

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

Scuola di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Sanità Pubblica



Dottorato di Ricerca in Morfologia Clinica e Patologica

XXVIII Ciclo

Coordinatore: Prof.ssa Stefania Montagnani

*“Craniofaringioma: marcatori prognostico-predittivi
di comportamento biologico aggressivo.”*

Relatore

Candidato

Prof. Guido Pettinato

Dott.ssa Valeria Varone

Anno Accademico 2015-2016

Indice

I. Introduzione	pag. 1
II. Scopo	pag. 20
III. Materiali e Metodi	pag. 21
IV. Risultati	pag. 25
V. Discussione	pag. 29
VI. Conclusioni	pag. 39
VII. Bibliografia	pag. 41
VIII. Iconografia	pag. 46

1. Introduzione: aspetti clinico-patologici del craniofaringioma

1.1 Definizione di craniofaringioma e brevi cenni storici

I craniofaringiomi (CP) costituiscono un gruppo eterogeneo di neoplasie epiteliali della regione sellare che prendono origine da residui della tasca di Rathke.

La prima descrizione di questa neoplasia risale al 1847, per opera del patologo tedesco **Friedrich Zenker** che individuò la presenza di una proliferazione di cellule squamose in corrispondenza della *pars tuberalis* e della *pars distalis* dell'ipofisi. Negli anni a venire furono eseguiti numerosi studi sulle cellule epiteliali squamose adenoipofisarie, tra cui ricordiamo quelli dell'anatomista tedesco **Hubert von Luschka** (1860); nel 1899, i patologi inglesi Frederick Mott e Max Barrett, studiando diversi tumori epiteliali della regione sellare, furono i primi ad ipotizzare che tali tumori originassero da residui della tasca di Rathke. Tale ipotesi fu sostenuta da **Jakob Erdheim** nel 1904, a seguito di uno studio sistematico delle cellule epiteliali squamose adenoipofisarie. Negli anni successivi furono utilizzate molteplici terminologie finché, nel 1932, **Harvey Cushing** introdusse il termine di CP unificando in tal modo, sotto una denominazione comune, i tumori cistici e solidi che originavano da residui epiteliali ascrivibili alla chiusura imperfetta del dotto craniofaringeo (1, 2).

I CP sono neoplasie benigne, istologicamente di grado I sec WHO (2007), di cui si distinguono due sottotipi: l'**adamantinomatoso** (adaCP), che è il più frequente e il **papillare** (papCP), più raro. I due sottotipi differiscono tra loro in termini di frequenza, distribuzione per età, aspetti istomorfologici, biologici e mostrano, inoltre, differente prognosi e outcome clinico. L'adaCP, in particolare, è una neoplasia spesso clinicamente aggressiva, di difficile management terapeutico ed associata ad una scarsa qualità di vita dei pazienti (3).

1.2 Epidemiologia

I CP rappresentano dall'**1.2 al 4.6%** di tutti i tumori intracranici e sono la più comune neoplasia non neuroepiteliale nell'età pediatrica costituendo, in tale fascia di età, il **5-10%** dei tumori intracranici e la più frequente neoplasia ipofisaria. Tali tumori sono più frequenti nei Nigeriani (18% di tutti i tumori del sistema nervoso centrale) e nei bambini giapponesi (incidenza annuale di 5.25 casi per milione di persone nella popolazione pediatrica). Non si osserva predilezione di genere (3). Per quanto riguarda l'età d'insorgenza, si riconosce una distribuzione bimodale nel sottotipo adamantinoso, con un primo picco nei bambini tra 5 e 15 anni ed un secondo picco negli adulti tra 45 e 60 anni. Sono stati descritti, inoltre, rari casi congeniti e neonatali (3-5). Il sottotipo papillare insorge pressoché esclusivamente nell'adulto, con un'età media di 40-55 anni (3).

1.3 Sedi d'insorgenza

I CP possono originare in qualunque segmento del dotto craniofaringeo, dalla sella turcica all'ipotalamo, tuttavia, la **localizzazione più frequente (95%) è quella soprasellare**, con una minore componente intrasellare (3, 6, 7). Sono state descritte localizzazioni primitive rare, come a livello del seno sfenoideo e del nasofaringe (1, 8, 9), che hanno origine, verosimilmente, da tessuto ipofisario ectopico faringeo e che vanno distinte da un'invasione neoplastica secondaria, caratteristica di questi tumori.

1.4 Aspetti clinici, biochimici e radiologici

1.4.1 Segni e sintomi

La sintomatologia non è specifica ed è correlata all'effetto massa della neoplasia nella regione sellare. La maggior parte dei pazienti presenta cefalea (75%) e disturbi della vista (62-84%), questi ultimi, più frequenti negli adulti, comprendono diplopia, papilledema e vari pattern di

perdita della vista (3). Altri sintomi includono disturbi comportamentali (irritabilità, perdita della memoria, ritardo dell'apprendimento nei bambini), nausea, vomito, obesità, sonnolenza e sintomi da deficit di ormoni ipofisari, questi ultimi osservati nel 52-87% dei pazienti, in particolare nei bambini (3, 10).

I disturbi endocrini possono essere causati o dalla distruzione del tessuto adenoipofisario o dall'interruzione del peduncolo ipofisario con conseguente perdita del feedback ipotalamico. I deficit ormonali includono quelli per il GH (75%), LH/FHS (40%), ACTH (25%) e TSH (25%) (3). Nel bambino il disturbo endocrino più comune è rappresentato dai difetti di crescita (fino al nanismo), meno comune pubertà precoce o ritardata; nell'adulto invece sono frequenti le disfunzioni sessuali: impotenza nell'uomo e amenorrea primaria o secondaria nella donna. Diabete insipido è presente in più del 17% dei pazienti pediatrici e in più del 30% di quelli adulti (1).

E' possibile, infine, il riscontro di segni correlati all'ipertensione endocranica, soprattutto nei casi con compressione o invasione del terzo ventricolo (3, 10).

L'esordio della sintomatologia è variabile, in rapporto alla velocità della crescita tumorale: alcuni pazienti possono presentare un quadro clinico acuto, caratterizzato da sintomi rapidamente progressivi quali cefalea mattutina, vomito e diplopia; altri possono manifestare un esordio subacuto ed decorso clinico più lento.

1.4.2 Laboratorio

Le indagini di laboratorio mostrano un variabile livello di ipopituitarismo, con riduzione dei livelli ormonali basali oppure con normali livelli ormonali ma una ridotta risposta alla stimolazione. I pazienti con ipopituitarismo possono presentare, inoltre, ridotti livelli di ormoni tiroidei e glucocorticoidi. In alcuni pazienti è presente una lieve iperprolattinemia causata

dall'interruzione del peduncolo ipofisario con conseguente perdita del controllo ipotalamico (1). E' possibile l'associazione del CP con un adenoma ipofisario. In caso di prolattinoma sarà presente una più marcata iperprolattinemia (11, 12) mentre in caso di adenoma tireotropo può essere verificarsi tireotossicosi (13). Sono descritti casi di CP associati con ipofisite linfocitaria con conseguente completa insufficienza pituitaria (14).

1.4.3 Neuroimaging

I riscontri neuroradiologici più frequenti nei pazienti con CP (50% dei casi) sono: espansione o erosione della sella turcica e calcificazioni soprasellari. **La tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica nucleare (RMN) rappresentano le metodiche diagnostiche più usate sia in fase preoperatoria che nel follow-up.** La TC, infatti, è in grado di: identificare con maggiore precisione di un RX standard del cranio le calcificazioni; valutare la struttura del tumore, in genere cistica o solido-cistica, più raramente esclusivamente solida; definire la sede del tumore (soprasellare nel 75% dei casi; soprasellare con componente intrasellare nel 21% dei casi; completamente intrasellare nel 4% dei casi) e l'estensione tumorale (frequente estensione in multiple fosse craniche: anteriore nel 30% dei casi; media nel 23% dei casi; posteriore e/o retroclivale nel 20% dei casi). La RMN permette di: definire meglio l'estensione della neoplasia e, soprattutto, i rapporti con le strutture circostanti; differenziare con maggiore accuratezza la componente solida (segnale isointenso ed eterogeneo) da quella cistica (segnale iperintenso in assenza di mezzo di contrasto, in sequenze T1 pesate); valutare il possibile coinvolgimento del 3° ventricolo e del chiasma ottico. Ricordiamo, infine, come entrambe le metodiche consentano di individuare rare localizzazioni ectopiche, quali nasofaringe, seni paranasali, ghiandola pineale, sfenoide (clivus) e angolo cerebello pontino (15-17).

1.4.4 Diagnosi pre-operatoria

La diagnosi pre-operatoria di CP si basa, congiuntamente al dato clinico, sulle metodiche strumentali di neuroimaging (TC, RMN) e sulle indagini di laboratorio. Le indagini laboratoristiche pre-operatorie sono necessarie per lo studio di eventuali deficit endocrini mediante la valutazione dei livelli ormonali circolanti sia basali, sia dopo somministrazione di stimoli specifici: secrezione spontanea notturna di ormone della crescita (GH), Insulin Growth Factor-1 (IGF-1), test di provocazione con arginina, insulina; TSH, FT3, FT4, PRL e TRH test; produzione circadiana di cortisolo e ACTH, steroidi sessuali, ACTH test; gonadotropine ipofisarie e LHRH test, elettroliti.

Altre indagini includono: studio della funzionalità visiva (fundus oculi, campo visivo), valutazione neurologica e tracciato elettroencefalografico, valutazione auxologica e studio della maturità scheletrica tramite RX del carpo (15).

1.5 Anatomia Patologica

1.5.1 Aspetti macroscopici

La maggior parte dei CP appare come una massa a localizzazione soprasellare di dimensioni variabili, solitamente maggiori di 1 cm al momento della diagnosi. Il sottotipo adamantinoso macroscopicamente mostra un aspetto lobulato, talora solido, talora spugnoso per la presenza di una componente cistica variabile per quantità. In sezione, le cisti spesso contengono caratteristicamente un liquido scuro brunastro (a "olio di macchina"). L'aspetto macroscopico riflette, inoltre, la presenza di modificazioni regressive secondarie, quali fibrosi, calcificazioni, ossificazioni e presenza di depositi di colesterolo. La lesione non presenta una capsula all'interfaccia con il parenchima cerebrale estendendosi oltre gli apparenti "confini" macroscopici ed infiltrando spesso il parenchima cerebrale circostante. Il sottotipo papillare mostra invece gli

aspetti di un tumore ben circoscritto, solido o solo raramente cistico; a differenza dell'adaCP, non si osservano né calcificazioni né accumuli di liquido brunastro (1, 3).

1.5.2 Aspetti microscopici

I CP sono neoplasie intracraniche di natura non neuroepiteliale di cui si distinguono istologicamente due sottotipi: l'adamantinomatoso (adaCP) e il papillare (papCP).

L'adaCP costituisce il sottotipo più frequente di CP. Tale neoplasia ricorda l'organo dentale dello smalto e, pertanto, è istologicamente simile all'adamantinoma. Microscopicamente si osserva un tumore costituito da nidi, cordoni e irregolari trabecole di cellule epiteliali squamose raggruppate in lobuli con configurazione multinodulare, talora con un caratteristico aspetto a "quadrifoglio"; si osservano: perifericamente, un **epitelio colonnare** con disposizione "**a palizzata**"; nelle zone centrali, le cellule si dispongono in uno stroma fibroso lasso e appaiono interconnesse da prolungamenti sottili, assumendo un aspetto stellato mixoide ("**reticolo stellato**"); uno strato superficiale di epitelio squamoso cheratinizzante. Sono presenti caratteristicamente spazi cistici bordati da epitelio appiattito, ripieni di materiale amorfo e noduli di "**wet keratin**", cioè ammassi di cellule caratterizzate da residui nucleari pallidi immersi in un abbondante citoplasma "plump" eosinofilo, cheratinizzato e necrobiotico ("cellule ombra" o "ghost cells"). Un altro aspetto morfologico peculiare dell'adaCP è la presenza di **cluster** di cellule neoplastiche con morfologia "**whorl-like**"; tali cluster si osservano in quantità variabile in quasi tutti i tumori e sono spesso localizzati sul fronte d'invasione tumorale.

Possono essere presenti, inoltre, fenomeni regressivi, quali calcificazioni distrofiche, impronte di cristalli di colesterolo, spesso associate a un infiltrato infiammatorio cronico di tipo granulomatoso, con cellule giganti multinucleate da corpo estraneo e con macrofagi infarciti di

pigmento emosiderinico. All'interfaccia con il parenchima cerebrale è frequente il riscontro di **gliosi reattiva perilesionale**, con abbondanti fibre di Rosenthal (1, 3) (**figure 1, 2**).

Il papCP è più raro rispetto all'adaCP. Istologicamente è caratterizzato da una proliferazione monomorfa di cellule epiteliali squamose ben differenziate prive di una maturazione di superficie, spesso arrangiate in **papille o lasse pseudopapille** intorno ad un core fibrovascolare sede, talvolta, di un infiltrato infiammatorio cronico di entità variabile. A differenza dell'adaCP, non si osservano immagini di "wet keratin", impronte di cristalli di colesterolo né calcificazioni (1, 3) (**figure 3, 4**).

1.5.3 Tecniche ancillari

Gli aspetti istologici di queste neoplasie sono abbastanza caratteristici e, pertanto, metodiche ancillari non sono richieste ai fini della diagnosi. Tuttavia, l'immunoistochimica conferma la natura epiteliale dei CP, caratterizzati dall'espressione delle citocheratine a basso e alto peso molecolare (1). In particolare i CP mostrano positività per la citocheratina 7 mentre la citocheratina 8 e la citocheratina 20 sono negative; tale profilo immunofenotipico è utile per la diagnosi differenziale del CP con le cisti della tasca di Rathke (vedi diagnosi differenziale).

La microscopia elettronica mostra le caratteristiche ultrastrutturali tipiche delle cellule epiteliali cheratinizzanti, ossia la presenza di numerosi tonofilamenti, solide giunzioni intercellulari e assenza di granuli secretori (1, 3, 18).

1.5.4 Diagnosi differenziale

I CP con estesa componente cistica ed ipocellulari possono creare problemi di diagnosi differenziale con altre lesioni cistiche tipiche della regione sellare, in particolare con le cisti epidermoidi e con quelle della tasca di Rathke. Le **cisti epidermoidi** sono uniloculari, bordate da un epitelio squamoso stratificato di spessore uniforme e raramente calcifiche mentre la componente epiteliale cistica del CP ha un aspetto irregolarmente nodulare, con frequenti calcificazioni

distrofiche. Le **cisti della tasca di Rathke** invece sono bordate da un epitelio ciliato cubico o colonnare con occasionali “goblet cells” e aree focali di metaplasia squamosa. In presenza di un'estesa metaplasia squamosa le cisti della tasca di Rathke possono simulare un CP, sia macroscopicamente sia istologicamente. In questi casi l'immunoistochimica può essere d'aiuto nella diagnosi differenziale poiché i CP non esprimono né la citocheratina 8 né la citocheratina 20, mentre sia le cisti della tasca di Rathke che le cellule normali della *pars intermedia* dell'ipofisi esprimono entrambi i marker (1, 19).

Va ricordato, infine, come il carattere infiltrativo del CP causa spesso una gliosi reattiva nel parenchima cerebrale circostante che, qualora sia particolarmente esuberante, non deve essere confusa con un astrocitoma pilocitico.

1.7 Cenni di terapia

Sebbene considerato istologicamente una neoplasia benigna (grado I sec WHO), il CP, nello specifico l'adaCP, può raggiungere dimensioni considerevoli e mostra spesso una spiccata tendenza a infiltrare le adiacenti strutture cerebrali (ipotalamo, ipofisi e chiasma ottico) e neurovascolari. Pertanto la **completa exeresi chirurgica** dell'adaCP, pur costituendo la prima scelta terapeutica, è piuttosto difficile da praticare, poiché è associata a un alto tasso di morbidità causata da disfunzioni endocrine (panipopituitarismo; diabete insipido) e gravi deficit neurologici (20). Per evitare tali complicanze si preferisce ricorrere, nel 20-50% dei casi, ad un approccio chirurgico meno aggressivo, ovvero una **resezione subtotale** della neoplasia, associando tale intervento a una **radioterapia post-operatoria** sul residuo tumorale (21). Tuttavia il tasso di recidiva post-operatoria è alto ed è pari al 23% e al 27% rispettivamente a seguito di resezione totale o resezione subtotale associata a radioterapia adiuvante, in un periodo post-operatorio di cinque anni (22, 23).

Attualmente non c'è un consenso né esistono linee guida per il trattamento dei CP. **L'asportazione chirurgica** dei CP è effettuata attraverso differenti approcci microchirurgici transcraniali (subfrontale, frontolaterale, pterionale), transfenoidale o transventricolare (per rimozione completa o per marsupializzazione). La scelta dell'approccio dipende sostanzialmente dalla sede della lesione; l'approccio transfenoidale è solitamente riservato per le più frequenti lesioni con localizzazione intrasellare o intra-soprasellare. L'intervento è praticato in anestesia generale, con l'ausilio del microscopio operatorio o dell'endoscopio; l'asportazione del tumore è esclusivamente extracerebrale. L'approccio endoscopico endonasale (EEA) transfenoidale offre una visione anatomica più ampia, attraverso un accesso immediato al tumore immediatamente dopo l'apertura durale soprasellare, senza la retrazione del parenchima cerebrale o del nervo ottico. Tale intervento può essere effettuato sia per i tumori primitivi sia per le recidive (24, 25). L'evoluzione delle tecniche chirurgiche ha portato, nelle ultime decadi, a una netta riduzione della mortalità e un aumento dell'efficacia dell'intervento. La mortalità precoce è, infatti, pari al 2.6% dopo la chirurgia transfenoidale e al 3.1% dopo quella transcranica (26). Nei tumori recidivi l'asportazione totale si riesce ad ottenere in una percentuale di casi considerevolmente più bassa rispetto ai tumori primitivi (0-25%) ed è associata con un'aumentata mortalità e morbidità peri-operatorie (10.5-24%) (27).

Per i casi in cui un'asportazione totale non risulti praticabile (ad esempio neoplasie di dimensioni superiori ai 4-5 cm o recidive tumorali) l'approccio standard consiste nella rimozione subtotale seguita da una **radioterapia adiuvante tradizionale**. Si riesce in tal modo a bloccare o rallentare la crescita del tumore residuo, prolungando la sopravvivenza libera da malattia. Si utilizza un'EBR (External Beam Radiation), la dose è di 50-55Gy in 25-30 frazioni, secondo il frazionamento convenzionale (28).

La **radioterapia stereotassica**, sia sotto forma di radiochirurgia (RS) che di radioterapia stereotassica frazionata (FSRT), costituisce una più accurata tecnica d'irradiazione che consente una più precisa localizzazione del tumore con conseguente riduzione del volume di normale parenchima cerebrale esposto ad alte dosi di terapia radiante (1, 2). È utilizzata sui residui tumorali post-chirurgici con un diametro inferiore di 2,5 cm, oppure sulle recidive. Può essere effettuata con metodica LINAC (acceleratore lineare) mediante fasci focali diretti su aree del cranio determinate in base alla localizzazione del tumore oppure con la più moderna metodica GAMMA KNIFE che consiste in un sistema ad alta precisione che genera un fascio radiante monofocale, con l'impiego del cobalto 201 radioattivo (29-31).

Ricordiamo, infine, che in caso di tumori estesamente cistici, soprattutto se recidivanti, un frequente approccio terapeutico è quello del **drenaggio stereotassico**, seguito dall'instillazione sotto guida TC d'isotopi radioattivi beta-emittenti (brachiterapia) o chemioterapici (bleomicina o interferone α) (2).

Attualmente non esiste alcuna terapia farmacologica efficace per i CP; l'unico trattamento è quello chirurgico e/o radioterapico.

1.8 Prognosi

1.8.1 Mortalità e morbilità

Più dell'85% dei pazienti con CP sopravvive dopo tre anni dalla diagnosi; la mortalità appare quindi solitamente contenuta, quando la neoplasia è trattata in modo tempestivo e opportuno. I **tassi di sopravvivenza generale**, descritti prevalentemente nelle serie pediatriche, riflettono gli effetti dei molteplici trattamenti e variano **dall'83 al 96% a 5 anni e dal 65 al 100% a 10 anni, con una media del 62% a 20 anni** (2). Nella popolazione adulta o mista (adulti-bambini) il tasso di sopravvivenza va **dal 54 al 96% a 5 anni e dal 40 al 93% a 10 anni (2), con una sopravvivenza libera da recidiva**

del 60-93% a 10 anni (3). I limiti bassi dei tassi di sopravvivenza dipendono dai dati derivanti dagli studi più datati, ossia prima dei moderni progressi nelle tecniche neurochirurgiche, di neuroimaging e di radioterapia.

La morte del paziente affetto da CP può verificarsi anche a distanza di molti anni dal trattamento. La mortalità tardiva può essere causata sia dal tumore, sia dai trattamenti: malattia progressiva con multiple recidive, insufficienza ipotalamica cronica, deficit ormonali, patologie cardiovascolari, convulsioni (2).

Per quanto riguarda la **morbilità** a lungo termine, sono stati riportati più frequentemente ipopituitarismo, aumentato rischio cardio-vascolare (da 3 a 19 volte maggiore rispetto alla popolazione generale), danno ipotalamico (sindrome metabolica caratterizzata da severa obesità, stanchezza, dispnea, diarrea, disturbi psico-sociali e motivazionali), deficit visivi e neurologici, riduzione della densità minerale ossea, deterioramento delle funzioni cognitive e, di conseguenza, grave compromissione della qualità di vita dei pazienti (2).

Pertanto la **rilevanza clinica dei CP non è data tanto da una significativa mortalità quanto dall'elevata morbilità**, dovuta ai gravi disturbi endocrini, all'interessamento dell'ipotalamo e delle vie ottiche ed alla spiccata **tendenza alle recidive**. I CP frequentemente comportano una scarsa qualità di vita dei pazienti affetti e, proprio per le numerose sequele a lungo termine associate sia alla neoplasia sia ai trattamenti (chirurgici e/o radioterapici), sono spesso considerati dai clinici alla stregua di una patologia cronica.

Ricordiamo, infine, la rarissima insorgenza di **neoplasie secondarie** oppure di **trasformazione maligna di CP** a seguito della radioterapia. Il rischio di neoplasie secondarie è veramente basso, con solo pochi casi riportati in letteratura, comprendenti due casi di glioblastoma, un caso di glioma (grado di malignità non specificato) ed un caso di meningioma della fossa cranica

posteriore (28, 32). La trasformazione maligna del CP, molto rara, si caratterizza per la disseminazione metastatica via leptomeningea (33-35). La componente maligna può mostrare gli aspetti morfologici di un carcinoma squamoso, carcinoma mioepiteliale o *odontogenic ghost cell carcinoma* (1).

1.8.2 Fattori prognostico-predittivi

Allo stato attuale non c'è ancora un consenso riguardo i fattori che potrebbero influenzare il comportamento biologico dei CP e, di conseguenza, **mancano dei marker capaci di predire in maniera efficace una maggiore aggressività biologica del tumore e, pertanto, l'eventuale comparsa di recidive.**

L'unico fattore prognostico accertato è costituito dalle **dimensioni del tumore**, con i più alti tassi di sopravvivenza riscontrati in tumori di dimensioni inferiori ai 3 cm (2, 36), in quanto, come già sopra esposto, la comparsa delle recidive è strettamente correlata alla radicalità dell'intervento chirurgico, non praticabile per le lesioni di grosse dimensioni, con una prognosi decisamente sfavorevole per i tumori più grandi di 5 cm (3).

Per quanto riguarda gli aspetti istopatologici, il sottotipo papillare è solitamente associato a una minore tendenza alla recidiva e a una prognosi migliore rispetto al sottotipo adamantinoso oppure alle forme miste (2). Inoltre, un aspetto morfologico significativamente associato con le recidive tumorali, è costituito dalla presenza di cluster di cellule neoplastiche con morfologia "whorl-like", presenti spesso sul fronte d'invasione tumorale. Anche una marcata gliosi reattiva nel parenchima cerebrale perilesionale, secondo alcuni autori (36, 37) è associata con la comparsa di recidive.

Attualmente non esistono degli accertati **marcatori prognostico-predittivi** da determinare mediante metodica immunohistochimica; solo l'indice di proliferazione (Ki-67/MIB-1), sembra

essere correlato con la comparsa di recidive, tuttavia è estremamente variabile da caso a caso e non è stata ancora stabilito un valore *cut-off* (3); alcuni autori hanno descritto un caso di CP clinicamente molto aggressivo e caratterizzato da una rapida insorgenza di recidiva, riportando valori del 20% e del 15% rispettivamente nel tumore primitivo ed in quello recidivo (36).

1.9 Patogenesi del craniofaringioma

1.9.1 Teorie etiopatogenetiche

Il CP è in tumore intracranico di natura non gliale derivante dalla trasformazione di tessuto embrionale. Ci sono diverse ipotesi su quale sia il tessuto di origine: residui ectodermici della tasca di Rathke o residui embrionali epiteliali dell'adenoipofisi e dell'infundibolo anteriore.

L'esatta etiopatogenesi di questi tumori è ancora poco chiara e molto controversa, tuttavia numerosi aspetti genetici e molecolari fanno ipotizzare una distinta patogenesi nei due sottotipi.

Esistono, pertanto, due principali teorie etiopatogenetiche: embrionale e metaplastica (2):

- **teoria embrionale:** secondo tale teoria l'adaCP deriverebbe dalla trasformazione neoplastica di nidi squamosi di cellule embrionali residue dall'involuzione del dotto craniofaringeo che, inizialmente, connette la tasca di Rathke con il primitivo stomodeo. Durante il processo di proliferazione e rotazione delle cellule della tasca di Rathke che porta alla formazione dell'adenoipofisi le cellule residue del dotto craniofaringeo sono disseminate nella regione sellare e soprasellare che costituiscono, infatti, le sedi più frequenti dei CP (2, 38-40).

- **teoria metaplastica:** secondo tale teoria il papCP deriverebbe dalla metaplasia delle cellule adenoipofisarie della *pars tuberalis* della ghiandola con conseguente formazione di nidi cellulari squamosi (2). Questa ipotesi è supportata dal riscontro di nidi metaplastici squamosi nella ghiandola pituitaria (il cui numero aumenta con l'età) e dalla presenza di ormoni in tali nidi. E'

stato descritto un caso raro di papCP le cui caratteristiche suggerivano una possibile origine dalla trasformazione di residui di una cisti della tasca di Rathke (38).

Pertanto, in base a queste teorie, mentre il papCP originerebbe dalla trasformazione metaplastica di cellule epiteliali più mature dell'ipofisi anteriore, l'adaCP deriverebbe da cellule meno differenziate della tasca di Rathke, residue lungo il decorso del dotto craniofaringeo. **In questo processo assume un ruolo fondamentale il pathway Wnt/ β -catenina** (pathway WNT canonico) (23).

1.9.2 Pathway Wnt/ β -catenina: aspetti generali

Il **pathway Wnt/ β -catenina** è uno dei principali regolatori di molteplici processi cellulari sia nell'embrione, durante l'organogenesi, che nell'adulto. Tale pathway, a livello ipofisario, è coinvolto nella normale morfogenesi e differenziazione tissutale e, qualora attivato in maniera anomala, nei processi di cancerogenesi (41-43).

La famiglia delle **proteine Wnt** (Wingless Type) è formata da venti membri che agiscono legandosi ai recettori Frizzled (Fz) i quali presentano un dominio extracellulare N-terminale ricco di cisteine che lega la proteina Wnt, sette eliche transmembrana e una corta coda citoplasmatica carbossiterminale. Per l'attivazione del sistema è necessaria anche la presenza dei co-recettori LRP (LDL related protein) e la formazione del complesso ternario (Wnt/Fz/LRP) (44).

L'attività del pathway Wnt/ β -catenina è controllata dalla stabilità della β -catenina, un attivatore trascrizionale mancante di un dominio di legame con il DNA. In assenza dei ligandi Wnt, **la β -catenina è fosforilata in specifici residui amminoacidici codificati dall'esone 3 del gene CTNNB1** da parte di un complesso di distruzione costituito da axina, complesso APC (Adenomatous Polyposis Coli) e GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase-3 β) che rapidamente la indirizza alla **degradazione via proteasoma attraverso un pathway di ubiquitinazione**. Ciò previene la sua

stabilizzazione e, di conseguenza, l'attivazione del pathway Wnt. Il legame delle proteine Wnt ai loro recettori Frizzled (FZL) e co-recettori LRP causa la degradazione del complesso di distruzione attraverso l'attivazione di Dishevelled (DVL), proteina dello scaffold citoplasmatico, impedendo in tal modo la fosforilazione della β -catenina e, di conseguenza, la sua degradazione. **La stabilizzazione della β -catenina causa un aumento dei livelli citoplasmatici della proteina e la sua traslocazione nel nucleo** dove può interagire con fattori di trascrizione leganti il DNA appartenenti alla famiglia TCF/LEF, attivando in tal modo l'espressione dei geni target del pathway (45). Alcuni dei geni attivati sono importanti per la progressione del ciclo cellulare, come ad esempio c-myc e ciclina D1, altri sono invece inibitori dell'apoptosi, come survivina, oppure geni promuoventi la progressione tumorale, come laminina- γ 2, e mmp7 (matrix metalloproteinase-7), che codificano per proteine coinvolte nella degradazione della membrana basale e della matrice extracellulare.

Quando il sistema Wnt non è stimolato, i fattori di trascrizione TCF/LEF rimangono associati con i co-repressori trascrizionali Gro (Groucho) e CtBP (C-Terminal Binding Protein), formando un complesso inattivo (46).

Mutazioni del gene CTNNB1 codificante la β -catenina a livello dell'esone 3 comportano delezioni o sostituzioni dei residui amminoacidici critici per la sua degradazione da parte del complesso di distruzione causando, pertanto, un aumento dei livelli citoplasmatici della proteina, la sua espressione nucleare aberrante e, di conseguenza, un'attivazione costitutiva del pathway Wnt (40-45).

1.9.3 Pathway Wnt/ β -catenina nella patogenesi dell'adaCP

Studi in topi geneticamente modificati per ottenere una forma mutata di β -catenina (trascrizionalmente attiva, ma priva del residuo amminoacidico codificato dall'esone 3 del gene CTNNB1) hanno dimostrato che **il pathway Wnt/ β -catenina è necessario per la differenziazione**

terminale delle cellule ipofisarie ormono-produttrici negli ultimi stadi dello sviluppo pituitario mentre deve essere inibito negli stadi iniziali per consentire la normale proliferazione dei progenitori della tasca di Rathke. Un'up-regulation del pathway Wnt/ β -catenina nei progenitori della tasca di Rathke causa, infatti, iperplasia pituitaria, tessuto pituitario ectopico nella cavità orofaringea e morte perinatale nell'80% dei topi; il restante 20% sopravvive (in media 11 settimane dopo la nascita) ma con gravi difetti di crescita e tumori pituitari che mostrano aspetti istopatologici simili a quelli degli adaCP ed espressione nucleare della β -catenina e di Axina2, Lef1 e BMP4, indicanti l'attivazione del pathway Wnt (41, 47-50).

Sebbene i tumori murini differiscano sotto alcuni aspetti da quelli umani (assenza di wet keratin o calcificazioni; più rapida insorgenza post natale), suggerendo l'esistenza di differenze specie-specifiche, le mutazioni della β -catenina umana sono funzionalmente equivalenti a quelle dei modelli murini. Pertanto, sia i tumori dei modelli murini che quelli umani mostrano come **la mutazione del gene CTNNB1 codificante la β -catenina e la conseguente over-attivazione del pathway Wnt/ β -catenina siano coinvolte nell'etiopatogenesi dell'adaCP (41).**

Le mutazioni del gene CTNNB1 costituiscono quindi l'hallmark molecolare dell'adaCP. Tali mutazioni sono state osservate nella gran parte degli adaCP umani (circa il 70% dei casi), interessano prevalentemente l'esone 3 del gene e, come già sopra illustrato, comportano la perdita o la sostituzione di residui amminoacidici critici per la stabilizzazione della proteina con conseguente blocco della sua degradazione, accumulo nucleo-citoplasmatico (ovvero espressione nucleare aberrante) ed attivazione del pathway Wnt (51-53). Tuttavia, l'accumulo nucleare della β -catenina si osserva in più del 94% degli adaCP, suggerendo che ulteriori meccanismi, ancora non noti, probabilmente di natura epigenetica, possano essere implicati nella stabilizzazione della proteina (23). Inoltre, sebbene la mutazione CTNNB1 sia ubiquitaria, l'espressione nucleare della β -catenina si osserva solo in piccoli cluster di cellule neoplastiche; tali cluster spesso mostrano una

morfologia “whorl-like” e sono presenti esclusivamente nell’adaCP, mai nel papCP o in altre neoplasie della regione sellare (54, 55). Le cellule neoplastiche dei cluster non esprimono marcatori di proliferazione (Ki-67), ormoni pituitari e sono negative per la sinaptofisina. Si tratta, pertanto, di cellule indifferenziate, non proliferanti, che non mostrano un fenotipo neurale né endocrino (41, 49-50).

1.9.4 Ruolo delle cellule staminali nella patogenesi del CP

La presenza di cellule staminali tessuto specifiche è stata ampiamente documentata in molti organi e tessuti tra cui, encefalo, tratto gastro-intestinale, cute, midollo osseo e muscolo scheletrico. Tali cellule sono caratterizzate dalla capacità di auto-rigenerarsi (“self renewal”), dall’espressione di marcatori di staminalità (come SOX2) e possono dare origine a una progenie di cellule capaci di differenziare e di contribuire sia all’omeostasi, sia alla rigenerazione tissutale (41, 56, 57). La presenza di **cellule staminali nell’ipofisi**, sebbene a lungo ipotizzata, è stata solo di recente dimostrata, in modelli murini e nell’uomo. Le cellule staminali ipofisarie esprimono i fattori di trascrizione SOX2 e SOX9 (quest’ultimo solo nel topo), possono differenziare in tutte le linee cellulari ormono-produttrici ipofisarie e sono cruciali per l’omeostasi e la rigenerazione della ghiandola (58-59).

Le cellule staminali tessuto specifiche possono dare origine a tumori, concetto che ha dato luogo al modello “gerarchico” delle **cancer stem cell (CSC)** (60). Il termine *CST* definisce una cellula neoplastica capace di autorigenerarsi, cioè di dare origine ad un’altra cellula uguale a se stessa (con capacità tumorigenica) e di generare una popolazione cellulare neoplastica più differenziata (priva di capacità tumorigenica). Pertanto nel tumore è presente una popolazione minoritaria di *CST* responsabili della crescita tumorale, del mantenimento del compartimento staminale neoplastico e della sua progenie non-tumorigenica, che costituisce la massa del tumore ma è priva di quelle caratteristiche proprie delle *CST*. Si evince come il modello staminale consideri il tumore

non come una popolazione omogenea di cellule piuttosto come una proliferazione eterogenea caratterizzata da una sorta di “gerarchia” dove le *CST*, seppur poche, rappresentano la componente base dello sviluppo e del mantenimento della neoplasia.

Un'altra caratteristica delle *CSC* è costituita dalla resistenza alla chemioterapia e radioterapia; tale aspetto potrebbe essere responsabile della progressione tumorale e delle recidive (61, 62).

Le *CSC* potrebbero, pertanto, rappresentare potenziali target per nuove terapie in campo oncologico. Tuttavia, l'eterogeneità morfologica di un tumore, associata a quella molecolare evidenziabile dalla variabilità di espressione dei marcatori proliferativi, differenziativi ed oncogenici, rende estremamente difficile una corretta identificazione su tessuto delle *CSC*.

Recenti studi, sia su modelli murini che nei tumori umani, hanno indagato la presenza di *CSC* nei tumori ipofisari, soprattutto negli *adaCP* (23, 49, 54, 58). I risultati di tali studi suggeriscono la presenza **nell'*adaCP* di una popolazione minoritaria di cellule con fenotipo staminale che danno luogo a cluster di cellule neoplastiche fondamentali per la sopravvivenza tumorale.** Tali cluster sono caratterizzati dall'espressione nucleare aberrante della β -catenina e non esprimono il Ki-67, quindi sono in uno stato non proliferante.

1.9.5 Alterazioni molecolari del craniofaringioma papillare

Il *papCP* differisce dall'*adaCP* per numerosi aspetti: epidemiologici, clinico-prognostici, istomorfologici, etiopatogenetici e molecolari. Infatti, se la mutazione del gene *CTNNB1* rappresenta l'hallmark molecolare dell'*adaCP* ed è presente in più del 70% dei tumori, **il marker molecolare del *papCP* è costituito dalla mutazione di *BRAF V600E***, riscontrata in una percentuale considerevolmente più alta di casi (95%), con una specificità del 100%.

Pertanto mentre l'adaCP è caratterizzato da mutazioni CTNNB1 con attivazione del pathway WNT/ β -catenina, il papCP mostra mutazioni di BRAF V600E con attivazione del pathway della MAP chinasi.

Le mutazioni CTNNB1 e BRAF V600E presenti nei due sottotipi di CP sono entrambe clonali e mutuamente esclusive. Tali risultati potrebbero avere importanti implicazioni nella diagnosi e nel trattamento di queste neoplasie (63).

II. Scopo del lavoro

Sulla base di quanto esposto, gli **obiettivi** del nostro lavoro sono stati i seguenti:

- Approfondire lo studio della patobiologia dei CP, in particolare il ruolo della β -catenina e della staminalità;
- Studiare eventuali fattori associati con la tendenza alla recidiva, nello specifico nel sottotipo adamantinomatoso;
- Individuare dei marcatori prognostico-predittivi da poter utilizzare, mediante metodica immunoistochimica, nella diagnostica neuropatologica per individuare *ab initio* i casi di neoplasie biologicamente più aggressivi e, quindi, a maggior rischio di recidiva.

Per raggiungere tali obiettivi abbiamo pertanto deciso di

- Valutare, mediante metodica immunoistochimica, su un gruppo selezionato di CP:
 - 1) l'espressione della β -catenina;
 - 2) l'indice di proliferazione (Ki-67);
 - 3) l'espressione di marcatori di staminalità: il CD166 (ALCAM), strettamente correlato con numerosi tipi di neoplasie, con differenti outcome prognostici (64); CD133 (Prominin 1), la cui espressione è associata ad una scarsa risposta alla radioterapia (23);
- Correlare i risultati ottenuti con gli aspetti clinici delle neoplasie in studio, ovvero presenza o assenza di recidive tumorali.

Si tratta pertanto di uno **studio neuropatologico e immunoistochimico con correlazioni cliniche** che potrebbe fornire risultati significativi in termini di prognosi e di outcome clinico. Ovvero, tali risultati potrebbero modificare negli anni a venire il management terapeutico dei pazienti affetti da CP attraverso trattamenti aggiuntivi postoperatori per ridurre il rischio di recidive a lungo termine.

III. Materiali e Metodi

3.1 Casistica

Abbiamo analizzato **ventisette craniofaringiomi** ottenuti dagli archivi della sezione di Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze Biomediche Avanzate dell'Università Federico II di Napoli; i casi sono stati distinti in gruppi sulla base dell'outcome clinico, ovvero in base alla **presenza o assenza di recidiva tumorale**.

- Il **primo gruppo** era quello dei tumori che non avevano dato recidiva (**CP non recidivi**), in un periodo di follow-up di 6-8 anni; questo gruppo comprendeva otto casi (4 casi di papCP e 4 casi di adaCP) ed includeva due donne e sei uomini di età compresa da 22 a 66 anni.

- Il **secondo gruppo** era quello delle recidive tumorali (**CP recidivi**): comprendeva tredici casi (1 caso di papCP, 12 casi di adaCP) ed era costituito da tre donne ed dieci uomini, di età compresa tra 4 e 69 anni; l'intervallo libero da malattia variava da 6 mesi a 2 anni.

- Per sei dei tredici casi di recidive tumorali (adaCP) è stato possibile analizzare anche i corrispondenti tumori primitivi, costituendo in tal modo il **terzo gruppo, quello dei tumori primitivi (CP primitivi)**. Per gli altri sette casi di recidiva tumorale non è stato possibile esaminare i tumori primitivi o perché asportati presso altra struttura (5 casi), pertanto non disponibili nei nostri archivi, oppure a causa della quantità del materiale, troppo esiguo ai fini di una corretta indagine immunohistochimica (2 casi).

Da un punto di vista clinico, alla diagnosi, i sintomi più frequenti erano i seguenti: emianopsia bitemporale; ipopituitarismo/panipopituitarismo; diabete insipido.

In tutti i casi, il tumore era stato asportato in maniera totale mediante approccio endoscopico endonasale (27). Pertanto, la radicalità chirurgica ha rappresentato il criterio di selezione dei casi.

Per ciascun caso sono state rivalutate le sezioni allestite e colorate con ematossilina/eosina e la diagnosi di CP, con il corretto istotipo, è stata confermata sulla base delle linee guida dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO, 2007).

3.2 Colorazioni immunoistochimiche

Sono state eseguite colorazioni immunoistochimiche per **β-catenina**, **Ki-67** (indice di proliferazione) e per i marcatori di staminalità **CD133** (PROMININ 1) e **CD166** (ALCAM), su sezioni ottenute dall'inclusione in paraffina più rappresentativa di ciascun caso. Gli anticorpi primari utilizzati sono stati anti β-catenina (clone 14, mouse; Roche Ventana); l'anticorpo Monoclonal Mouse Anti Human Ki67 Antigen (Clone MIB1), anti CD166 [MOG/07] (Abcam, ab49496); anti CD133 (Abcam, ab19898). La diluizione è stata di 1:100. Le indagini immunoistochimiche sono state eseguite con la metodica standard utilizzata nei laboratori del nostro dipartimento e per visualizzare i tre anticorpi primari di nostro interesse, è stato utilizzato l'ultraView Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical System). I tessuti positivi di controllo utilizzati per verificare la validità del metodo sono stati i seguenti: fibromatosi mammaria per la β-catenina e cute per il CD133 ed il CD166.

3.3 Score di immunoreattività

L'immunoreattività nucleare per la β-catenina è stata valutata in maniera semiquantitativa sulla base dell'intensità di colorazione e della proporzione di cellule neoplastiche positive e applicando il seguente score (65): **score d'immunoreattività= score di intensità x score di proporzione.**

Lo score d'intensità era il seguente:

- 0: negativo;
- 1: debole;
- 2: moderato;

- 3: forte.

Lo score di proporzione era il seguente:

- 0: negativo;
- 1: cellule positive <10%;
- 2: cellule positive tra 11% e 50%;
- 3: cellule positive tra 51% e 80%;
- 4: cellule positive >80%.

In base al punteggio totale sono stati individuati **due livelli d'immunoreattività**:

- **Negativo/basso**: score totale 0-2
- **Moderato/alto**: score totale > 2

Per il **Ki-67 (indice di proliferazione)** abbiamo stabilito come *cut-off* un valore del 5% per discriminare tra i casi ad alto rispetto a quelli a basso ritmo proliferativo (Ki-67>5%=alto ritmo proliferativo).

L'immunoreattività per i marcatori di staminalità CD133 e CD166 è stata valutata in maniera semiquantitativa sulla base dell'intensità di colorazione e della proporzione di cellule neoplastiche positive: score d'immunoreattività= score di intensità x score di proporzione.

Lo score d'intensità era il seguente:

- 0: negativo;
- 1 debole;
- 2: moderato;
- 3: forte.

Lo score proporzione era il seguente:

- 1: focale (<50% delle cellule positive);
- 2: diffuso (>50% delle cellule positive).

In base al punteggio totale sono stati individuati **due livelli d'immunoreattività**:

- **Negativo/basso**: 0-2
- **Moderato/alto**: > 2

In tutti i casi, l'immunoreattività valutata è stata esclusivamente quella di membrana.

3.3 Analisi statistica

Abbiamo utilizzato:

- **il test esatto di Fisher**: per indagare una correlazione statistica tra gli score d'immunoreattività di β -catenina, CD166, CD133, Ki-67 e l'outcome clinico, ovvero presenza di recidiva tumorale.

Il test è stato eseguito su ventuno casi: otto CP non recidivi, sei CP primitivi e sette dei tredici CP recidivi (dei sei casi di cui erano a nostra disposizione sia il tumore primitivo che quello recidivo abbiamo considerato solo il tumore primitivo ai fini dell'analisi statistica);

- **il test di correlazione di Spearman**: per esaminare la correlazione statistica tra (1) l'espressione immunoistochimica della β -catenina e, rispettivamente, del CD166, CD133 e Ki-67; (2) tra l'espressione immunoistochimica del CD166 ed il Ki-67. Il test è stato eseguito in tutti i casi.

Sono stati esclusi dall'analisi statistica i pochi casi in cui, per esaurimento di tessuto diagnostico, non è stato possibile eseguire tutte le colorazioni immunoistochimiche, oppure le stesse non sono risultate valutabili.

Sono stati considerati statisticamente significativi valori di $p < 0.05$. Il programma utilizzato è stato il GraphPad Prism.

IV. Risultati

4.1 Espressione immunoistochimica della β -catenina

- Nel gruppo dei **CP NON RECIDIVI** abbiamo riscontrato: un solo caso di adaCP che ha mostrato una positività nucleare per la β -catenina, ma con uno score totale pari a 2 (livello negativo/basso di immunoreattività). Gli altri sette casi (3 adaCP, 4 papCP) hanno mostrato assenza di immunoreattività nucleare per la β -catenina (score 0, positività solo di membrana) (**tabella 1**).
- Nel gruppo dei **CP RECIDIVI** abbiamo riscontrato: quattro casi di adaCP con un livello di immunoreattività negativo/basso; otto casi di adaCP con un livello di immunoreattività moderato/alto; l'unico caso di papCP non ha mostrato, come atteso, immunoreattività nucleare per la β -catenina (score 0, positività solo di membrana) (**tabella 2**).
- Nel gruppo dei **CP PRIMITIVI** abbiamo riscontrato: due casi (adaCP) con un livello di immunoreattività negativo/basso; quattro casi (adaCP) con un livello di immunoreattività moderato/alto (**tabella 3**); **in tutti i casi, inoltre, abbiamo riscontrato una totale concordanza dei risultati ottenuti tra i tumori primitivi e le corrispondenti recidive.**

4.2 Indice di proliferazione (Ki-67)

- Nel gruppo dei **CP NON RECIDIVI** abbiamo riscontrato: sei casi a basso indice proliferativo (2 papCP, 4 adaCP); due casi ad alto indice proliferativo (papCP) (**tabella 1**).
- Nel gruppo dei **CP RECIDIVI** abbiamo riscontrato: due casi a basso indice proliferativo (adaCP); nove casi ad alto indice proliferativo (adaCP); in due casi (1adaCP, 1 papCP) non è stato possibile effettuare lo studio immunoistochimico per esaurimento del materiale in esame (**tabella 2**).
- Nel gruppo dei **CP PRIMITIVI** abbiamo riscontrato: un caso a basso indice proliferativo (adaCP); cinque casi ad alto indice proliferativo (adaCP) (**tabella 3**); **in tutti i casi, inoltre, abbiamo**

riscontrato una totale concordanza dei risultati ottenuti tra i tumori primitivi e le corrispondenti recidive.

4.3 Espressione immunoistochimica del CD166

- Nel gruppo dei **CP NON RECIDIVI** abbiamo riscontrato: sette casi con livello di immunoreattività negativo/basso (4adaCP, 3 papCP); un unico caso di papCP con livello di immunoreattività moderato/alto (score totale: 4) (**tabella 1**).

- Nel gruppo dei **CP RECIDIVI** abbiamo riscontrato: tre casi con un livello di immunoreattività negativo/basso (2 adaCP, 1 papCP); sei casi di adaCP con un livello di immunoreattività moderato/alto; in quattro casi non è stato possibile effettuare lo studio immunoistochimico per esaurimento del materiale in esame (**tabella 2**).

- Nel gruppo dei **CP PRIMITIVI** abbiamo riscontrato: due casi (adaCP) con livello di immunoreattività negativo/basso (score totale 1); tre casi (adaCP) con un livello di immunoreattività moderato/alto; in un unico caso non è stato possibile effettuare lo studio immunoistochimico per esaurimento del materiale in esame (**tabella 3**); **in tutti i casi valutati, inoltre, abbiamo riscontrato una totale concordanza dei risultati ottenuti tra i tumori primitivi e le corrispondenti recidive.**

4.4 Espressione immunoistochimica del CD133

- Nel gruppo dei **CP NON RECIDIVI** abbiamo riscontrato: quattro casi con livello di immunoreattività negativo/basso (1 papCP, 3 adaCP); tre casi di papCP con un livello di immunoreattività moderato/alto; un unico caso di adaCP la colorazione immunoistochimica è risultata essere non valutabile (**tabella 1**).

- Nel gruppo dei **CP RECIDIVI** abbiamo riscontrato: sette casi con un livello di immunoreattività negativo/basso (6 adaCP, 1 papCP); due casi di adaCP con un livello di immunoreattività moderato/alto; in quattro casi non è stato possibile effettuare lo studio immunoistochimico per esaurimento del materiale in esame (**tabella 2**).

- Nel gruppo dei **CP PRIMITIVI** abbiamo riscontrato: quattro casi di adaCP con livello di immunoreattività negativo/basso (score totale: 0); in un caso non è stato possibile effettuare lo studio immunoistochimico per esaurimento del materiale in esame ed in un unico caso la colorazione immunoistochimica è risultata essere non valutabile (**tabella 3**); ove è stato possibile effettuare una correlazione, **abbiamo riscontrato una concordanza dei risultati ottenuti tra i tumori primitivi e le corrispondenti recidive**.

4.5 Analisi statistica

Con il **test di Fisher (figura 5)** abbiamo riscontrato una **correlazione statisticamente significativa** tra l'insorgenza di recidiva tumorale e:

- Un livello d'immunoreattività moderato/alto della β -catenina ($p=0.0068$);
- Un livello d'immunoreattività moderato/alto di CD166 ($p=0.0248$);
- Alto indice di proliferazione (Ki-67) ($p=0.0408$).

Non abbiamo riscontrato una correlazione statisticamente significativa tra l'espressione di CD133 e la presenza di recidiva ($p=0.5962$).

Con il **test di correlazione di Spearman** abbiamo riscontrato una **correlazione statisticamente significativa** tra l'espressione di:

- β -catenina e Ki-67 ($p=0.0087$, $r=0.5572$);
- β -catenina e CD166 ($p=0.0195$, $r=0.5051$).

Non abbiamo riscontrato una correlazione statisticamente significativa tra CD166 e Ki-67 ($p=0.4642$, $r=0.1904$) e tra β -catenina e CD133 ($p=0.5946$, $r=0.1304$).

NB: il test di Fisher è stato eseguito su ventuno casi comprendenti otto casi di CP non recidivi, sei casi di CP primitivi e sette casi di CP recidivo, poiché di questi ultimi sette casi non era a nostra disposizione il tumore primitivo. Abbiamo quindi considerato le recidive tumorali alla stregua dei tumori primitivi, e questo è stato possibile poiché, dallo studio immunohistochimico eseguito per tutti i marcatori in studio, è emerso un profilo immunofenotipico totalmente sovrapponibile tra CP primitivi e le corrispondenti recidive.

V. Discussione

I **CP sono tumori epiteliali benigni della regione sellare** che originano da residui embrionali della tasca di Rathke. Sono tumori rari (incidenza di 0.5 - 2.5 per 100.000 persone/anno), più frequenti in età pediatrica, in tale fascia di età costituiscono, infatti, il 5-10% dei tumori intracranici e rappresentano le più frequenti neoplasie ipofisarie (3). Si distinguono **due sottotipi, l'adaCP e il papCP**, che differiscono tra loro non solo per gli aspetti istologici ma anche per quelli etiopatogenetici, per il comportamento biologico e per l'outcome clinico. Il papCP è una neoplasia abbastanza infrequente, insorge quasi esclusivamente nell'adulto ed ha una prognosi favorevole. L'adaCP, il sottotipo più frequente, mostra due picchi di insorgenza, il primo nel bambino (5-15 anni) ed il secondo nell'adulto (45-60 anni) e, pur essendo una neoplasia istologicamente benigna (grado I sec. WHO) mostra un carattere localmente aggressivo che si manifesta con la tendenza a infiltrare le circostanti strutture vitali cerebrali e neurovascolari (3). Tali aspetti rendono **l'adaCP una neoplasia di difficile management terapeutico**. A tale riguardo, attualmente, non esistono delle linee guida ed il trattamento dei CP si basa sostanzialmente su due principali opzioni terapeutiche, la chirurgia e/o la radioterapia: asportazione totale del tumore oppure un approccio chirurgico meno aggressivo di rimozione subtotale seguito da una terapia radiante sul residuo tumorale. La scelta è il risultato di un delicato bilancio tra l'obiettivo di rimuovere quanto più tumore possibile e quello di non danneggiare il paziente, in considerazione delle dimensioni, della localizzazione, dell'estensione della lesione e dei rapporti della stessa con le strutture adiacenti. Tuttavia, nonostante gli sforzi terapeutici, **l'adaCP mostra una frequente tendenza a recidivare**, sia a seguito dell'asportazione totale che di quella parziale associata a radioterapia (rispettivamente 23% e 27%, in un periodo post-operatorio di cinque anni) (22, 23). Ciò rende ancora più complicata la gestione dei pazienti in quanto, nelle recidive, l'asportazione totale è realizzabile in una percentuale di casi considerevolmente più bassa rispetto ai tumori primitivi (0-

25%) e si associa a un'aumentata mortalità e morbilità peri-operatoria (27). Pertanto, anche se i pazienti affetti da CP, se tempestivamente e opportunamente trattati, mostrano una sopravvivenza prolungata (>85% dopo tre anni dalla diagnosi), hanno spesso una scarsa qualità di vita sia per gli effetti diretti della crescita tumorale che per le complicanze dei trattamenti ricevuti. Si può ben comprendere la necessità di individuare le neoplasie a comportamento biologico più aggressivo. **Attualmente non disponiamo di efficaci marcatori prognostico-predittivi da poter utilizzare nella diagnostica neuropatologica per poter discriminare, al momento della diagnosi, i casi di neoplasia caratterizzati da una maggiore aggressività biologica e, quindi, tendenza alla recidiva.** Si tratta di un argomento oggetto di dibattito, probabilmente perché i CP sono tumori rari la cui esatta etiopatogenesi non è ancora del tutto nota: infatti, se da una parte è ormai ampiamente documentato il ruolo del pathway Wnt/ β -catenina nella patobiologia dell'adaCP (40-54), dall'altra resta ancora controverso quello emergente della **staminalità**.

I più recenti lavori a riguardo (23, 49, 54, 58) suggeriscono **la presenza, nell'adaCP, di una minoranza di cellule con fenotipo staminale.** Da tali cellule originano cluster di cellule neoplastiche che sono cruciali per la crescita e la sopravvivenza tumorale, agendo, probabilmente, in maniera "paracrina", cioè attraverso la produzione di un'ampia gamma di fattori di crescita, di chemiochine, citochine e dei loro recettori (54). Questi cluster sono variabili per quantità, mostrano spesso una morfologia "whorl-like", sono in uno stato non proliferante (non esprimono il Ki-67) e, fenotipicamente, sono caratterizzati dall'espressione nucleare aberrante della β -catenina. Per quanto riguarda l'espressione di marcatori di staminalità a livello di questi cluster, i dati sono ancora pochi e discordanti poiché, tale espressione, sarebbe presente per alcuni marker, come il CD133, secondo taluni autori (23), assente per altri marker, come SOX2, secondo talaltri (49, 54): ovvero, mentre il CD133 mostra una co-espressione con la β -catenina, altri marcatori di

staminalità, (SOX2, nestina e CD44) pur essendo espressi nei CP, non mostrano co-espressione con la β -catenina a livello dei cluster, piuttosto sono presenti nelle cellule neoplastiche circostanti.

Nella letteratura scientifica β -catenina e marcatori di staminalità sono ampiamente studiati nei CP da un punto di vista etipatogenetico senza, tuttavia, approfondire un potenziale risvolto clinico, ovvero il ruolo che potrebbero assumere nella diagnostica neuropatologica **come marcatori prognostico-predittivi di comportamento biologico aggressivo**. I lavori che affrontano l'argomento sono pochi e, spesso, piuttosto imprecisi. Ad esempio, *Li et al* (66) in uno studio retrospettivo su cinquanta CP correlano l'espressione di membrana della β -catenina con una prognosi sfavorevole, definendo tale pattern di espressione come "aberrante", contrariamente al dato, ormai noto, che l'espressione aberrante della proteina sia quella nucleare; *Cao et al* (67) studiano l'espressione immunohistochimica della β -catenina e di p63 in un gruppo abbastanza esteso di sessantasei CP, comprendenti cinquantuno adaCP e quindici papCP, dimostrando esclusivamente come l'accumulo nucleare della β -catenina sia una caratteristica morfologica esclusiva del sottotipo adamantinomatoso; infine, in un più recente lavoro, *Esheba et al* (68) valutano l'espressione immunohistochimica di un pannello di marcatori comprendenti la β -catenina in uno studio retrospettivo su venticinque CP, tuttavia giungono all'unica conclusione che l'espressione nucleare aberrante della β -catenina sia utile per la diagnosi differenziale tra i due istotipi di CP. Anche in questo lavoro i dati clinici, in particolare quelli relativi al follow-up, sono piuttosto carenti e non emerge alcuna correlazione prognostica.

Due lavori abbastanza recenti, entrambi del 2013, hanno suscitato il nostro interesse per i motivi di seguito riportati. Nel primo (36) *Prieto et al*, descrivendo un caso di adaCP caratterizzato dalla rapida insorgenza di recidiva tumorale a seguito dell'asportazione chirurgica, effettuano una dettagliata review della letteratura riguardo i potenziali fattori predittivi di recidiva neoplastica. In questo lavoro sono stati valutati numerosi fattori: epidemiologici (età e genere dei pazienti);

morfologici, sia macroscopici (dimensioni del tumore, sede, consistenza, aderenze ed invasione delle strutture circostanti) che microscopici (istotipo, presenza di cluster con morfologia “whorl-like”, gliosi reattiva peri-tumorale); immunofenotipici (espressione del Ki-67 L.I. e di p53). La conclusione cui giungono, dopo questa sistematica disamina della letteratura, è che **non esiste un consenso riguardo ai fattori che potrebbero influenzare le recidive tumorali**, tuttavia, gli unici parametri che potrebbero suggerire un più stretto follow-up sono la presenza di una marcata gliosi reattiva, sul piano morfologico e, su quello immunoistochimico, un elevato Ki-67 e un’ aumentata espressione di p53. Da questo lavoro emergono due osservazioni: (I) la mancanza di dati in letteratura sul ruolo prognostico-predittivo della β -catenina e dei marcatori di staminalità nei CP; (II) la mancanza di un valore *cut-off* per il Ki-67 (L.I.) per discriminare le neoplasie a basso da quelle ad alto ritmo proliferativo. Il secondo lavoro, quello già più volte citato di *Holsken et al* (23), consiste nella valutazione dell’espressione dei marcatori di staminalità CD133 e CD44, sia mediante immunoistochimica sia a livello di mRNA mediante real time PCR, su un gruppo di trentatré CP, comprendenti otto papCP e venticinque adaCP, di cui cinque casi di adaCP recidivi; è stata effettuata, inoltre, una correlazione con lo stato mutazionale di CTNNB1 e quindi con l’espressione nucleare aberrante della β -catenina. I risultati ottenuti sono stati **l’espressione prevalente del CD133 negli adaCP e del CD44 nei papCP e la co-espressione, negli adaCP, di entrambi i marcatori di staminalità in cluster di cellule neoplastiche caratterizzati dall’accumulo nucleare della β -catenina**. Gli aspetti importanti di questo lavoro sono i seguenti: (I) per la prima volta è stata osservata l’espressione del CD133 nei CP umani; si tratta di un dato importante in quanto, come noto (69-70) le cellule CD133+ sono meno sensibili alla radioterapia, pertanto l’espressione di tale marker potrebbe essere correlata significativamente all’insorgenza di recidive nei CP; (II) è stata dimostrata l’espressione dei marcatori di staminalità nei cluster di cellule caratterizzati dall’accumulo nucleare di β -catenina, suggerendo la presenza di una “nicchia” di CSC

coinvolte nella patogenesi dei CP; (III) è stato dato un risvolto clinico ponendo attenzione sul dato della recidiva tumorale.

Sulla base di quanto esposto, abbiamo deciso di effettuare **uno studio neuropatologico ed immunoistochimico con correlazioni cliniche su un gruppo selezionato di CP**, con l'obiettivo di **individuare dei potenziali marcatori prognostico-predittivi da utilizzare, mediante metodica immunoistochimica, per identificare *ab initio* i casi di neoplasie biologicamente più aggressive e, quindi, a maggior rischio di recidiva.**

Per raggiungere gli scopi prefissati abbiamo eseguito uno studio retrospettivo su ventisette CP asportati totalmente mediante tecnica endoscopica endonasale, pertanto la radicalità chirurgica ha rappresentato il criterio di inclusione nello studio. I casi sono stati distinti in gruppi sulla base dell'outcome clinico (**presenza o assenza di recidiva tumorale**). Il gruppo dei **CP non recidivi** comprendeva otto casi (4 casi di papCP e 4 casi di adaCP); il gruppo dei **CP recidivi** comprendeva tredici casi (1 caso di papCP, 12 casi di adaCP); per sei dei tredici casi di recidive tumorali (adaCP) è stato possibile analizzare anche i corrispondenti tumori primitivi, costituendo in tal modo il gruppo dei **CP primitivi**. Sono stati pertanto studiati ventisette campioni di CP appartenenti a ventuno pazienti.

Sui casi in studio è stata quindi eseguita una valutazione dell'espressione immunoistochimica della β -catenina, dei marcatori di staminalità CD133 e CD166 e dell'indice di proliferazione (Ki-67). La scelta dei marcatori di staminalità deriva da sia dai dati presenti nella letteratura scientifica (CD166, CD133) sia dalla nostra esperienza (CD166).

Il **CD166**, noto anche come ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule) è una molecola di adesione costituita da una glicoproteina transmembrana appartenente alla superfamiglia delle immunoglobuline (IgCAMs). Svolge un ruolo importante nello sviluppo di differenti tessuti sia

durante l'embriogenesi sia nell'adulto ed è ampiamente espresso in vari tipi di tessuti e di cellule, sia differenziate (neuronal, epiteliali) che staminali (ematopoietiche, mesenchimali) (71, 72). Nella mucosa intestinale, infatti, è stato dimostrato come il CD166 sia espresso a bassi livelli nelle cellule epiteliali superficiali differenziate e ad alti livelli nella nicchia di cellule staminali alla base delle cripte (73). Numerosi studi hanno dimostrato **una stretta correlazione tra il CD166 con diversi tipi di neoplasie**, come melanoma, carcinoma mammario, della prostata e del tratto gastro-enterico, con **differenti risultati in termini di outcome prognostico**: l'overespressione di CD166 è associata con uno stadio clinico avanzato e, quindi, con una prognosi sfavorevole, nel melanoma, nel carcinoma squamoso dell'esofago e nel carcinoma del colon-retto mentre la riduzione o la perdita dell'espressione è correlata con uno stadio clinico avanzato del carcinoma ovarico e mammario. Nel carcinoma della prostata è stata osservata un'aumentata espressione del CD166 nelle lesioni di basso grado e una progressiva perdita nelle lesioni meno differenziate (74-79).

Nonostante i numerosi dati presenti in letteratura, **non sono stati ancora eseguiti studi sull'espressione del CD166 nei CP e sul suo potenziale valore prognostico**, pertanto, anche alla luce della nostra esperienza con l'utilizzo di questo anticorpo in studi non ancora pubblicati sui glioblastomi, abbiamo deciso di utilizzarlo nel nostro lavoro come marcatore di staminalità, per indagare la presenza di cellule staminali tumorali nei CP (adaCP) e, soprattutto il potenziale ruolo prognostico-predittivo. **Siamo stati, pertanto, i primi a studiare l'espressione immunoistochimica del CD166 nei CP.**

Il **CD133**, anche noto come Prominin-1, è una glicoproteina pentamerica transmembrana di 120 kDa, utilizzata per la prima volta per identificare e isolare cellule staminali da tumori cerebrali maligni (80). Il CD133 è un marcatore di staminalità espresso in molteplici tumori solidi, come il carcinoma epatocellulare (81), ovarico (82), del colon-retto (83), dell'esofago (84), della prostata (85) e in diversi tipi di leucemie (86). E' inoltre noto come l'espressione del CD133 sia associata a

una minore risposta alla radioterapia (23, 69-70). Attualmente esiste un unico lavoro, quello del gruppo di *Holsken* (23), in cui è stata studiata l'espressione del CD133 nei CP. Considerando che i CP sono tumori caratterizzati dalla tendenza a recidivare anche in seguito a radioterapia post-operatoria e che l'espressione del CD133 si associa notoriamente ad una minore risposta alla radioterapia (23, 69-70), abbiamo deciso di testare nel nostro lavoro il ruolo di tale marcatore di staminalità come indicatore di outcome prognostico.

In tutti i ventisette casi è stata eseguita la colorazione immunoistochimica con β -catenina; in ventidue casi quella con CD166 e con CD133; l'indice di proliferazione (Ki-67) è stato valutato in venticinque casi.

L'immunoreattività nucleare per la β -catenina e quella di membrana per il CD166 e il CD133 sono state valutate in maniera semiquantitativa, sulla base dell'intensità di colorazione e della proporzione di cellule neoplastiche positive, calcolando uno score d'immunoreattività (score di intensità x score di proporzione); in base al punteggio totale sono stati distinti due livelli di immunoreattività: negativo/basso e moderato/alto. Per il Ki-67 (indice di proliferazione) abbiamo stabilito come *cut-off* un valore del 5% per discriminare tra i casi ad alto rispetto a quelli a basso ritmo proliferativo (Ki-67>5%=alto ritmo proliferativo).

Dei ventuno casi, complessivamente di CP recidivi e non recidivi, otto casi hanno mostrato un livello d'immunoreattività moderato/alto per la **β -catenina** (tutti adaCP recidivi), tredici casi negativo/basso (4 adaCP recidivi; 4 adaCP non recidivi; 1 papCP recidivo; 4 papCP non recidivi). Va specificato che, come atteso, in tutti i casi di papCP l'immunoreattività era solo di membrana (score 0), senza espressione nucleare aberrante (**figure 6, 7**).

In diciassette dei ventuno casi, complessivamente di CP recidivi e non recidivi, sono state eseguite le immunocolorazioni con **CD166** e **CD133**. Per quattro casi (adaCP recidivi) non è stato possibile

eseguire l'indagine immunohistochimica per esaurimento del materiale diagnostico. Per il **CD166** abbiamo ottenuto i seguenti risultati: sette casi con livello d'immunoreattività moderato/alto (6 adaCP recidivi; 1 papCP non recidivo); dieci casi livello negativo/basso (2 adaCP recidivi; 1 papCP recidivo; 4 adaCP non recidivi; 3 papCP non recidivi) (**figure 8, 9**). Per il **CD133** abbiamo ottenuto i seguenti risultati: cinque casi con livello d'immunoreattività moderato/alto (2 adaCP recidivi; 3 papCP non recidivi); undici casi con livello negativo/basso (6 adaCP recidivi; 1 papCP recidivo; 1 papCP non recidivo; 3 adaCP non recidivi) (**figura 10**). In un unico caso (adaCP non recidivo) l'immunocolorazione non è risultata valutabile.

In diciannove dei ventuno casi complessivi di CP recidivi e non recidivi, è stato valutato **l'indice di proliferazione (Ki-67)**, con i risultati di seguito riportati: undici casi ad alto ritmo proliferativo (9 adaCP recidivi; 2 papCP non recidivi); otto casi a basso ritmo proliferativo (2 adaCP recidivi; 2 papCP non recidivi; 4 adaCP non recidivi). Per due casi (1 adaCP recidivo ed 1 papCP recidivo) non è stato possibile effettuare l'indagine immunohistochimica per esaurimento del materiale diagnostico.

I sei casi di CP primitivi hanno mostrato risultati completamente sovrapponibili ai corrispondenti tumori recidivi per tutti i marcatori valutati (in un unico caso non sono state eseguite immunocolorazioni per CD166 e CD133 per mancanza di materiale diagnostico).

Riassumendo, abbiamo osservato una **maggiore espressione sia della β -catenina che del CD166, con i maggiori livelli di immunoreattività, negli adaCP che hanno dato recidiva (tumori primitivi) e ed in quelli recidivi**, mentre l'espressione di tali marcatori era bassa o del tutto assente nei CP che non hanno dato recidiva. Parimenti, abbiamo riscontrato **valori di Ki-67 più alti negli adaCP che hanno dato recidiva e in quelli recidivi**, rispetto al gruppo dei tumori non recidivi. Non abbiamo osservato una demarcazione altrettanto netta dei risultati per quanto riguarda l'espressione del CD133 e il dato clinico della recidiva tumorale, poiché i casi in studio hanno

mostrato un'espressione immunoistochimica più eterogenea di tale marcatore. Contrariamente alle attese e a quanto già riportato in letteratura (23) abbiamo osservato **una maggiore immunoreattività per il CD133 nei papCP** (3 casi di papCP non recidivo su 5 casi complessivi di papCP della nostra casistica hanno mostrato espressione del CD133 con un livello di immunoreattività moderato/alto) rispetto agli adaCP recidivi.

Per quanto riguarda il **pattern d'immunoreattività**, abbiamo osservato l'espressione nucleare della β -catenina principalmente in cluster di cellule neoplastiche, frequentemente con la caratteristica morfologia "whorl-like", spesso presenti sul fronte d'invasione tumorale e nelle aree di chiara infiltrazione del parenchima cerebrale (**figura 7**). L'espressione del marcatore di staminalità CD166, appare invece più eterogenea nel contesto della neoplasia, ovvero non sembra essere prevalente nei cluster quanto piuttosto nelle cellule neoplastiche circostanti (**figura 9**). Tale pattern di distribuzione è simile a quello osservato per altri noti marcatori di staminalità (SOX2, CD44, nestina) differendo, invece, da quello descritto per il CD133 (23). Anche l'indice di proliferazione (Ki-67) non appare espresso a livello dei cluster.

Come più volte ribadito, la rilevanza del nostro lavoro è data dalla **correlazione tra il dato morfologico e immunoistochimico con quello clinico**, ovvero con la presenza/assenza di recidive tumorali. Abbiamo pertanto eseguito un'analisi statistica dei risultati ottenuti con indagine immunoistochimica, rapportandoli al dato clinico della presenza di recidiva tumorale. Con il **test di Fisher** abbiamo riscontrato una correlazione statisticamente significativa tra l'insorgenza di recidiva tumorale ed un livello di immunoreattività moderato/alto della β -catenina, del CD166 e con un alto indice di proliferazione (Ki-67>5%). Non abbiamo riscontrato una correlazione statisticamente significativa tra l'espressione di CD133 e presenza di recidiva. Con il **test di correlazione di Spearman**, inoltre, abbiamo riscontrato una correlazione statisticamente significativa tra l'espressione della β -catenina e del Ki-67 e tra quella della β -catenina e del CD166.

Non abbiamo riscontrato una correlazione statisticamente significativa tra CD166 e Ki-67 e tra β -catenina e CD133.

VI. Conclusioni

Dai risultati del nostro lavoro emerge che i CP, in particolare gli adaCP recidivi e i corrispondenti tumori primitivi, sono caratterizzati da:

- Presenza di cluster di cellule neoplastiche, spesso con morfologia “whorl-like”, caratterizzati da alti livelli d’immunoreattività nucleare per la β -catenina;
- Alti livelli d’immunoreattività di membrana per il marcatore di staminalità CD166, la cui espressione non si osserva nei cluster, piuttosto nelle cellule neoplastiche circostanti, con un pattern di distribuzione simile a quello descritto per altri marcatori di staminalità (SOX2, CD44, nestina) (23);
- Livelli di espressione del marcatore di staminalità CD133 eterogenei;
- Alto indice di proliferazione valutato mediante Ki-67 (>5%), la cui espressione non si osserva nei cluster ma appare più eterogeneamente distribuita nel contesto della neoplasia.

Pertanto, alla luce di un’attenta valutazione morfologica ed immunoistochimica, possiamo concludere che:

- Nei CP, soprattutto negli adaCP con tendenza alla recidiva ed in quelli recidivi, è presente una nicchia di cellule tumorali a fenotipo staminale; tali cellule potrebbero essere coinvolte nella patogenesi di queste neoplasie e svolgere un ruolo importante nell’insorgenza delle recidive tumorali;
- β -catenina, Ki-67 e CD166 possono essere considerati degli efficaci **marcatori prognostico-predittivi di comportamento biologico più aggressivo dei CP, in particolare degli adaCP.**

L'aumentata espressione del CD133 nei papCP è un dato che va approfondito, considerando i pochi casi di papCP della nostra casistica, la presenza di un unico lavoro a riguardo nella letteratura (23) ed il potenziale ruolo predittivo di risposta alla radioterapia di tale marcatore.

In conclusione, possiamo suggerire di adoperare nella diagnostica neuropatologica un **pannello di marcatori immunoistochimici comprendente β -catenina, Ki-67 e CD166, per poter identificare *ab initio* i casi di neoplasie ad outcome prognostico sfavorevole e, pertanto, a maggior rischio di recidiva**. Per la valutazione dell'espressione della β -catenina e del CD166 è utile l'applicazione di uno score d'immunoreattività che consideri l'intensità e la proporzione delle cellule neoplastiche positive; per il Ki-67 proponiamo un valore *cut-off* del 5% per distinguere le neoplasie a basso da quelle ad alto ritmo proliferativo.

Affiancare la diagnosi morfologica di CP con la valutazione immunoistochimica di marcatori prognostico-predittivi di comportamento biologico aggressivo potrebbe consentire di modificare il management terapeutico dei pazienti attraverso l'impiego di trattamenti aggiuntivi post-operatori per ridurre l'insorgenza di recidive a lungo termine.

VII. Bibliografia

1. Asa S L. *Tumors of the Pituitary Gland*. AFIP Atlas of Tumor Pathology, Third Series 2011 (1st ed).
2. Müller HL. *Craniopharyngioma*. *Endocr Rev*. 2014;35(3):513-43.
3. Louis DN, Ohgaki H, Wistler OD, Cavenee WK. *WHO classification of tumours of the central nervous system*. Lyon: IARC; 2007.
4. Kolen ER, Horvai A, Perry V, Gupta N. *Congenital craniopharyngioma: a role for imaging in the prenatal diagnosis and treatment of an uncommon tumor*. *Fetal Diagn Ther*. 2003;18:270-274.
5. Scagliotti V, Avagliano L, Gualtieri A, Graziola F, Doi P, Chalker J, Righini A, Korbonits M, Bulfamante G, Jacques TS, Massa V, Gaston-Massuet C. *Histopathology and molecular characterisation of intrauterine-diagnosed congenital craniopharyngioma*. *Pituitary*. 2016;19:50-56.
6. Harwood-Nash DC. *Neuroimaging of childhood craniopharyngioma*. *Pediatr Neurosurg*. 1994;21 Suppl 1:2-10.
7. Karavitaki N, B.C., Warner JT, Adams CBT, Richards P, Ansorge O, Shine B. *Craniopharyngiomas in children and adults: systematic analysis of 121 cases with long-term follow-up*. *Clin Endocrinol*. 2005;62(4):397-409.
8. Lewin R, Ruffolo E, Saraceno C. *Craniopharyngioma arising in the pharyngeal hypophysis*. *South Med J* 1984;77:1519-1523.
9. Koral K, Weprin B, Rollins NK. *Sphenoid sinus craniopharyngioma simulating mucocele*. *Acta Radiol*. 2006;47: 494-496.
10. Yasargil MG, Curcic M, Kis M, Siegenthaler G, Teddy PJ, Roth P. *Total removal of craniopharyngiomas. Approaches and long-term results in 144 patients*. *J Neurosurg*. 1990;73:3-11.
11. Cusimano MD, Kovacs K, Bilbao JM, Tucker WS, Singer W. *Suprasellar craniopharyngioma associated with hyperprolactinemia, pituitary lactotroph hyperplasia, and microprolactinoma. Case report*. *J Neurosurg*. 1988;69(4):620-3.
12. Wheatley T, Clark JD, Stewart S. *Craniopharyngioma with hyperprolactinaemia due to a prolactinoma*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1986;49(11):1305-7.
13. Yoshida A, Sen C, Asa SL, Rosenblum MK. *Composite pituitary adenoma and craniopharyngioma? An unusual sellar neoplasm with divergent differentiation*. *Am J Surg Pathol*. 2008;32(11):1736-41.
14. Puchner MJ, Lüdecke DK, Saeger W. *The anterior pituitary lobe in patients with cystic craniopharyngiomas: three cases of associated lymphocytic hypophysitis*. *Acta Neurochir*. 1994;126(1):38-43.
15. Liu A, Wang JM, Li GL, Sun YL, Sun SB, Luo B, Wang MH. *Clinical and pathological analysis of benign brain tumors resected after Gamma Knife surgery*. *J Neurosurg*. 2014;121 Suppl:179-87.
16. Mortini P, Gagliardi F, Bailo M, Spina A, Parlangei A, Falini A, Losa M. *Magnetic resonance imaging as predictor of functional outcome in craniopharyngiomas*. *Endocrine*. 2016;51(1):148-62.
17. Pusey E, K.K., Flannigan B, Tsuruda J, Bradley WG MR. *MR of craniopharyngiomas: tumor delineation and characterization*. *AJR Am J Roentgenol*. 1987;149(2):383-8.
18. Sato K, Kubota T. *Fine structure of ossification in craniopharyngiomas*. *Ultrastruct Pathol*. 1999;23:395-399.

19. Xin W, Rubin MA, McKeever PE. *Differential expression of cytokeratins 8 and 20 distinguishes craniopharyngioma from Rathke cleft cyst.* Arch Pathol Lab Med. 2002;126(10):1174-8.
20. Clark AJ, Cage TA, Aranda D, Parsa AT, Auguste KI, Gupta N. *Treatment-related morbidity and the management of pediatric craniopharyngioma: a systematic review.* J Neurosurg Pediatr. 2012;10(4):293–301.
21. Hofmann BM, Hollig A, Strauss C, Buslei R, Buchfelder M, Fahlbusch R. *Results after treatment of craniopharyngiomas: further experiences with 73 patients since 1997.* J Neurosurg. 2012;116(2):373–384.
22. Clark AJ, Cage TA, Aranda D, Parsa AT, Sun PP, Auguste KI, Gupta N. *A systematic review of the results of surgery and radiotherapy on tumor control for pediatric craniopharyngioma.* Child's Nerv Syst ChNS Off J Int Soc Pediatr Neurosurg. 2013; 29(2):231–238.
23. Hölsken A, Stache C, Schläpfer SM, Flitsch J, Fahlbusch R, Buchfelder M, Buslei R. *Adamantinomatous craniopharyngiomas express tumor stem cell markers in cells with activated Wnt signaling: further evidence for the existence of a tumor stem cell niche?* Pituitary. 2014;17(6):546-56.
24. Cavallo LM, Solari D, Esposito F, Villa A, Minniti G, Cappabianca P. *The role of the endoscopic endonasal route in the management of craniopharyngiomas.* World Neurosurg. 2014;82(6 Suppl):S32-40.
25. Buchfelder M, Schläpfer SM, Lin F, Kleindienst A. *Surgery for craniopharyngioma.* Pituitary. 2013;16:18 –25.
26. Elliott RE, Jane JA Jr, Wisoff JH. *Surgical management of craniopharyngiomas in children: meta-analysis and comparison of transcranial and transsphenoidal approaches.* Neurosurgery. 2011;69(3):630-43;
27. Karavitaki N. *Management of craniopharyngiomas.* J Endocrinol Invest. 2014;37(3):219-28.
28. Combs SE, Thilmann C, Huber PE, Hoess A, Debus J, Schulz-Ertner D. *Achievement of long-term local control in patients with craniopharyngiomas using high precision stereotactic radiotherapy.* Cancer. 2007;109:2308 -2314.
29. Kanesaka N, Mikami R, Nakayama H, Nogi S, Tajima Y, Nakajima N, Wada J, Miki T, Haraoka J, Okubo M, Sugahara S, Tokuyue K. *Preliminary results of fractionated stereotactic radiotherapy after cyst drainage for craniopharyngioma in adults.* Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2012;82:1356 –1360.
30. Minniti G, Esposito V, Amichetti M, Enrici RM. *The role of fractionated radiotherapy and radiosurgery in the management of patients with craniopharyngioma.* Neurosurg Rev. 2009;32(2):125-32.
31. Winkfield KM, Linsenmeier C, Yock TI, Grant PE, Yeap BY, Butler WE, Tarbell NJ. *Surveillance of craniopharyngioma cyst growth in children treated with proton radiotherapy.* Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2009;73:716 –721.
32. Regine WF, Mohiuddin M, Kramer S. *Long-term results of pediatric and adult craniopharyngiomas treated with combined surgery and radiation.* Radiother Oncol. 1993;27: 13–21.
33. Frangou EM, Tynan JR, Robinson CA, Ogieglo LM, Vitali AM. *Metastatic craniopharyngioma: case report and literature review.* Childs Nerv Syst. 2009;25(9):1143-7.
34. Gupta K, Kuhn MJ, Shevlin DW, Wacaser LE. *Metastatic craniopharyngioma.* AJNR Am J Neuroradiol. 1999;20(6):1059-60.
35. Petito CK, De Girolami U, Earle KM. *Craniopharyngiomas: a clinical and pathological review.* Cancer. 1976;37:1944 –1952.
36. Prieto R, Pascual JM, Subhi-Issa I, Jorquera M, Yus M, Martínez R. *Predictive factors for*

- craniopharyngioma recurrence: a systematic review and illustrative case report of a rapid recurrence*. World Neurosurg. 2013;79(5-6):733-49.
37. Sartoretti-Schefer S, Wichmann W, Aguzzi A, Valavanis A. *MR differentiation of adamantinous and squamous-papillary craniopharyngiomas*. AJNR Am J Neuroradiol. 1997;18:77–87.
 38. Sato K, Oka H, Utsuki S, Kondo K, Kurata A, Fujii K. *Ciliated craniopharyngioma may arise from Rathke cleft cyst*. Clin Neuropathol. 2006;25:25–28.
 39. Powers CJ, New KC, McLendon RE, Friedman AH, Fuchs HE. *Cerebellopontine angle craniopharyngioma: case re- port and literature review*. Pediatr Neurosurg. 2007;43: 158 – 163.
 40. Martinez-Barbera JP. Invited review: *Molecular and cellular pathogenesis of adamantinomatous craniopharyngioma*. Neuropathol Appl Neurobiol. 2015;41(6):721-32.
 41. Clevers H, Nusse R. *Wnt/ β -catenin signaling and disease*. Cell. 2012;149: 1192–205.
 42. Huelsken J, Birchmeier W. *New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates*. Curr Opin Genet Dev. 2001;11: 547–53.
 43. Bejsovec A. *Wnt signaling: an embarrassment of receptors*. Curr Biol. 2000;14-28;10(24):R919-22
 44. Buslei R, Nolde M, Hofmann B, Meissner S, Eyupoglu IY, Siebzehnrübl F, Hahnen E, Kreutzer J, Fahlbusch R. *Common mutations of beta-catenin in adamantinomatous craniopharyngiomas but not in other tumours originating from the sellar region*. Acta Neuropathol. 2005;109(6):589-97.
 45. Städeli R, Hoffmans R, Basler K. *Transcription under the control of nuclear Arm/ β -catenin*. Curr Biol. 2006;16(10):R378-85.
 46. Brinkmeier ML, Potok MA, Cha KB, Gridley T, Stifani S, Meeldijk J, Clevers H, Camper SA. *TCF and Groucho- related genes influence pituitary growth and development*. Mol Endocrinol. 2003;17:2152–61.
 47. Zhang Z, Florez S, Gutierrez-Hartmann A, Martin JF, Amendt BA. *MicroRNAs regulate pituitary development, and microRNA 26b specifically targets lymphoid enhancer factor 1 (Lef-1), which modulates pituitary transcription factor 1 (Pit-1) expression*. J Biol Chem. 2010;285:34718–28.
 48. Harada N, Tamai Y, Ishikawa T, Sauer B, Takaku K, Oshima M, Taketo MM, Miyoshi H, Murai N, Oshima H. *Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene*. EMBO J. 1999; 18:5931–42.
 49. Gaston-Massuet C, Andoniadou CL, Signore M, Jayakody SA, Charolidi N, Kyeyune R, Vernay B, Jacques TS, Taketo MM, Le Tissier P, Dattani MT, Martinez-Barbera JP. *Increased Wntless (Wnt) signaling in pituitary progenitor/stem cells gives rise to pituitary tumors in mice and humans*. Proc Natl Acad Sci. 2011;108: 11482–7.
 50. Sekine S, Shibata T, Kokubu A, Morishita Y, Noguchi M, Nakanishi Y, Sakamoto M, Hirohashi S. *Craniopharyngiomas of adamantinomatous type harbor beta-catenin gene mutations*. Am J Pathol. 2002;161: 1997–2001.
 51. Buslei R, Nolde M, Hofmann B, Meissner S, Eyupoglu IY, Siebzehnrübl F, Hahnen E, Kreutzer J, Fahlbusch R. *Common mutations of beta-catenin in adamantinomatous craniopharyngiomas but not in other tumours originating from the sellar region*. Acta Neuropathol. 2005;109:589–97.
 52. Oikonomou E, Barreto DC, Soares B, De Marco L, Buchfelder M, Adams EF. *Beta-catenin mutations in craniopharyngiomas and pituitary adenomas*. J Neurooncol. 2005;73:205–9.
 53. Andoniadou CL, Gaston-Massuet C, Reddy R, Schneider RP, Blasco MA, Le Tissier P, Jacques TS, Pevny LH, Dattani MT, Martinez-Barbera JP. *Identification of novel pathways involved in*

- the pathogenesis of human adamantinomatous craniopharyngioma. Acta Neuropathol.* 2012;124:259–271.
54. Larkin SJ, Ansorge O. *Pathology and pathogenesis of craniopharyngiomas. Pituitary.* 2013;16:9–17.
 55. Clevers H, Nusse R. *Wnt/beta-catenin signaling and disease. Cell.* 2012;149:1192–205.
 56. Van Amerongen R, Bowman AN, Nusse R. *Developmental stage and time dictate the fate of Wnt/beta-catenin-responsive stem cells in the mammary gland. Cell Stem Cell.* 2012;11:387–400.
 57. Andoniadou CL, Matsushima D, Mousavy Gharavy SN, Signore M, Mackintosh AI, Schaeffer M, Gaston-Massuet C, Mollard P, Jacques TS, Le Tissier P, Dattani MT, Pevny LH, Martinez-Barbera JP. *Sox2(+) stem/progenitor cells in the adult mouse pituitary support organ homeostasis and have tumor-inducing potential. Cell Stem Cell.* 2013;13:433–45.
 58. Rizzoti K, Akiyama H, Lovell-Badge R. *Mobilized adult pituitary stem cells contribute to endocrine regeneration in response to physiological demand. Cell Stem Cell.* 2013;13: 419–32.
 59. Garcia-Lavandeira M, Quereda V, Flores I, Saez C, Diaz-Rodriguez E, Japon MA, Ryan AK, Blasco MA, Dieguez C, Malumbres M, Alvarez CV. *A GRFa2/Prop1/ stem (GPS) cell niche in the pituitary. PLoS ONE.* 2009;4:e4815.
 60. Nuciforo PG, Frassetta F. *Cancer stem cells: the neoplastic disease from a different view point. Pathologica.* 2005;97:73-77.
 61. Holsken A, Kreutzer J, Hofmann BM, Hans V, Oppel F, Buchfelder M, Fahlbusch R, Blumcke I, Buslei R. *Target gene activation of the Wnt signaling pathway in nuclear beta-catenin accumulating cells of adamantinomatous craniopharyngiomas. Brain Pathol.* 2009;19: 357–64.
 62. Gong J, Zhang H, Xing S, Li C, Ma Z, Jia G, Hu W. *High expression levels of CXCL12 and CXCR4 predict recurrence of adamantinomatous craniopharyngiomas in children. Cancer Biomark.* 2014;14:241–51.
 63. Marucci G, de Biase D, Zoli M, Faustini-Fustini M, Bacci A, Pasquini E, Visani M, Mazzatenta D, Frank G, Tallini G. *Targeted BRAF and CTNNB1 next-generation sequencing allows proper classification of nonadenomatous lesions of the sellar region in samples with limiting amounts of lesional cells. Pituitary.* 2015;18(6):905-11.
 64. Ofori-Acquah SF, King JA. *Activated leukocyte cell adhesion molecule: a new paradox in cancer. Transl Res.* 2008;151(3):122-8.
 65. Liu LK, Jiang XY, Zhou XX, Wang DM, Song XL, Jiang HB. *Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/β-catenin complex in oral squamous carcinoma: correlation with clinicopathological features and patient outcome. Mod. Pathol.* 2009; 23; 213-224.
 66. Li Z, Xu J, Huang S, You C. *Aberrant membranous expression of β-catenin predicts poor prognosis in patients with craniopharyngioma. Ann Diagn Pathol.* 2015;19(6):403-8.
 67. Cao J, Lin JP, Yang LX, Chen K, Huang ZS. *Expression of aberrant beta-catenin and impaired p63 in craniopharyngiomas. Br J Neurosurg.* 2010;24(3):249-56.
 68. Esheba GE, Hassan AA. *Comparative immunohistochemical expression of β-catenin, EGFR, ErbB2, and p63 in adamantinomatous and papillary craniopharyngiomas. J Egypt Natl Canc Inst.* 2015;27(3):139-45.
 69. Baumann M, Krause M, Hill R. *Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. Nat Rev Cancer.* 2008;8(7):545–554.
 70. Moncharmont C, Levy A, Gilormini M, Bertrand G, Chargari C, Alphonse G, Ardail D, Rodriguez-Lafrasse C, Magne N. *Targeting a cornerstone of radiation resistance: cancer*

- stem cell*. Cancer Lett. 2012;322(2):139–147.
71. Weidle UH, Eggle D, Klostermann S, Swart GW. *ALCAM/CD166: cancer-related issues*. Cancer Genomics Proteomics. 2010;7(5):231–43.
 72. Swart, GW. *Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration*. Eur J Cell Biol. 2002;81(6):313–21.
 73. Levin TG, Powell AE, Davies PS, Silk AD, Dismuke AD, Anderson EC, Swain JR, Wong MH. *Characterization of the intestinal cancer stem cell marker CD166 in the human and mouse gastrointestinal tract*. Gastroenterology. 2010 139:2072–2082.
 74. Burkhardt M, Mayordomo E, Winzer KJ, Fritzsche F, Gansukh T, Pahl S, Weichert W, Denkert C, Guski H, Dietel M, Kristiansen G. *Cytoplasmic overexpression of ALCAM is prognostic of disease progression in breast cancer*. J Clin Pathol. 2006;59(4):403–9.
 75. Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, Stephan C, Weissbach L, Loy V, et al. *ALCAM/CD166 is up-regulated in low-grade prostate cancer and progressively lost in high-grade lesions*. Prostate. 2003;54(1):34–43.
 76. Rosso O, Piazza T, Bongarzone I, Rossello A, Mezzanzanica D, Canevari S, Orenco AM, Puppo A, Ferrini S, Fabbi M. *The ALCAM shedding by the metalloprotease ADAM17/TACE is involved in motility of ovarian carcinoma cells*. Mol Cancer Res. 2007;5(12):1246–53.
 77. Weichert W, Knosel T, Bellach J, Dietel M, Kristiansen G. *ALCAM/CD166 is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival*. J Clin Pathol. 2004;57(11):1160–4.
 78. Nair KS, Naidoo R, Chetty R. *Expression of cell adhesion molecules in oesophageal carcinoma and its prognostic value*. J Clin Pathol. 2005;58(4):343–51.
 79. Donizy P, Zietek M, Halon A, Leskiewicz M, Kozyra C, Matkowski R. *Prognostic significance of ALCAM (CD166/MEMD) expression in cutaneous melanoma patients*. Diagn Pathol. 2015;10:86.
 80. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. *Identification of a cancer stem cell in human brain tumors*. Cancer Res. 2003;63(18):5821–8.
 81. Bodzin AS, Wei Z, Hurtt R, Gu T, Doria C. *Gefitinib resistance in HCC Mahlavu cells: Upregulation of CD133 expression, activation of IGF-1R signaling pathway, and enhancement of IGF-1R nuclear translocation*. J Cell Physiol. 2012; 227(7):2947–52.
 82. Ferrandina G, Bonanno G, Pierelli L, Perillo A, Procoli A, Mariotti A, Corallo M, Martinelli E, Rutella S, Paglia A, Zannoni G, Mancuso S, Scambia G. *Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer*. Int J Gynecol Cancer. 2008;18: 506–514.
 83. Kojima M, Ishii G, Atsumi N, Fujii S, Saito N and Ochiai A. *Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: A clinicopathological study*. Cancer Sci. 2008; 99(8):1578–83.
 84. Hang D, Dong HC, Ning T, Dong B, Hou DL and Xu WG. *Prognostic value of the stem cell markers CD133 and ABCG2 expression in esophageal squamous cell carcinoma*. Dis Esophagus. 2012;25: 638–644.
 85. Richardson GD, Robson CN, Lang SH, Neal DE, Maitland NJ, Collins AT. *CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells*. J Cell Sci. 2004;117(Pt 16):3539–45.
 86. Bhatia M. *AC133 expression in human stem cells*. Leukemia. 2001;15(11):1685–8.

VIII. Iconografia

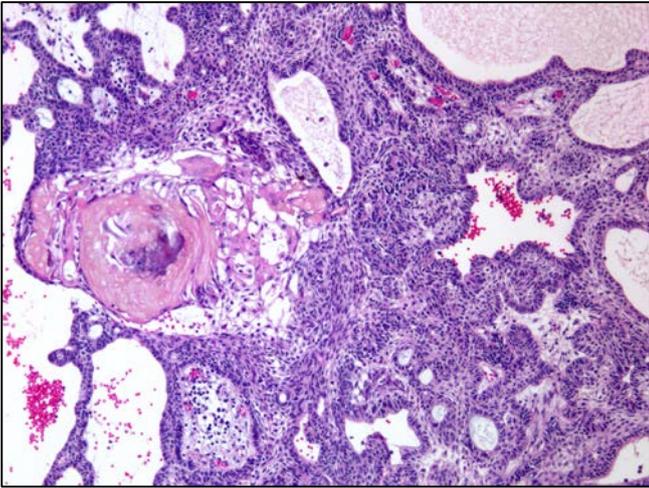


Figura 1. AdaCP: nidi, cordoni e irregolari trabecole di cellule epiteliali squamose raggruppate in lobuli frammentati a noduli di "wet keratin" (E/E, 10x.)

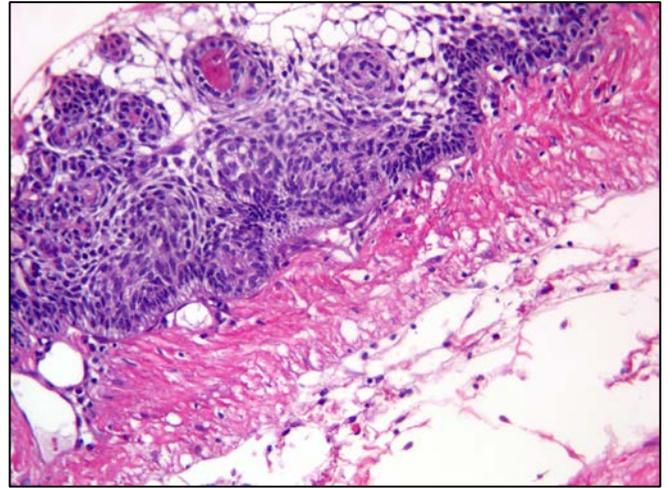


Figura 2. AdaCP: cluster di cellule neoplastiche con morfologia "whorl-like", localizzati sul fronte d'invasione tumorale. Notare la presenza di fibre di Rosenthal (E/E, 20x).

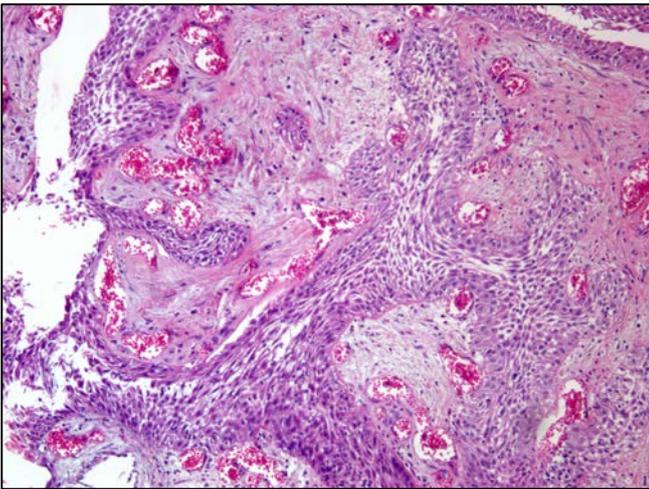


Figura 3. PapCP: proliferazione monomorfa di cellule epiteliali squamose ben differenziate arrangiate in papille o lasse pseudopapille intorno ad un core fibrovascolare (E/E, 10x).

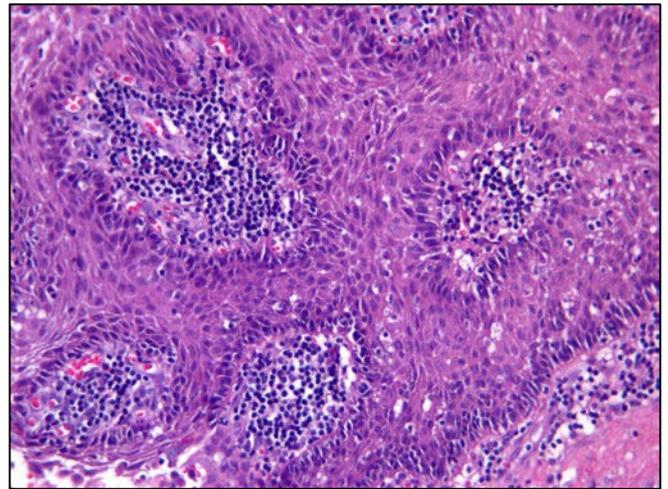


Figura 4. PapCP: infiltrato infiammatorio cronico nell'asse delle papille (E/E, 20x).

caso	Istologia	Ki-67 L.I.	β -catenina score (I x P)	CD166 score (I x P)	CD133 score (I x P)
1	papCP	5%	0	4 (2x2)	4 (2x2)
2	papCP	6%	0	2 (1x2)	6 (3x2)
3	papCP	4%	0	2 (1x2)	4 (2x2)
4	papCP	15%	0	2 (1x2)	0
5	adaCP	2%	0	0	0
6	adaCP	3%	0	2 (2x1)	0
7	adaCP	3%	2 (1x2)	0	1
8	adaCP	2%	0	0	nv

Tabella 1. CP NON RECIDIVI: score di immunoreattività per β -catenina, CD166, CD133 ed indice di proliferazione (Ki-67). β -catenina, CD166, CD133: score d'immunoreattività=score di intensità (I) x score di proporzione (P). Livelli di immunoreattività: score 0-2 livello negativo/basso; score >2 livello moderato alto. Ki-67: >5% alto ritmo proliferativo. **nv**: colorazione non valutabile.

caso	istologia	Ki-67 L.I.	β -catenina score (IxP)	CD166 score (IxP)	CD133 score (IxP)
1	adaCP	10%	4 (2x2)	6 (3x2)	0
2	adaCP	10%	3 (1x3)	4 (2x2)	0
3	adaCP	2%	2 (1x2)	1	1
4	adaCP	15%	4 (2x2)	x	x
5	adaCP	15%	0	2 (1x2)	0
6	adaCP	15%	6 (3x2)	x	x
7	adaCP	6%	4 (2x2)	x	x
8	adaCP	15%	6 (2x3)	6 (3x2)	2 (2x1)
9	adaCP	5%	2 (1x2)	6 (3x2)	4 (2x2)
10	adaCP	25%	9 (3x3)	4 (2x2)	4 (2x2)
11	adaCP	x	2 (1x2)	x	x
12	adaCP	7%	4 (2x2)	3 (3x1)	2 (2x1)
13	papCP	x	0	2 (1x2)	0

Tabella 2. CP RECIDIVI: score di immunoreattività per β -catenina, CD166, CD133 ed indice di proliferazione (Ki-67). β -catenina, CD166, CD133: score d'immunoreattività=score di intensità (I) x score di proporzione (P). Livelli di immunoreattività: score 0-2 livello negativo/basso; score >2 livello moderato alto. Ki-67: >5% alto ritmo proliferativo. x: colorazione non eseguita per esaurimento del materiale.

caso	Istologia	Ki-67 L.I.	β -catenina score (IxP)	CD166 score (IxP)	CD133 score (IxP)
1	adaCP	10%	4 (2x2)	6 (3x2)	0
2	adaCP	20%	4 (2x2)	4 (2x2)	0
3	adaCP	2%	2 (1x2)	1	0
4	adaCP	10%	4 (2x2)	3 (3x1)	nv
5	adaCP	15%	0	1	0
6	adaCP	15%	3 (3x1)	x	x

Tabella 3. CP PRIMITIVI score di immunoreattività per β -catenina, CD166, CD133 ed indice di proliferazione (Ki-67). β -catenina, CD166, CD133: score d'immunoreattività=score di intensità (I) x score di proporzione (P). Livelli di immunoreattività: score 0-2 livello negativo/basso; score >2 livello moderato alto. Ki-67: >5% alto ritmo proliferativo. x: colorazione non eseguita per esaurimento del materiale; nv: colorazione non valutabile. **NB:** i corrispondenti tumori recidivi sono i casi 1-6 della tabella 2.

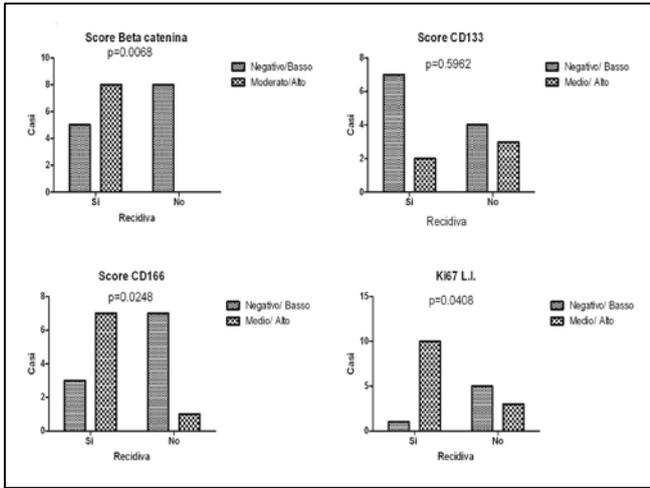


Figura 5. Correlazione statistica valutata mediante test di Fisher tra l'espressione immunohistochemica di β -catenina, CD133, CD166 e Ki-67 e l'insorgenza di recidiva tumorale.

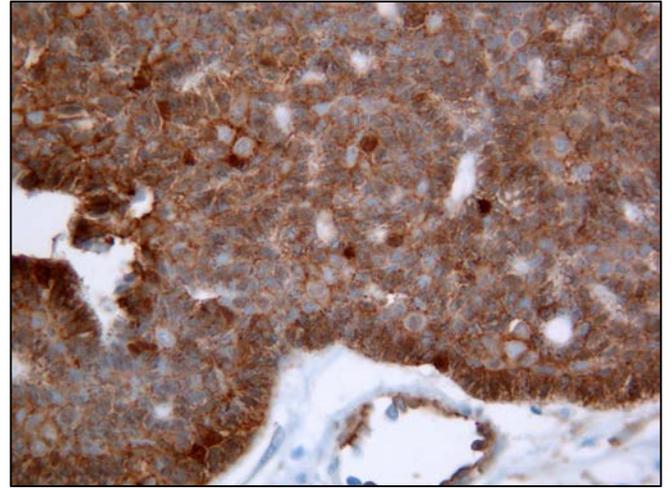


Figura 6. Colorazione immunohistochemica per β -catenina: livello di immunoreattività negativo/basso in adaCP non recidivo (score totale=2).

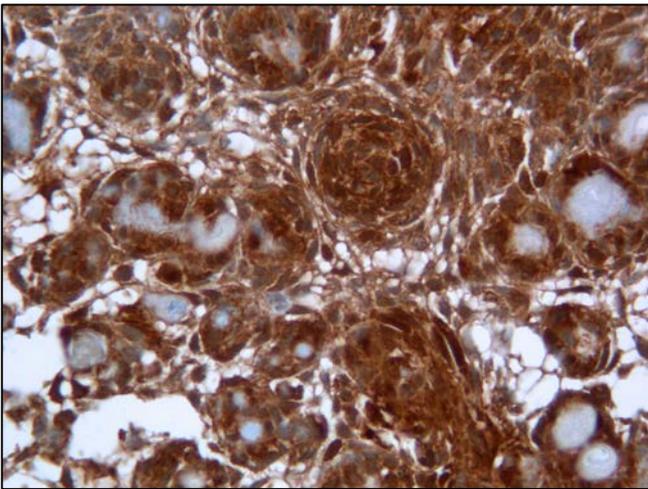


Figura 7. Colorazione immunohistochemica per β -catenina: livello di immunoreattività moderato/alto in adaCP recidivo (score totale=9). Notare l'intensa positività in cluster "whorl-like".

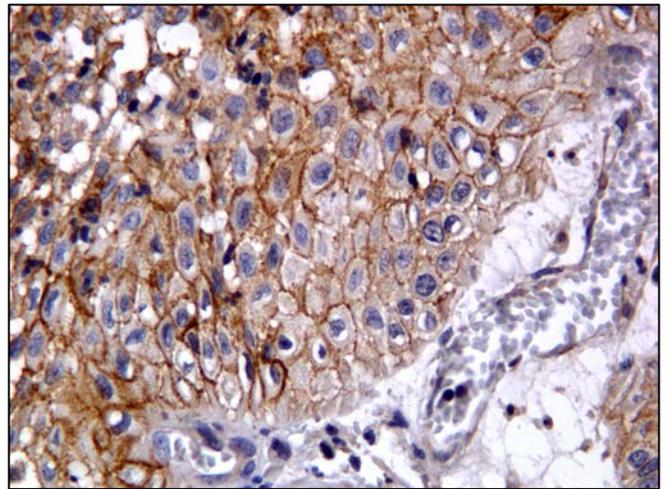


Figura 8. Colorazione immunohistochemica per CD166: livello di immunoreattività negativo/basso in adaCP non recidivo (score totale=2).

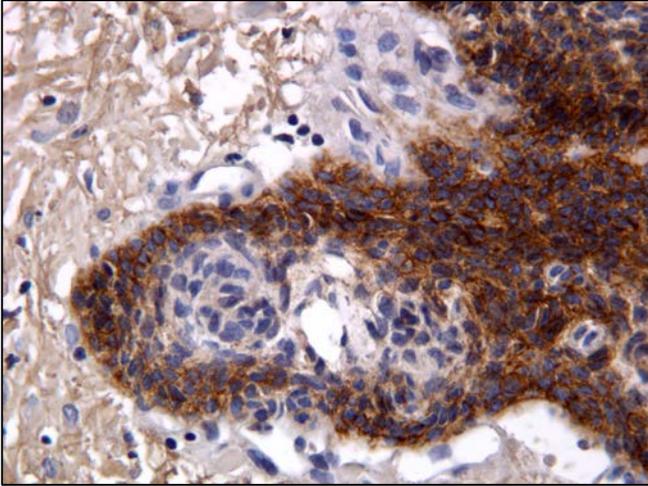


Figura 9. Colorazione immunoistochimica per CD166: livello di immunoreattività moderato/alto in adaCP recidivo. Cluster di cellule neoplastiche sul fronte di invasione tumorale, notare la positività del CD166 nelle cellule presenti alla periferia del cluster.

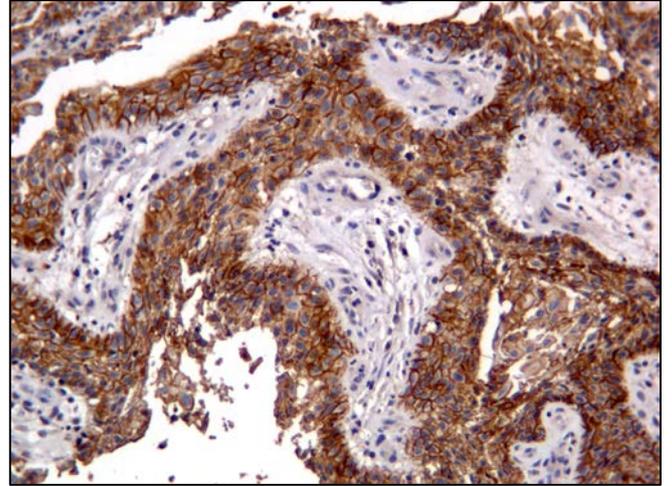


Figura 10. Colorazione immunoistochimica per CD133: livello di immunoreattività moderato/alto in papCP non recidivo (score totale=6).