e quelle sub-totali o parziali (media 116,7 mesi vs 72.2 mesi) (Grafico 3).

Utilizzando un modello di regressione multipla di Cox emerge che il rischio di progressione di recidiva è 18 volte più elevato nei pazienti in cui non viene raggiunta una GTR al primo intervento.

I tumori sovratentoriali e della regione ipotalamo-chiasmatica sottoposti ad interventi incompleti risultano essere quelli con più elevato rischio di ripresa di malattia (50%).

Le recidive non hanno mostrato alla revisione istologica un incremento del grado di anaplasia né una trasformazione in neoplasia francamente maligna (glioblastoma), rimanendo ancora inquadrabili nella categoria degli astrocitomi pilocitici, grado 1.

4.8 RISULTATI FISH DELLA DUPLICAZIONE IN TANDEM E FUSIONE DI BRAF-KIAA 1549

La duplicazione in tandem e fusione di BRAF-KIAA1549 è stata identificata in 13 casi su 33 esaminati (39%) (Figura 7).

9/13 casi hanno localizzazione cerebellare: di questi nessuno ha mostrato nel corso del follow-up ripresa di malattia.

4 casi presentano invece una localizzazione sovratentoriale; tra questi casi in 3 (lobo temporale, III ventricolo, ipotalamo) si è assistito ad una ripresa di malattia.

4.9 RISULTATI DELL' INDAGINE IMMUNOISTOCHEMICA PER LA MUTAZIONE BRAF V600E

L'immunoistochimica con anticorpo anti-BRAF V600E è stata eseguita in 42 casi su 100 (42%), esclusivamente sui campioni di neoplasie che non presentavano la duplicazione in tandem e fusione di BRAF-KIAA1549.

Sono stati identificati 4 casi positivi (9%), 1 in sede cerebellare, 1 ipotalamica, 1 nel chiasma ottico e 1 in sede pineale-mesencefalica (Figura 8).

Di questi nessuno ha mostrato nel corso del follow-up ripresa di malattia.

4.10 RISULTATI SEQUENZIAMENTO NGS DEL GENE BRAF

Il sequenziamento del gene BRAF è stata eseguito in 42 casi su 100 (42%), esclusivamente sui campioni di neoplasie che non presentavano la duplicazione in tandem e fusione di BRAF-KIAA1549.

Mutazioni del gene si sono identificate in 6 casi su 42 (14%).

Oltre alla conferma molecolare dei 4 casi già identificati mediante immunoistochimica (vedi paragrafo precedente), sono state identificate le seguenti mutazioni: un caso BRAF V590I (sostituzione della valina con Isoleucina nel codone 590) a sede cerebellare; un caso BRAF S607F (Serina con Fenilalanina al codone 607) sempre a sede cerebellare.

Anche in questi due casi non si sono verificate progressioni di malattia.

5. DISCUSSIONE

La presente casistica raccoglie 100 astrocitomi pilocitici di età pediatrica, diagnosticati e seguiti dal 1992 al 2021.

Sono state raccolte informazioni sulla sintomatologia all'esordio in 53 casi su 100 e rivalutato l'aspetto neuroradiologico di 63 casi su 100.

Tutti i preparati istologici (tumore iniziale ed eventuale recidiva, quando disponibile) sono stati riesaminati, completandone, quando possibile, la caratterizzazione diagnostica mediante indagini immunoistochimiche e molecolari (ricerca della fusione BRAF-KIAA 1549 in 33 casi su 100; sequenziamento del gene BRAF in 42 casi su 100) richieste dalla più recente classificazione dell'OMS [1].

Di 92 pazienti su 100 è stato quindi descritto l'approccio terapeutico adottato e il relativo follow-up.

Lo studio conferma le caratteristiche cliniche, radiologiche, isto-patologiche e molecolari dell'AP note in letteratura [1, 4].

Anche nella presente serie, la localizzazione più frequente è il distretto cerebellare (58%), pur non mancando casi di tutte le altre sedi SNC, compreso il midollo spinale.

I casi localizzati al midollo spinale costituiscono una percentuale limitata (5%) ma con grande impatto clinico, per la sintomatologia e la limitata possibilità di asportazione chirurgica.

Analoghe riflessioni possono essere condotte per la maggior parte delle localizzazioni sovratentoriali, soprattutto per i casi localizzati alla regione ipotalamo/ipofisaria.

I casi di AP del tratto ottico, hanno avuto una buona prognosi in seguito a trattamento chirurgico radicale. Va tuttavia sottolineato che il trattamento chirurgico radicale ha richiesto il sacrificio del nervo ottico interessato, con conseguente perdita della vista.

Un solo caso ha sviluppato un secondo AP in regione talamica in paziente affetto da NF1: non sono state eseguite analisi di clonalità per valutare se esso fosse una localizzazione del primo tumore o un secondo tumore indipendente.

Nella presente casistica, l'aspetto classico alla RM è quello di una lesione espansiva, solida e cistica (85%). Tuttavia va tenuto presente che l'aspetto alla RM può essere estremamente variabile, comprendendo anche forme solo solide o solo cistiche.

Il dato più costante è, all'istologia, la morfologia bifasica è identificabile nel 50% dei preparati istologici, associata alla presenza di fibre di Rosenthal (75%) e corpi granulari eosinofili (60%).

Si sono riscontrati casi con focali atipie citologiche, focali aree di necrosi ed incremento della vascolarizzazione [15]: tali aspetti non hanno mostrato impatto prognostico.

Va sottolineato inoltre che, nella presente casistica, non si sono riscontrate le atipie descritte da Tanaka et al. [16] e Gareton et al [17], come importanti per predire il rischio di recidive.

E' noto che i parametri morfologici prognostici classici delle altre forme di neoplasie astrocitarie, non possono essere applicati all'AP.

In particolare, il valore della conta mitotica è ancora controverso: nell'ultima edizione della WHO dei tumori del SNC, è segnalato che non sembrerebbe avere impatto significativo sulla prognosi.

Nella presente casistica, si vede tuttavia come il numero di mitosi sia associato ad un aumentato rischio di progressione di malattia. Infatti tutti i 3 (100%) casi che presentavano un numero di mitosi $> 5/10$ HPF hanno mostrato una successiva ripresa di malattia (2 casi sovratentoriali ed 1 caso cerebellare). [10].

Al contrario, l'incremento dell'indice proliferativo $>5\%$, valutato con Ki67, non è stato correlabile ad un aumentato rischio di progressione. Infatti, su 33 casi con indice proliferativo >5 valutato con Ki67, solo 4 hanno avuto ricadute ma tutti a seguito di chirurgia subtotale o parziale) [18].

Anche nella presente casistica, l'alterazione molecolare più frequente è la duplicazione con fusione del gene BRAF-KIAA 1549 (39%) seguita da mutazione del gene BRAF (12%). Le alterazioni molecolari a carico del gene BRAF sono diventate parte integrante della diagnosi di PA, secondo l'ultima edizione della classificazione WHO dei tumori cerebrali.

Il dato originale della presente casistica, è la lunghezza del follow-up, che si estende sino a 324 mesi.

Sebbene nessuno dei 92 pazienti sia deceduto a causa della neoplasia (OS 100%), l'outcome del paziente non è scevro da riprese di malattia, con PFS a 5 anni dell'80% e a 10 anni del 60%.

Come già indicato in letteratura [19], le analisi statistiche hanno evidenziato che l'andamento della patologia risulta significativamente influenzato dal tipo di resezione: STR o resezione parziale con un rischio di progressione 18 volte più elevato rispetto a GTR.

Tale dato è strettamente correlato alla localizzazione del tumore che influenza il grado di radicalità chirurgica: il 50% delle recidive negli AP avviene nella regione sovratentoriale e nella regione ipotalamo-chiasmatica (contro il 16% delle forme cerebellari).

Interessante notare che le progressioni (riprese e recidive) sono avvenute per lo più entro i primi 10 anni di follow-up (23 su 24) mentre 1 solo caso è avvenuto oltre i 10 anni.

Sembrano quindi stratificarsi due grandi gruppi di pazienti:

- il primo è quello dei pazienti affetti da AP cerebellari nei quali, grazie ad una chirurgia radicale, le probabilità di recidiva sono estremamente basse e il percorso assistenziale può limitarsi a controlli neuroradiologici nel tempo, soprattutto nei primi 10 anni di follow-up;

- il secondo è quello dei pazienti affetti da AP a livello sovratentoriale, ipotalamico e del chiasma ottico, in cui il rischio di una progressione precoce (entro i 10 anni) di malattia aumenta significativamente.

Più sfumati sono i dati relativi ai tumori del tronco encefalico (2 recidive su 6 con STR o parziali), del nervo ottico (nessuna recidiva su 4 con GTR ma comparsa di un secondo tumore in sede talamica a distanza di 156 mesi in paziente con NF1) e del midollo spinale (1 recidiva su 5) per la rarità di questi casi.

Proprio a riguardo degli AP del midollo spinale, si segnala un recente studio di *Metias et al.* che dimostra come essi possano costituire una famiglia geneticamente differente degli AP in altre sedi, caratterizzati da alterazioni di FGFR1 piuttosto che di BRAF e con profili epigenetici differenti [20]. Nei casi presenti l'alterazione di FGFR1 non è stata

ricercata; tale dato sarà oggetto di ulteriore approfondimento.

Lo studio sottolinea inoltre l'importanza della caratterizzazione molecolare dei gliomi di basso grado dell'età pediatrica, sebbene si possano riconoscere finalità differenti a seconda delle varie entità.

Se da un lato per alcune neoplasie il dato molecolare è patognomonico (es. *glioma di basso grado con alterazione di MYB-MYBL1*), dall'altro viene indicato come *desiderable* ma non *essential* per la diagnosi di AP [1], ponendo piuttosto l'attenzione sull'aspetto neuroradiologico e istologico.

Infatti non bisogna dimenticare che anomalie di BRAF quanto ulteriori mutazioni sulle vie delle MAP-Kinasi sono ampiamente descritte in numerose altre entità sia a crescita infiltrativa (gliomi diffusi di basso grado BRAF-mutati, PLNTY) sia espansiva (gangliogliomi, gangliocitomi, Xantoastrocitomi Pleomorfi).

In questa casistica si conferma come l'integrazione dell'imaging (lesione espansiva, solido-cistica) con il quadro morfologico (bifasicità, elementi piloidi, fibre di Rosenthal, corpi granulari eosinofili) sia sufficiente a porre la diagnosi di AP, anche in assenza di uno specifico profilo molecolare.

Più interessante è invece l'aspetto prognostico e predittivo.

Di 19 tumori con una precisa anomalia genetica, di cui 13 fusioni BRAF-KIAA e 6 mutazioni puntiformi di BRAF, solo in 3 casi a sede sovra-tentoriale BRAF-KIAA positivi si è assistiti a progressioni di malattia (23%); di conseguenza i restanti 22 casi recidivati presentavano un genotipo BRAF-KIAA e BRAF wild-type (77%).

L'identificazione di tali alterazioni potrebbe avere pertanto un valore prognostico positivo, come suggerito in letteratura [21].

Inoltre l'identificazione di alterazioni sulla via delle MAP-Kinasi nell'AP potrebbe aprire la strada a terapie "a bersaglio molecolare" sia neo-adiuvanti sia adjuvanti, soprattutto per quei pazienti con lesioni extra-cerebellari più soggette a riprese di malattia: in 3 casi di AP recidivanti sovra-tentoriali su 17 (lobo temporale, III ventricolo e ipotalamo) è stata evidenziata la fusione BRAF-KIAA 1549 come possibile target terapeutico.

Infine, sebbene nessuno dei tumori abbia avuto al momento una trasformazione

anaplastica, durante la ricerca dei campioni idonei per la definizione della casistica oggetto di studio, vanno segnalati due pazienti affetti da glioblastoma (grado 4) in sede cerebellare, operati nel 2018 e nel 2020, che in anamnesi presentavano precedenti AP nella stessa sede, rispettivamente 54 e 30 anni prima.

Dalle informazioni disponibili, entrambi i pazienti avevano effettuato trattamenti radianti su residui tumorali, mantenendo comunque la PFS sino alla trasformazione maligna del tumore d'origine.

I casi non erano stati inclusi nel presente studio in quanto non è stato tuttavia possibile riesaminare i preparati dei tumori originari.

Si conferma pertanto l'estrema rarità di tale evenienza in cui il fattore iatrogeno (radioterapia) ed il trascorrere del tempo (>20 anni) giocano un ruolo fondamentale [10].

6. CONCLUSIONI

Il presente studio ha evidenziato come l' AP sia una neoplasia di basso grado con aspettative di vita elevate (OS 100%), ma non del tutto scevra da progressioni di malattia. La progressione si verifica in tempi relativamente brevi (entro 10 anni, media 45 mesi) soprattutto in quelle sedi in cui le neoplasie non possono essere operate in modo radicale.

Il dato molecolare delle alterazioni di BRAF sembra avere un ruolo prognostico positivo oltre che ad essere un parametro predittivo per una possibile *target therapy*.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1) WHO Classification of Tumours Editorial Board. World Health Organization Classification of Tumours of the Central Nervous System. 5th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2021
- 2) Ostrom QT, Patil N, Cioffi G et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013–2017. *Neuro Oncol.* 2020;22(12 Suppl 2):iv1–iv96
- 3) Burkhard C, Di Patre PL, Schüler D, Schüler G, Yaşargil MG, Yonekawa Y, Lütolf UM, Kleihues P, Ohgaki H. A population-based study of the incidence and survival rates in patients with pilocytic astrocytoma. *J Neurosurg.* 2003 Jun;98(6):1170-4. doi: 10.3171/jns.2003.98.6.1170. PMID: 12816259.
- 4) Collins VP, Jones DT, Giannini C. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015 Jun;129(6):775-88. doi: 10.1007/s00401-015-1410-7. Epub 2015 Mar 20. PMID: 25792358; PMCID: PMC4436848.
- 5) Gaudino S, Martucci M, Russo R, Visconti E, Gangemi E, D'Argento F, Verdolotti T, Lauriola L, Colosimo C. MR imaging of brain pilocytic astrocytoma: beyond the stereotype of benign astrocytoma. *Childs Nerv Syst.* 2017 Jan;33(1):35-54. doi: 10.1007/s00381-016-3262-4. Epub 2016 Oct 18. PMID: 27757570.
- 6) Northcott PA, Pfister SM, Jones DT. Next-generation (epi)genetic drivers of childhood brain tumours and the outlook for targeted therapies. *Lancet Oncol.* 2015 Jun;16(6):e293-302. doi: 10.1016/S1470-2045(14)71206-9. Epub 2015 May 27. PMID: 26065614.
- 7) Avruch J. MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Aug;1773(8):1150-60. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.11.006. Epub 2006 Nov 15. PMID: 17229475; PMCID: PMC2043147.
- 8) Kieran MW. Targeting BRAF in pediatric brain tumors. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2014;e436-e440. doi:10.14694/EdBook_AM.2014.34.e436
- 9) Krishnatry R, Zhukova N, Guerreiro Stucklin AS, Pole JD, Mistry M, Fried I, Ramaswamy V, Bartels U, Huang A, Laperriere N, Dirks P, Nathan PC, Greenberg M, Malkin D, Hawkins C, Bandopadhyay P, Kieran MW, Manley PE, Bouffet E, Tabori U. Clinical and treatment factors determining long-term outcomes for adult survivors of childhood low-grade glioma: A population-based study. *Cancer.* 2016 Apr

15;122(8):1261-9. doi: 10.1002/cncr.29907. Epub 2016 Mar 10. PMID: 26970559.

10) Rodriguez FJ, Scheithauer BW, Burger PC, Jenkins S, Giannini C. Anaplasia in pilocytic astrocytoma predicts aggressive behavior. *Am J Surg Pathol.* 2010 Feb;34(2):147-60. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181c75238. PMID: 20061938.

11) Bucci MK, Maity A, Janss AJ, et al. Near complete surgical resection predicts a favorable outcome in pediatric patients with nonbrainstem, malignant gliomas: results from a single center in the magnetic resonance imaging era. *Cancer.* 2004; 101(4): 817-824. doi:10.1002/cncr20422.

12) Wang L, Basturk O, Wang J, et al. A FISH assay efficiently screens for BRAF gene rearrangements in pancreatic acinar-type neoplasms. *Mod Pathol.* 2018;31(1):132-140. doi:10.1038/modpathol.2017.106

13) Morandi L, Righi A, Maletta F, et al. Somatic mutation profiling of hobnail variant of papillary thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer.* 2017;24(2):107-117. doi:10.1530/ERC-16-0546

14) Afgan E, Baker D, Batut B, et al. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W537-W544. doi:10.1093/nar/gky379

15) Matyja E, Grajkowska W, Stępień K, Naganska E. Heterogeneity of histopathological presentation of pilocytic astrocytoma - diagnostic pitfalls. A review. *Folia Neuropathol.* 2016;54(3):197-211. doi: 10.5114/fn.2016.62530. PMID: 27764513.

16) Gareton A, Tauziède-Espariat A, Dangouloff-Ros V, Roux A, Saffroy R, Castel D, Kergrohen T, Fina F, Figarella-Branger D, Pagès M, Bourdeaut F, Doz F, Puget S, Dufour C, Lechapt E, Chrétien F, Grill J, Varlet P. The histomolecular criteria established for adult anaplastic pilocytic astrocytoma are not applicable to the pediatric population. *Acta Neuropathol.* 2020 Feb;139(2):287-303. doi: 10.1007/s00401-019-02088-8. Epub 2019 Nov 1. PMID: 31677015; PMCID: PMC6989446.

17) Tanaka T, Teshigawara A, Takei J, Tochigi S, Hasegawa Y, Murayama Y, Yokoo H. Rapid Recurrence and Anaplastic Transformation of a Pilocytic Astrocytoma in an Elderly Patient: Case Report and Review of the Literature. *World Neurosurg.* 2020 Oct;142:441-449. doi: 10.1016/j.wneu.2020.06.173. Epub 2020 Jul 4. PMID: 32634636.

18) Tibbetts KM, Emmett RJ, Gao F, Perry A, Gutmann DH, Leonard JR. Histopathologic predictors of pilocytic astrocytoma event-free survival. *Acta Neuropathol.* 2009;117(6):657-665. doi:10.1007/s00401-009-0506-3

19) Rodriguez LA, Edwards MS, Levin VA. Management of hypothalamic gliomas in children: an analysis of 33 cases. *Neurosurgery*. 1990;26(2):242-247. doi:10.1097/00006123-199002000-00010

20) Métais A, Bouchouca Y, Kergrohen T, et al. Pediatric spinal pilocytic astrocytomas form a distinct epigenetic subclass from pilocytic astrocytomas of other locations and diffuse leptomeningeal glioneuronal tumours [published online ahead of print, 2022 Oct 20]. *Acta Neuropathol*. 2022;1-13. doi:10.1007/s00401-022-02512-6

21) Ryall S, Tabori U, Hawkins C. Pediatric low-grade glioma in the era of molecular diagnostics. *Acta Neuropathol Commun*. 2020;8(1):30. Published 2020 Mar 12. doi:10.1186/s40478-020-00902-z

8. FIGURE

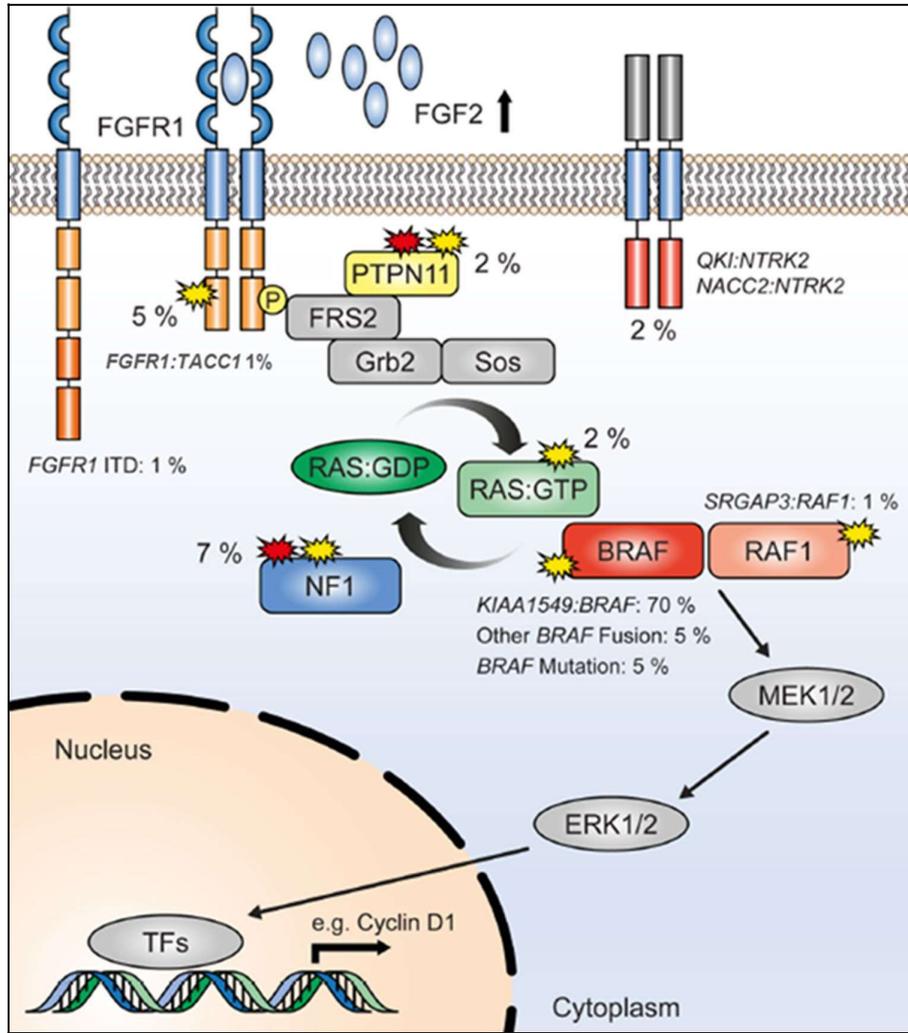


Figura 1: pathway semplificato delle MAP-Kinasi .

Jones DT, Hutter B, Jäger N, et al. Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nat Genet.* 2013;45(8):927-932. doi:10.1038/ng.2682

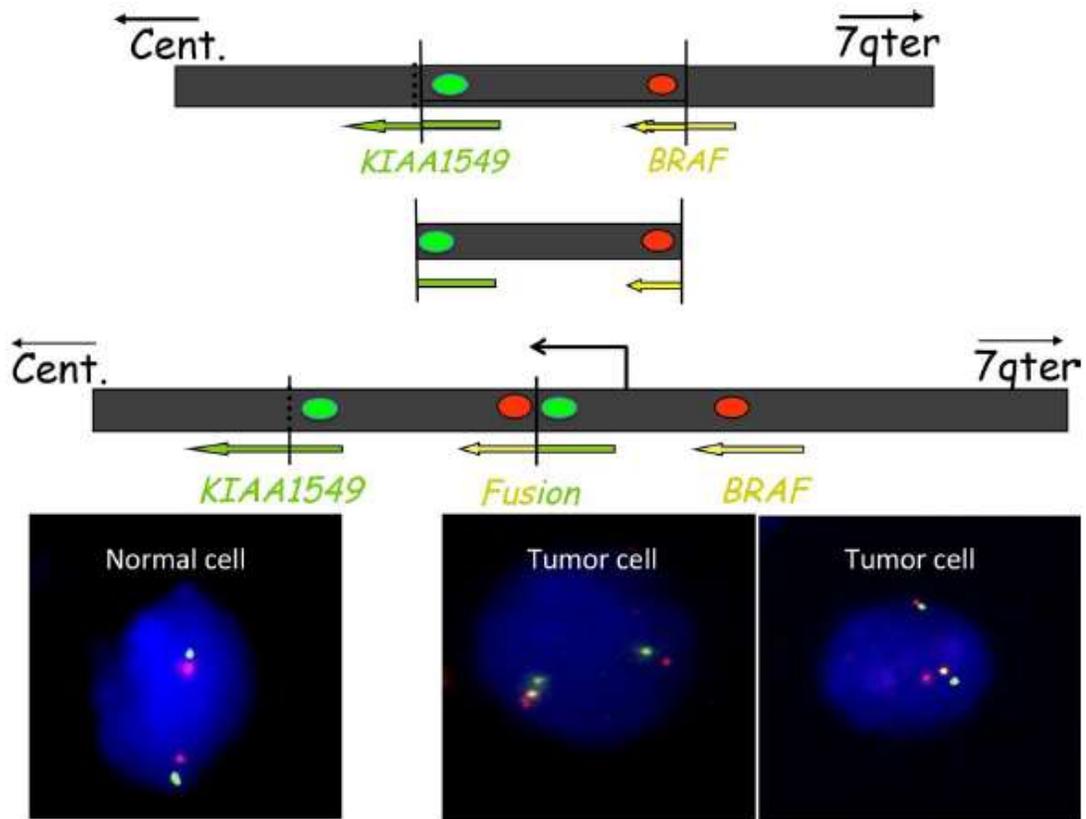


Figura 2: schema della fusione BRAF-KIAA 1549 e sua identificazione mediante FISH con una sonda dual color per BRAF (rossa) e KIAA 1549 (verde).

Collins VP, Jones DT, Giannini C. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015;129(6):775-788. doi:10.1007/s00401-015-1410-7

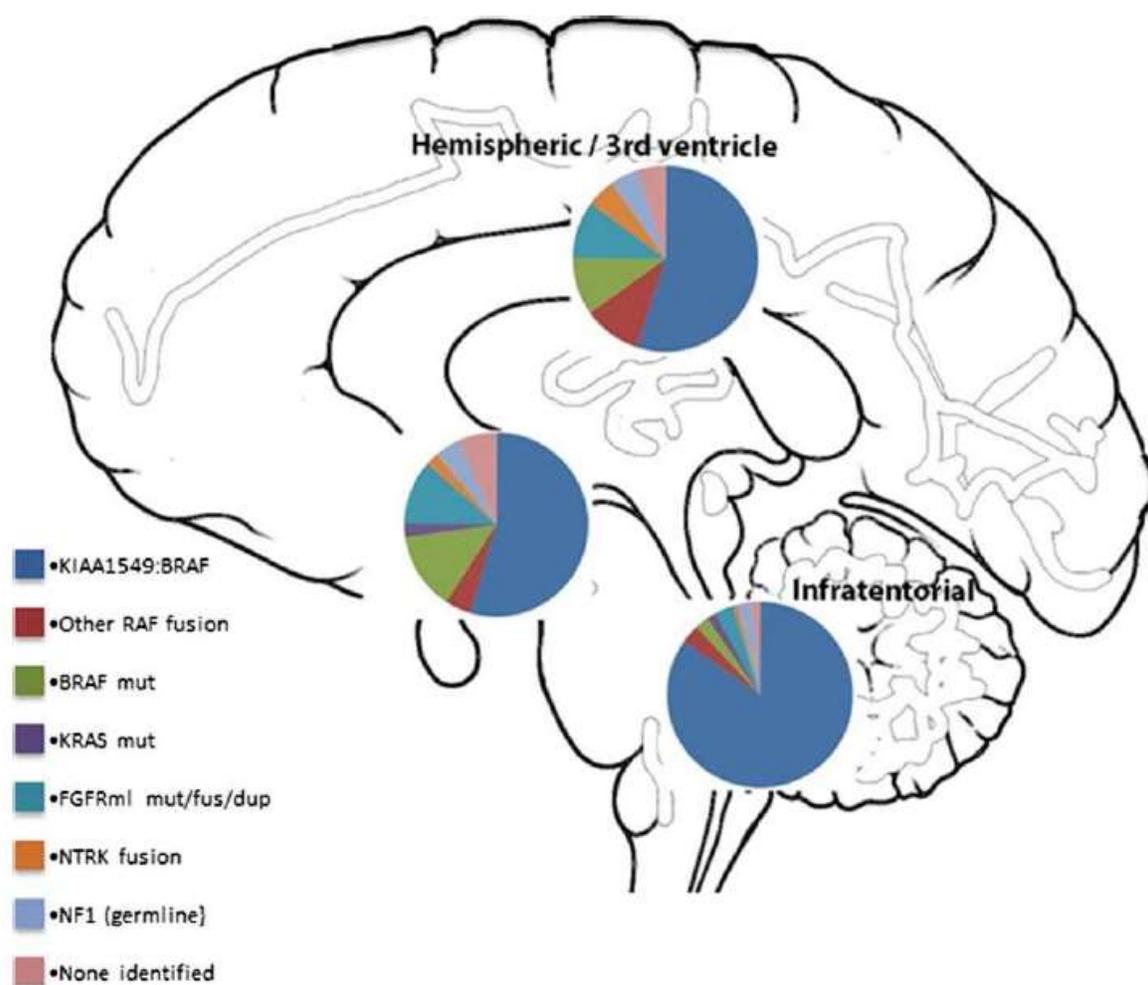


Figura 3: frequenza delle principali alterazioni nella via delle MAP-Kinasi negli AP.
 Collins VP, Jones DT, Giannini C. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol.* 2015;129(6):775-788. doi:10.1007/s00401-015-1410-7

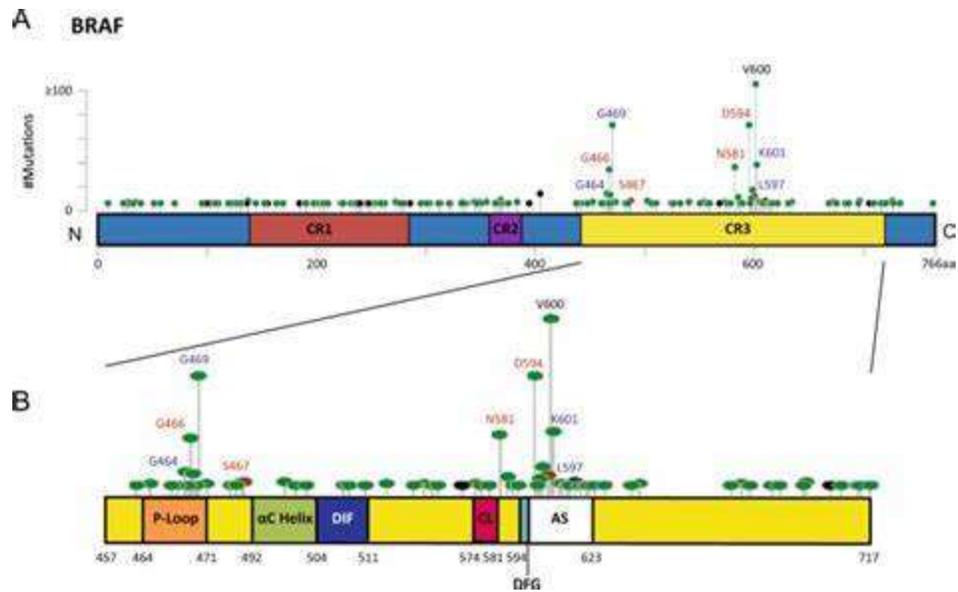


Figura 4: schema semplificato della struttura di BRAF e delle principali mutazioni patogenetiche in ambito oncologico.

Dankner, M., Rose, A.A.N., Rajkumar, S. *et al.* Classifying BRAF alterations in cancer: new rational therapeutic strategies for actionable mutations. *Oncogene* 37, 3183–3199 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0171-x>

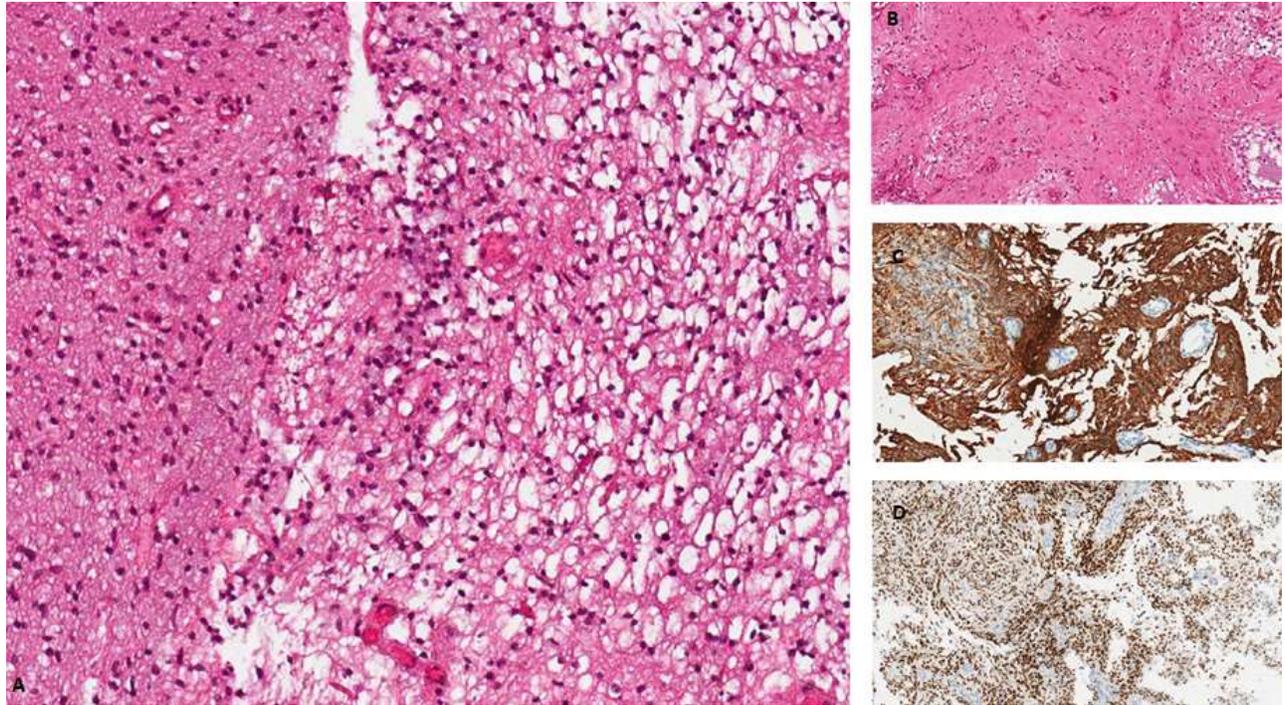


Figura 6: aspetto istologico e immunoistochimico dell'AP. Tipico pattern bifasico con alternanza di aree dense, fibrillari [a sinistra] ed aree lasse, microcistiche [a destra] (A, Ematossilina Eosina 4X); nelle aree fibrillari sono riconoscibili fibre di Rosenthal e corpi granulari eosinofili (B, Ematossilina Eosina 10X). Le cellule tumorali sono diffusamente positive per GFAP (C) e Olig2 (D).

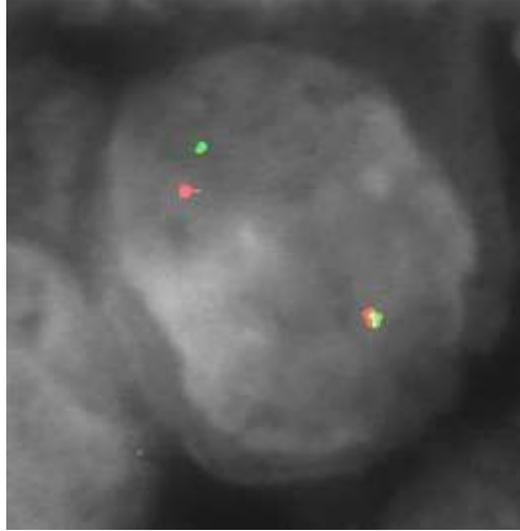


Figura 7: nucleo positivo per duplicazione in tandem di BRAF alla FISH. Split dei segnali verde e rosso visibili al microscopio a fluorescenza.

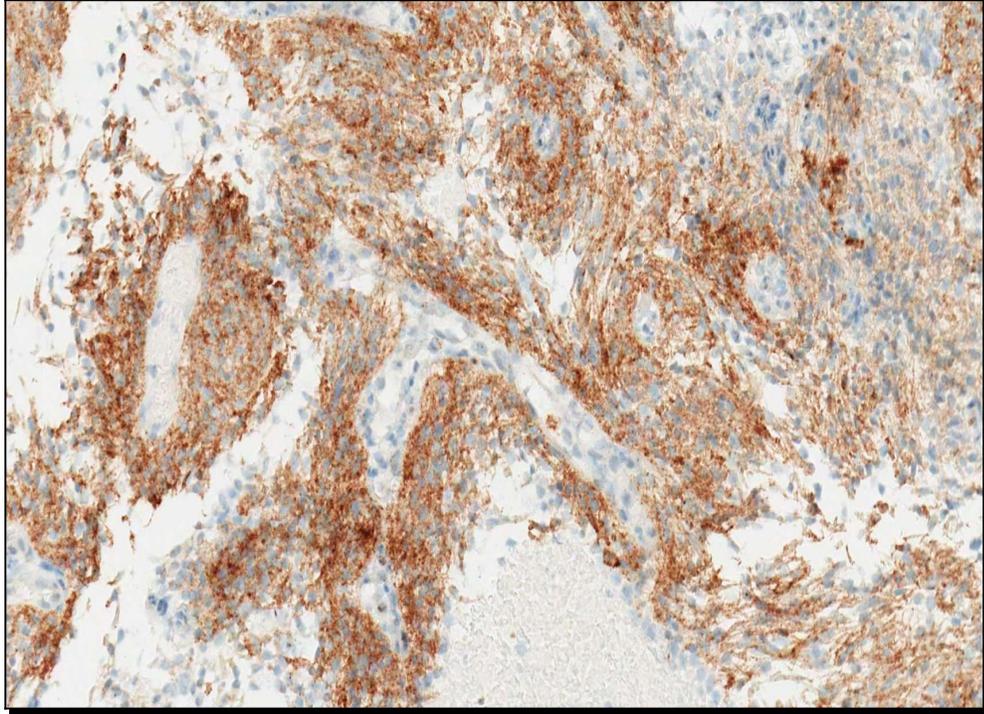


Figura 8: positività immunoistochimica con anticorpo anti BRAF V600E.

9. GRAFICI

- cerebellari
- emisferici
- ipotalamo, chiasma e nervo ottico
- tronco encefalico
- midollo spinale

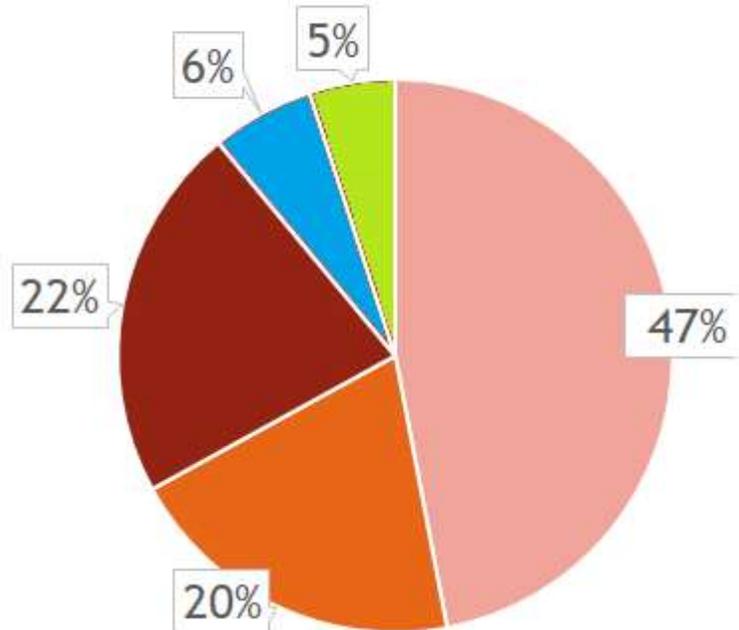


Grafico 1: distribuzione per sede degli AP.

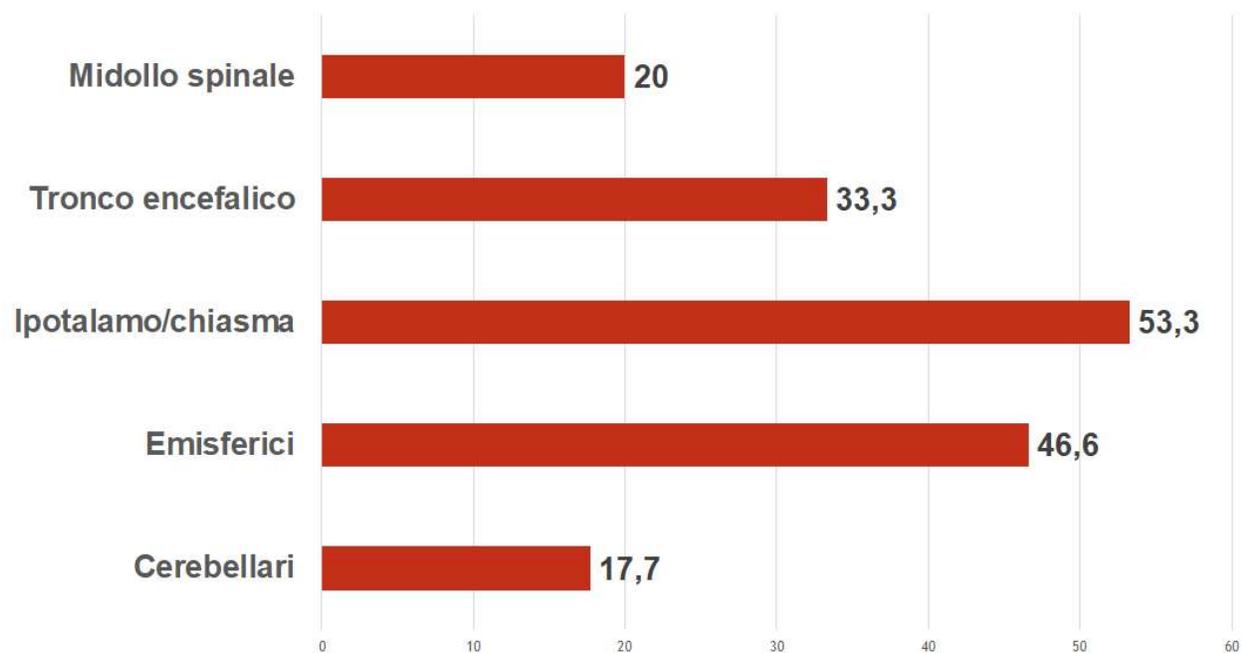


Grafico 2: percentuale di progressione di malattia in rapporto alla sede del tumore primitivo.

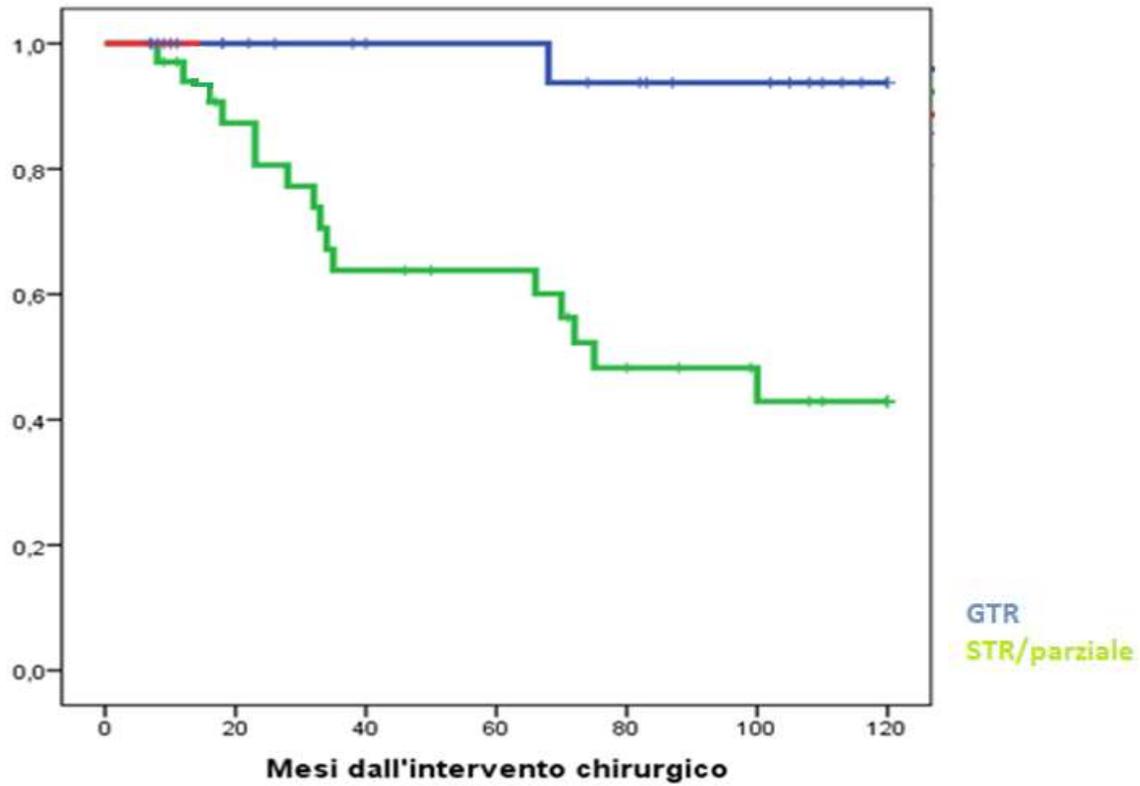


Grafico 3: curve di Kaplan-Meier a 10 anni per valutazione della *Progression Free Survival* (PFS) in relazione alla terapia chirurgica eseguita. GTR (Gross total Resection), STR (Sub-Total Resection).