



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di NEUROSCIENZE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Scienze Mediche, Cliniche e Sperimentali

INDIRIZZO: Neuroscienze

CICLO XXVII

MICROPARTICELLE PLASMATICHE NEI PAZIENTI AFFETTI DA GLIOBLASTOMA: RUOLO NELLO SVILUPPO DELLE COMPLICANZE TROMBOEMBOLICHE VENOSE E POTENZIALE UTILIZZO COME MARCATORI DI PROGRESSIONE NEOPLASTICA

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Gaetano Thiene

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Elena Pegoraro

Supervisore: Ch.mo Prof. Domenico d'Avella

Dottorando : Pietro Ciccarino

RIASSUNTO

Presupposti dello studio: Il decorso dei pazienti affetti del glioblastoma è gravato da una prognosi infausta. Inoltre, l'alterato assetto coagulativo che si associa a questa neoplasia e le possibili complicanze di natura tromboembolica (TEV) possono peggiorarne sensibilmente la prognosi. L'assenza di makers tumorali nel glioblastoma, inoltre, rende il follow-up dei pazienti strettamente dipendente dagli esami di neuroimaging che talvolta possono risultare di difficile interpretazione. Microparticelle plasmatiche di derivazione neoplastica (MPs), descritte in diversi tipi di neoplasie ed associate ad attività procoagulante, sono state riscontrate nei pazienti affetti da glioblastoma.

Scopo dello studio: Valutare la complicità tromboembolica nell'immediato post operatorio dopo intervento per neoplasia cerebrale in un campione di pazienti. Determinare la relazione tra complicanze tromboemboliche e MPs circolanti e valutare la correlazione tra MPs e progressione di malattia nei pazienti trattati per glioblastoma di nuova diagnosi per comprendere il possibile utilizzo delle MPs come markers di malattia.

Materiali e metodi: In 57 pazienti, esenti da TEV e sottoposti ad intervento neurochirurgico per glioblastoma o meningioma, sono stati dosati i livelli ematici di D-Dimero preoperatoriamente, in III e in VII giornata postoperatoria. A tutti i pazienti è stata somministrata la medesima profilassi antitrombotica, preoperatoriamente e in VII giornata post operatoria è stato effettuato un EcoDoppler venoso.

In un secondo gruppo di 25 pazienti trattati per GBM di prima diagnosi sono state dosate le MPs circolanti basali e quantificata l'attività coagulativa rispetto ad un gruppo di 75 controlli sani. Sono state dosate le MPs a controlli seriatati preoperatoriamente, a 1, 4 e 7 mesi dopo la chirurgia ed esaminata l'eventuale insorgenza di complicanze tromboemboliche e di progressione di malattia. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a terapia adiuvante secondo il protocollo Stupp entro 6 settimane dall'intervento.

Risultati: Nel primo gruppo di pazienti la complicanza tromboembolica si è verificata nel 17.5% dei pazienti in assenza di segni o sintomi clinici. Il D-Dimero è risultato significativamente aumentato nel prelievo basale, in III ed in VII giornata nei pazienti che hanno sviluppato TEV rispetto a quelli che non l'hanno sviluppata con un trend in progressivo aumento.

Nel secondo gruppo di pazienti le MPs circolanti e l'attività procoagulante sono risultate significativamente aumentate rispetto ai controlli sani. Tali dosaggi erano significativamente più elevati nei pazienti che hanno sviluppato una TEV rispetto a quelli che non hanno avuto tale complicanza. Allo stesso modo le MPs circolanti erano più elevate nei pazienti che sono andati incontro a progressione di malattia rispetto ai controlli stabili.

Conclusioni: Nell'immediato post operatorio l'andamento del D-Dimero può aiutare nella diagnosi di TEV in assenza di segni o sintomi evidenti. L'aumento delle MPs circolanti correla con la comparsa di TEV rafforzando l'ipotesi del ruolo procoagulante di queste particelle. L'aumento delle MPs nei pazienti con progressione di malattia, inoltre, sembra suggerire il loro possibile utilizzo come markers di malattia.

Background: The clinical course of patients with glioblastoma is burdened with a poor prognosis. Furthermore, the hypercoagulable state associated with this cancer and the possible thromboembolic complications (VTE) may significantly worsen the prognosis. Moreover, the absence of tumor markers in glioblastoma makes the follow-up of these patients strictly dependent on the neuroimaging examination that might be controversial. Circulating tumor-derived microparticles (MPs), that are present in various types of tumors, associated with prothrombotic activity, were also found in the plasma of patients with glioblastoma.

Objective: To evaluate the first postoperative thromboembolic complications after surgery for brain tumor in a sample of patients. To determine the relationship between

circulating microparticles (MPs) and thromboembolism. To assess the relationship between MPs and progression of disease in patients treated for newly diagnosed glioblastoma in order to evaluate the possible use of MPs as markers of disease.

Materials and methods: In 57 patients, without TEV and subjected to neurosurgical intervention for glioblastoma and meningioma, blood levels of D-Dimer before surgery and III and VII days after surgery were assayed. All patients received the same antithrombotic prophylaxis and lower extremities ultrasonography before surgery and seven days after surgery.

We measured baselines levels of MPs and procoagulant activity in a second group of 25 patients treated for newly diagnosed GBM and we compared these data with a group of 75 healthy controls. We assayed MPs 1, 4 and 7 months after surgery, and we examined the possible occurrence of thromboembolic complications and disease progression. All patients underwent adjuvant treatment according to the protocol Stupp within 6 weeks after surgery.

Results: In the first group of patients, VTE complication occurred in 17.5 % of patients without clinical signs or symptoms. The D-dimer level significantly increased in the basal sample, in third and seventh postoperative days in patients who developed VTE compared to those who did not develop VTE.

In the second group of patients, circulating MPs and prothrombotic activity were significantly increased in patients compared to healthy controls. These counts were also significantly higher in patients who developed VTE compared to those who did not have this complication. Similarly, the circulating MPs were higher in patients who went against disease progression compared to stable controls.

Conclusions: In the first post-operative period, the D-Dimer plasmatic levels' trend can help in the diagnosis of VTE in the absence of clinical signs or symptoms. The increase of circulating MPs correlates with VTE strengthening the hypothesis of a prothrombotic role of these particles. The increase of circulating MPs in patients with progression of the disease seems suggest their possible use as tumoral markers.

INDICE

Introduzione

1 I gliomi cerebrali	pag. 1
2 Principali alterazioni genetiche nei gliomi	pag. 4
2.1 Codelezione dei bracci cromosomici 1p e 19q	pag. 4
2.2 O6-Metilguanina-DNA metiltransferasi (MGMT)	pag. 6
2.3 Mutazione dell'Isocitrato Deidrogenasi 1 e 2 (IDH1 e IDH2)	pag. 8
2.4 Amplificazione di Epidermal Grow Factor Receptor (EGFR)	pag. 9
2.5 Oncogene BRAF	pag. 10
3 Implicazioni cliniche: la gestione del paziente oncologico	pag. 10
4 La malattia tromboembolica venosa (TEV) nel paziente oncologico	pag. 13
4.1 Epidemiologia	pag. 13
4.2 TEV e gliomi di alto grado	pag. 16
4.3 Eziopatogenesi	pag. 17
4.4 Problemi diagnostici	pag. 20
5 D-dimero	pag. 22
6 Microparticelle	pag. 23
6.1 Definizione e meccanismo fisiopatologico	pag. 24
7 Trattamento del tromboembolismo venoso nel paziente con glioma di alto grado	pag. 28
7.1 Aspetti prognostici	pag. 29
8 Scopo dello studio	pag. 30
9 Fase I: tromboembolismo venoso durante la prima settimana post-operatoria in pazienti operati per neoplasia cerebrale primitiva	pag. 30
9.1 Materiali e metodi	pag. 31
9.1.1 Criteri di arruolamento	pag. 31
9.1.2 Variabili cliniche	pag. 31
9.1.3 Analisi di laboratorio	pag. 32
9.2 Analisi statistiche	pag. 31
9.3 Risultati	pag. 32
10 Fase II: microparticelle circolanti (MPs) nei pazienti con glioma cerebrale di alto grado	pag. 36

10.1 Materiali e metodi	pag. 36
10.1.1 Criteri di arruolamento	pag. 36
10.1.2 Variabili	pag. 38
10.1.3 Metodiche di laboratorio	pag. 38
10.1.3.1 Dosaggio delle microparticelle	pag. 39
10.1.3.2 Quantificazione dell'attività procoagulante delle MPs	pag. 40
10.1.3.3 Trombinogenerazione	pag. 40
10.2 Analisi statistiche	pag. 42
10.3 Risultati	pag. 42
10.3.1 Dosaggio delle MPs circolanti e PPL clotting time	pag. 44
10.3.2 Trombinogenerazione	pag. 45
10.3.3 MPs e trombosi venosa profonda	pag. 46
10.3.4 MPs e progressione di malattia	pag. 47
11 Discussione e conclusioni	pag. 48
Bibliografia	pag. 55

INTRODUZIONE

1. I gliomi cerebrali

I gliomi cerebrali costituiscono i tumori primitivi cerebrali più frequenti e a prognosi peggiore. Questi tumori trovano localizzazione preferenziale nel parenchima cerebrale del compartimento intracranico sopra-tentoriale e risultano più frequenti negli adulti. Una stima della loro incidenza è compresa tra 5 e 10 nuovi casi anno per 100.000 abitanti nella popolazione generale [1].

Si distinguono tre gruppi principali: astrocitomi, oligodendrogliomi e gliomi misti, in base alle loro similitudini istologiche con gli astrociti o gli oligodendrociti.

Già Rudolph Virchow (1821-1902), fondatore della patologia cellulare, aveva individuato nel 1864/65 l'entità "glioma cerebrale", separando questa tipologia di lesione neoplastica dalle altre con cui, all'epoca, venivano inquadrati i tumori cerebrali (psammoma; melanoma; sarcoma) [2]. Nel 1926 Bailey e Cushing svilupparono la prima classificazione dei gliomi cerebrali e introdussero il concetto "grading" per questi tumori [3]. La prima classificazione rientrata nella ICD-O (International Classification of Diseases for Oncology), è nata nel 1893, mentre nel 1979 è stata pubblicata la prima classificazione WHO (World Health Organization) dei tumori del sistema nervoso centrale [4]. Tale classificazione ha subito, nel corso degli anni, numerosi aggiornamenti e variazioni e l'ultima edizione aggiornata e revisionata ed attualmente in uso risale al 2007 [5] (Fig. 1).

La World Health Organization (WHO) individua, per i tumori cerebrali, quattro gradi di aggressività passando dal grado I, a comportamento non aggressivo, all'estremamente aggressivo grado IV.

Le varie edizioni hanno visto affiancarsi all'informazione morfologica (attività mitotica, necrosi e infiltrazione), dapprima dati immunohistochimici e, successivamente, i profili genetici.

Tutte le classificazioni WHO riprendono il principio istogenetico proposto da Bailey e Cushing nel 1926 e ogni entità tumorale è classificata in base alla presunta cellula di origine. Anche se quest'idea "istogenetica" è ampiamente utilizzata, l'effettiva natura della cellula d'origine di un glioma cerebrale è molto spesso irricognoscibile. Evidenze sperimentali hanno dimostrato come i gliomi cerebrali originino più probabilmente da precursori gliali, piuttosto che da cellule differenziate (astrociti, oligodendrociti) [6]; tuttavia, la classificazione istologica WHO permette di avere una distinzione, biologicamente e clinicamente, significativa delle diverse entità tumorali. Al tipo istologico (tumor typing), la classificazione WHO associa una valutazione di aggressività (tumor grading). Molteplici studi hanno confermato che i principali parametri prognostici, Overall survival (OS) e Progression free-survival (PFS), sono strettamente correlati alla biologia intrinseca della neoplasia e che invece, la sintomatologia neurologica dipende dalla localizzazione del tumore [1].

Il grado WHO per i tumori cerebrali non è equivalente al grado istologico utilizzato negli altri campi della patologia chirurgica, ma riflette piuttosto una stima di malignità e di prognosi del paziente.

In generale, le lesioni classificate come "grado I WHO" sono tumori con minimo potenziale proliferativo e si considerano potenzialmente curabili attraverso la sola, completa, asportazione chirurgica (astrocitoma pilocitico, subependimoma, ependimoma mixopapillare della cauda equine ecc.).

Le lesioni di "grado II WHO" presentano invece una bassa attività mitotica e una tendenza alla recidiva (astrocitoma diffuso, oligodendroglioma, oligoastrocitoma, ependimoma).

Il "grado III WHO" è riservato alle neoplasie con una evidenza istologica di anaplasia tissutale, che viene indicata da una aumentata attività mitotica, accresciuta cellularità, pleomorfismo nucleare ed anaplasia cellulare.

Il "grado IV WHO" è conferito da una elevata attività mitotica e dalla presenza di aree di necrosi, tipicamente associabili a una rapida evoluzione della malattia.

	I	II	III	IV
Astrocytic tumours				
Subependymal giant cell astrocytoma	*			
Piloicytic astrocytoma	*			
Piloxyoid astrocytoma		*		
Diffuse astrocytoma		*		
Plasmocytic xanthoastrocytoma		*		
Anaplastic astrocytoma			*	
Glioblastoma				*
Giant cell glioblastoma				*
Gliosarcoma				*
Oligodendroglial tumours				
Oligodendroglioma		*		
Anaplastic oligodendroglioma			*	
Oligoastrocytic tumours				
Oligoastrocytoma		*		
Anaplastic oligoastrocytoma			*	
Ependymal tumours				
Subependymoma	*			
Myxopapillary ependymoma	*			
Ependymoma		*		
Anaplastic ependymoma			*	
Choroid plexus tumours				
Choroid plexus papilloma	*			
Atypical choroid plexus papilloma		*		
Choroid plexus carcinoma			*	
Other neuroepithelial tumours				
Angiocentric glioma	*			
Chordoid glioma of the third ventricle		*		
Neuronal and mixed neuronal-gliial tumours				
Gangliocytoma	*			
Ganglioglioma	*			
Anaplastic ganglioglioma			*	
Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	*			
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	*			
Central neurocytoma				
Central neurocytoma		*		
Extraventricular neurocytoma		*		
Carotellar liponeurocytoma		*		
Paraganglioma of the spinal cord	*			
Papillary glioneuronal tumour	*			
Rosette-forming glioneuronal tumour of the fourth ventricle	*			
Pineal tumours				
Pineocytoma	*			
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation		*	*	
Pineoblastoma				*
Papillary tumour of the pineal region		*	*	
Embryonal tumours				
Medulloblastoma				*
CNS primitive neuroectodermal tumour (PNET)				*
Atypical teratoid / rhabdoid tumour				*
Tumours of the cranial and paraspinal nerves				
Schwannoma	*			
Neurofibroma	*			
Perineurioma	*	*	*	
Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)		*	*	*
Meningeal tumours				
Meningioma	*			
Atypical meningioma		*		
Anaplastic / malignant meningioma			*	
Haemangiopericytoma		*		
Anaplastic haemangiopericytoma			*	
Haemangioblastoma	*			
Tumours of the sellar region				
Craniopharyngioma	*			
Granular cell tumour of the neurohypophysis	*			
Pituitary tumour	*			
Spindle cell oncocytoma of the adenohypophysis	*			

Fig. 1: Classificazione dei tumori cerebrali WHO 2007 (Louis, Acta Neuropathol 2007)

Lo schema classificativo proposto dalla WHO costituisce un sistema pratico e universalmente accettato per individuare i vari tumori cerebrali e, nella pratica clinica, per avere accesso rapido alle informazioni prognostiche sui pazienti che

ne sono affetti. L'attuale classificazione, tuttavia, è di tipo prevalentemente morfologico e quindi è fortemente dipendente dall'operatore che analizza il campione.

Grazie ai recenti progressi nell'ambito della "neurooncologia molecolare", la valutazione del neuropatologo non si limita a fornire un giudizio sul tipo istologico e sul grado, ma può essere completata con un crescente numero di test molecolari per l'individuazione di biomarkers tissutali. La progressiva completa definizione dell'identità molecolare di ciascuna neoplasia renderà certamente diverso il lavoro del patologo e verosimilmente più agevole e più precisa la definizione prognostica con importanti implicazioni sulle definizioni della migliore strategia terapeutica.

2. Principali alterazioni genetiche nei gliomi

2.1. Codelezione dei bracci cromosomici 1p e 19q

Partendo dall'osservazione empirica di una buona risposta alla chemioterapia da parte di una alta percentuale di oligodendrogliomi anaplastici recidivi (grado III WHO), Cairncross e colleghi hanno dimostrato come gli oligodendrogliomi, con perdita del braccio corto del cromosoma 1 (1p), fossero più sensibili allo schema di trattamento con Procarbazina, Lomustina e Vincristina e che, inoltre, i pazienti il cui tumore presentasse la perdita del braccio lungo del cromosoma 19 (19q) associata alla perdita dell'1p, mostravano un sostanziale aumento della sopravvivenza [7]. Con il passare degli anni si è visto che la codelezione 1p/19q, frutto di una traslocazione sbilanciata dei due cromosomi, aumenta anche la sopravvivenza dei pazienti trattati con altri chemioterapici come il Temozolomide o trattamento radiante. È stato osservato come la perdita di 1p e 19q mostri un legame con la sede del glioma, infatti i tumori di grado II e III frontali, parietali e occipitali hanno maggiori probabilità di mostrare quest'alterazione rispetto ai tumori temporali, insulari e diencefalici. Nell'ultimo

decennio, l'analisi della codelezione 1p/19q è stata ampiamente impiegata come indicatore di "vulnerabilità tumorale" a una ampia gamma di opzioni terapeutiche, quindi come predittore di sensibilità [8]. La valutazione 1p19q è oggi ampiamente utilizzato nella gestione dei pazienti con oligodendroglioma e la sua frequenza è del 80-90% negli oligodendrogliomi di grado II, 50-70% in quelli di grado III e 20-30% nei gliomi misti di grado II e III (oligoastrocitomi e oligoastrocitomi anaplastici) [9].

La codelezione 1p/19q appare sempre correlata alla presenza della mutazione IDH1/IDH2, mentre è inversamente correlata alla mutazione TP53, alla delezione 10q e all'amplificazione del EGFR [10]. La codelezione 1p/19q rappresenta sia nei gliomi di grado II che nei tumori anaplastici un predittore di aumentato PFS (progression-free survival) e globalmente un indice di migliore risposta a radio e chemioterapia con una mediana di sopravvivenza è di 12-15 anni negli oligodendrogliomi di grado II e 7 anni negli oligodendrogliomi anaplastici in presenza della codelezione 1p/19q contro 5-8 anni e 2-3 anni rispettivamente in assenza della codelezione [11].

Questa codelezione si riscontra raramente nei glioblastomi e contrariamente a quanto detto per i gliomi di grado II e III, nei grado IV essa sembra un indice di minore sopravvivenza. In riferimento alla delezione dell'1p è importante distinguere tra delezione parziale e delezione totale. Mentre la completa delezione di 1p è un predittore positivo per ciò che riguarda la sopravvivenza, la delezione parziale e distale del braccio 1p rappresenta, negli astrocitomi, un fattore prognostico negativo.

Studi sul profilo di espressione genica hanno dimostrato che i gliomi con codelezione 1p/19q hanno un profilo di espressione proneurale, che è stato associato a una migliore prognosi nei gliomi di alto grado. l'INA è uno dei geni proneurali principalmente espressi in questi tumori e codifica per il neurofilamento internexina-alfa. Il gruppo di neurooncologia sperimentale dell'ospedale Salpêtrière di Parigi ha valutato l'espressione dell'internexina-alfa

mediante immunohistochimica su una serie di 122 gliomi [12]. Nei tumori oligodendrogliali l'inter-nexina-alfa si è dimostrato un marcatore indiretto della codelezione 1p/19q, con una specificità dell'86%, una sensibilità del 96%, un valore predittivo positivo del 76% e predittivo negativo del 98%. L'espressione di inter-nexina-alfa, in modo sovrapponibile alla codelezione 1p/19q, ha dimostrato di essere un fattore prognostico positivo nei gliomi di grado III, sia per ciò che riguarda la progression-free survival (52,6 vs 8,7 mesi), sia per la sopravvivenza globale (121,1 vs 31,4 mesi).

2.2. O6-Metilguanina-DNA metiltransferasi (MGMT)

La Temozolomide, chemioterapico alchilante utilizzato nei pazienti affetti da GBM, provoca la morte cellulare attraverso la metilazione dell'O in posizione 6 della guanina. A livello cellulare tuttavia è attivo un meccanismo di riparazione del DNA che contrasta l'effetto della temozolomide grazie all'enzima di riparazione del DNA O6-Metilguanina-DNA metiltransferasi (MGMT) che trasferisce il gruppo metilico dalla posizione O6 della guanina ad un residuo di cisteina della proteina MGMT, contrastandone l'effetto tossico. In circa la metà dei glioblastomi la concentrazione dell'MGMT è ridotta con conseguente maggior efficacia d'azione della Temozolomide [13,14]. La prima causa della riduzione dell'enzima MGMT nei tumori è la metilazione del promotore del gene MGMT, che ne silenzia l'espressione genica. Nei glioblastomi la valutazione dei livelli di espressione dell'enzima MGMT e dello stato di metilazione del promotore del gene MGMT può avere un valore predittivo della risposta al trattamento con farmaci alchilanti come la Temozolomide. La metilazione del gene MGMT può inoltre essere considerata un fattore prognostico indipendente [15]. Nello studio di Hegi et al., è stato valutato lo stato del promotore di MGMT ed è stato comparato [14] l'impiego concomitante di temozolomide e radioterapia versus sola radioterapia. Nei 106 pazienti trattati

con temozolomide la sopravvivenza a due anni era pari al 46% nei pazienti con MGMT metilato, contro il 23% dei pazienti con MGMT non metilato ($p=0.007$) [14]. Questo studio ha inoltre confermato un beneficio nell'impiego concomitante di temozolomide anche nei pazienti "non metilati". Un trial clinico molto recente dell'EORTC/NCIC 26981/22981 [16], mirato anch'esso a comparare il concomitante impiego del temozolomide rispetto alla sola radioterapia, ha evidenziato un grande beneficio in termini di OS e PFS, nei pazienti trattati con temozolomide e radioterapia, in presenza della metilazione del promotore di MGMT (OS = 27,2% a 2 aa, 16% a 3 aa, 9,8% a 5 aa, contro, rispettivamente, 10,9%, 4,4% e 3%, in caso di sola radioterapia). In tale studio è stato dimostrato come tra i pazienti con MGMT metilato esista una più alta percentuale di lungo-sopravvivenenti ed una maggiore predisposizione al fenomeno della pseudo-progression. In una elevata percentuale di questi pazienti, infatti, si osserva un iniziale peggioramento del quadro radiologico che successivamente tende a migliorare con la prosecuzione della terapia. La valutazione di un gruppo di pazienti colpiti da glioblastoma e lungo-sopravvivenenti trattati con lomustina, temozolomide e radioterapia, ha dimostrato che la metilazione del promotore di MGMT costituisce un fattore prognostico indipendente di maggiore sopravvivenza [17]. E' importante sottolineare che uno studio mirato a valutare l'impatto della metilazione di MGMT su gliomi a basso grado, ha concluso che questa alterazione costituisce un fattore prognostico positivo, ma non ha valore predittivo di risposta alla terapia con procarbazine, lomustina e vincristina (PVC), comparata con la risposta alla sola radioterapia. L'impatto della metilazione, e quindi del silenziamento del gene MGMT è stato studiato anche in relazione all'impiego della carmustina (nitrosurea) ed è stato osservato un aumento del PFS e della sopravvivenza globale (OS) nei pazienti metilati [15]. Rivera et al., nel 2010, ha osservato che la metilazione del promotore del gene MGMT è anche predittivo di buona risposta alla radioterapia nei gliomi anaplastici e nei glioblastomi [15].

2.3. Mutazione dell'Isocitrato Deidrogenasi 1 e 2 (IDH1 e IDH2)

L'enzima isocitrato deidrogenasi (IDH), che esiste in tre differenti isoforme (IDH1/2/3), catalizza la conversione dell'isocitrato in alfa-chetoglutarato, riducendo contemporaneamente l' NADP^+ ad NADPH. L'NADPH accumulato è impiegato per la rigenerazione del glutathione ridotto, si deduce quindi che la reazione catalizzata dall'isocitrato deidrogenasi è di estrema importanza per la possibilità della cellula di contrastare gli stress ossidativi. L'IDH1 svolge la sua attività a livello citoplasmatico, mentre invece l'IDH2 è l'isoforma mitocondriale. Nel 2008, grazie ad un lavoro di sequenziamento genomico del glioblastoma, è stata evidenziata la mutazione del gene IDH1 in circa il 12% dei glioblastomi, prevalentemente in giovani pazienti o glioblastomi secondari [18]. Nel 90% dei casi la mutazione è a carico della tripletta CGT→CAT, codificante per l'Arginina in posizione 132 (Arg 132) e che viene sostituita da un'istidina (His). In una piccolissima percentuale di casi di mutazione IDH1, l'Arg 132 può essere sostituita da altri 5 aminoacidi (Ser, Gly, Val, Cys, Leu). Una piccola percentuale di pazienti esente dalla mutazione IDH1 può presentare una mutazione a carico dell'isoforma mitocondriale dell'enzima, vale a dire l'IDH2. Anche in questo caso la mutazione coinvolge un'arginina (Arg 172), che può essere sostituita da Lys, Met o Gly. L'IDH3 non appare interessato da mutazioni nei gliomi [19, 20]. La mutazione IDH1 si riscontra molto raramente negli astrocitomi pilocitici, costituendo quindi una mutazione pressoché esclusiva dei gliomi diffusi. Nei gliomi diffusi, poi, si riscontra con una frequenza inversamente proporzionale al grado del glioma, infatti è presente nel 70% dei gliomi di grado II, nel 50% circa dei gliomi di grado III e in solo il 5-10% dei glioblastomi primitivi. Nei glioblastomi secondari, questa mutazione raggiunge l'80% circa [21]. La presenza della mutazione IDH1 influisce pesantemente sul decorso della malattia. Marc Sanson nel 2009 ha evidenziato l'impatto che

questa mutazione ha sulla sopravvivenza globale e sulla progressio free survival nei gliomi diffusi. I gliomi di grado IV mostrano una OS di 27,4 mesi contro i 14 mesi dei pazienti senza mutazione IDH1 [22].

2.4. Amplificazione di Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

Numerosi fattori di crescita e loro recettori appaiono iper-attivati nei gliomi e questo fenomeno è particolarmente evidente nei glioblastomi. L'EGFR è certamente un esempio molto importante di questo fenomeno. Esso è "up-regolato" approssimativamente nel 30% del totale dei gliomi e nel 60% dei glioblastomi [23,24]. L'up-regulation che si osserva nei glioblastomi deriva da una amplificazione del gene EGFR. Oltre all'amplificazione del gene, in circa la metà dei glioblastomi si riscontra una forma modificata della proteina EGRF. Nella maggior parte dei casi si tratta dell'EGFR variante III (EGFRvIII), in questa variante manca il dominio che normalmente riconosce il ligando e appare, quindi, costitutivamente attivata la via del EGFR-fosfoinositide-chinasi. [25], Sono state inoltre riscontrate delle mutazioni a carico dell'esone che codifica per i domini extracellulari dell'EGFR, che hanno mostrato delle capacità oncogeniche in vitro. L'identificazione dell'amplificazione di EGFR o delle modificazioni come EGFRvIII sono indicative di elevata malignità, da queste informazioni si possono quindi ottenere informazioni sia diagnostiche che prognostiche. Il riscontro di un'amplificazione EGFR o di EGRFvIII in gliomi anaplastici o gliomi di grado II suggerisce una malignità superiore a quella suggerita dalla valutazione istopatologia [26].

2.5. Oncogene BRAF

Il proto-oncogene BRAF (7q34) è membro della famiglia delle RAF-chinasi e può essere interessato da duplicazione o, più raramente, da mutazione puntiforme. Recentemente questa aberrazione genetica è stata identificata come caratteristica negli astrocitomi pilocitici, dove è riscontrabile in circa il 60-80% dei tumori, è infrequente nei gliomi infiltranti [27,28]. La detezione di questa alterazione può essere di aiuto qualora vi siano dubbi diagnostici tra un astrocitoma pilocitico e un glioma di grado II. L'analisi parallela di BRAF e IDH1, che è molto frequente nei gliomi di basso grado e raro negli astrocitomi pilocitici, costituisce un mezzo utilissimo per discriminare questi due tipi di tumori [29]. La conoscenza dell'alterazione di BRAF negli astrocitomi ha una potenziale ricaduta in campo terapeutico in qualità di potenziale bersaglio. Studi in vitro, infatti, hanno dimostrato che l'inibizione di questa via blocca la proliferazione in colture di cellule di glioma [30].

L'importanza delle aberrazioni molecolari e genetiche presenti nei glomi cerebrali deriva dalla diretta ricaduta sul comportamento della malattia, sulla risposta alle terapie e quindi, in ultima analisi, sulla sopravvivenza dei pazienti.

3. Implicazioni cliniche: la gestione del paziente oncologico

La cura del paziente oncologico è estremamente complessa a causa dei molteplici fattori che concorrono in questi pazienti. In primo luogo la complessità della patologia di base, la gestione di eventuali comorbidità o sindromi paraneoplastiche e, non ultimo, le implicazioni psicologiche che interessano il paziente stesso, ma anche il nucleo familiare ed il personale sanitario. Questa complessità è ancor maggiore nel paziente con neoplasia cerebrale. L'insieme dei tumori del SNC, pur essendo molto eterogeneo dal punto di vista biologico, presenta delle specifiche peculiarità. Basti pensare a

quanto sia estremamente relativo il concetto di “benignità” nei tumori del SNC. Infatti per le caratteristiche funzionali del tessuto nervoso e per gli spazi “rigidi” in cui è ospitato, anche i tumori con comportamento biologico benigno possono mettere a rischio le funzioni e la vita del paziente se non tempestivamente trattati. Pertanto anche il trattamento di un tumore benigno può rappresentare una sfida particolarmente ardua.

Il trattamento delle neoplasie di origine gliale ed in particolar modo del GBM, rimane ancora oggi estremamente difficile sia per l’aggressività biologica, che ne determina la prognosi infausta, sia per difficoltà di ottenere una asportazione radicale a scapito di deficit funzionali.

L’introduzione delle tecniche di monitoraggio neurofisiologico intraoperatorio ha dato un enorme supporto alla chirurgia tuttavia nonostante i grandi progressi chirurgici e i paralleli avanzamenti farmacologici, la sopravvivenza dei pazienti con GBM ha subito solo lievi incrementi e ancora oggi questo tipo di tumore presenta una prognosi molto sfavorevole.

La sopravvivenza e la qualità di vita dei pazienti affetti da glioblastoma sono influenzate da tanti fattori. A tal proposito sono certamente importanti le caratteristiche “fisiche” del tumore, quali la sede e le dimensioni. Questi due aspetti “macroscopici” influenzano la sintomatologia di esordio e, in alcuni casi, il grado di autonomia che il paziente ha al momento della chirurgia (Karnofsky Performance Status) e spesso correlano con l’outcome ed il grado di reseccabilità chirurgica [31].

Recenti studi hanno ben documentato come la caratterizzazione molecolare sia determinante nel definire il comportamento biologico della malattia modificando sensibilmente la diagnostica istopatologica e chiarificando comportamenti biologici diversi da parte di tumori con lo stesso grading istologico [18,32]. In letteratura numerosi articoli analizzano la sopravvivenza media, la Progression Free Survival e la risposta alle terapie in funzione degli aspetti molecolari. Queste caratterizzazioni molecolari, in particolar modo la mutazione a carico di

IDH1, potrebbero inoltre essere sfruttate come markers di malattia e ci sono dati emergenti ed incoraggianti sulla loro identificazione nel plasma [33]. Tuttavia come precedentemente riportato, tali mutazioni sono piuttosto rare nei GBM primari.

Un altro fattore determinante nella qualità di vita di questi pazienti è rivestito dalle comorbidità che influenzano il recupero funzionale e la tempistica delle terapie adiuvanti. Tuttavia l'argomento "comorbidità" in senso lato costituisce un settore a tutt'oggi poco esplorato. In uno studio pubblicato su *J Neurooncol* [34] è stato analizzato il decorso di 2.424 pazienti operati per glioblastoma prendendo in esame come comorbidità le crisi comiziali, l'edema cerebrale, la trombosi venosa profonda (ETV), l'embolia polmonare, lo scompenso cardiaco, la coronaropatia, l'infarto del miocardio [34]. I risultati del lavoro documentano che la maggiore complicanza, escluse quelle "locali" come le crisi epilettiche e l'edema cerebrale, è costituita dal tromboembolismo venoso (ETV). Numerosi studi sugli eventi tromboembolici in questi pazienti dimostrano che il rischio è maggiore durante i primi mesi successivi alla diagnosi. Sulla base di tali premesse appare evidente che la conoscenza di questi fenomeni sia necessaria per una corretta gestione dei pazienti affetti da glioblastoma sia per prevenire l'insorgenza di ETV che per arginarne gli effetti e, non ultimo, per avere un dato importante ai fini prognostici.

La conoscenza delle alterazioni coagulative nei pazienti affetti da glioblastoma multiforme ha, inoltre, un altro importante risvolto, prettamente oncologico. Più autori, negli ultimi anni, evidenziano l'importanza delle microtrombosi intratumorali nel percorso di progressione di malattia. Proprio gli eventi trombotici, infatti, creerebbero all'interno del glioma, il microambiente che favorisce la proliferazione cellulare e la neoangiogenesi (ipossia) [35].

Infine, la gestione di questi pazienti è resa ancor più complessa dalla mancanza di markers di malattia utilizzabili nella pratica clinica per il follow-up. I pazienti con GBM, infatti, vengono sottoposti a follow-up clinici e radiologici

che, seppur ravvicinati, possono essere gravati dalla difficile interpretazione di quadri radiologici dubbi legati per esempio a fenomeni di pseudo progressione.

4. La malattia tromboembolica venosa nel paziente oncologico

L'associazione tra neoplasia e trombosi è stata osservata già nel diciannovesimo secolo, dapprima da Jean Baptiste Bouillaud e, successivamente, da Armand Trousseau [36,37]. Proprio da quest'ultimo prende il nome l'associazione di queste due entità patologiche, "Sindrome di Trousseau" per l'appunto. Nella malattia tromboembolica venosa (TEV) rientrano sia la trombosi venosa profonda (TVP) che l'embolia polmonare (EP). Lo stato di ipercoagulabilità osservato nei pazienti neoplastici rappresenta una vera e propria sindrome paraneoplastica ed alcuni autori ipotizzano che la tromboprofilassi sistematica in questi pazienti potrebbe avere un impatto in termini di sopravvivenza [38].

4.1.Epidemiologia

Il tromboembolismo venoso ha un'incidenza stimata di 67 per 100.00 persone/anno nella popolazione generale [39] e il 2-5% della popolazione generale sviluppa un episodio trombotico nel corso della vita.

Si stima che il 20-30% circa di tutti i primi eventi tromboembolici venosi siano associati ad una neoplasia concomitante [40,41]. A tal riguardo possiamo ricordare uno studio prospettico condotto su una popolazione di 26.000 pazienti, denominato Tromsø. I soggetti sono stati seguiti dal 1994 al 2007 e in 462 pazienti si è verificato un primo evento di TEV. 106 di questi pazienti (23%) erano affetti da una neoplasia attiva [42].

In uno studio eseguito da White e collaboratori, su una coorte di 21.002 pazienti ospedalizzati con ETV in fase acuta nel 1996, è emerso che 4368 (20%) erano affetti da una neoplasia concomitante [43].

I dati provenienti dal Registro Informatizado de Enfermedad Trombo Embolica (Riete) dimostrano che su 35.000 pazienti sintomatici per TEV registrati tra il

2001 e il 2011, una neoplasia attiva è stato presente nel 17% dei casi (6075 pazienti)[40] (*Tabella I*).

Si stima che i pazienti oncologici hanno un aumento di circa 5 volte del rischio di TEV rispetto alla popolazione generale o a pazienti senza cancro (*Tabella D*)[41,44,45].

Il rischio assoluto riportato (incidenza cumulativa) di TEV in pazienti oncologici varia in un range ampio, compreso tra 1% e 8%, a seconda della popolazione, della durata del follow-up e del metodo di diagnosi e registrazione degli eventi trombotici (*Tabella I*).

Horsted et al.[46], in una meta-analisi pubblicata nel 2012 ha descritto i tassi di incidenza di trombosi venosa nei pazienti oncologici, stratificati per rischio di base. Nei pazienti ad alto rischio, cioè pazienti affetti da neoplasia di alto grado o metastatica o che comunque hanno subito trattamenti che aumentano il rischio trombotico, il tasso complessivo di incidenza era di 68 per 1000 anni persona. Nei pazienti a medio rischio, rappresentativi di tutti i pazienti con cancro, il tasso di incidenza di trombosi venosa è stato stimato essere 13 per 1000 anni-persona (95% CI: 7-23)ⁱ. Nel corso degli anni l'incidenza di TEV nel cancro è andata aumentando [47,48] e questo aumento si spiega valutando diversi fattori. Tra questi ricordiamo una maggiore consapevolezza delle problematiche tromboemboliche nei pazienti oncologici e, quindi, un miglioramento della diagnostica. Il progresso nelle strategie terapeutiche, infine, ha portato i pazienti oncologici ad una maggiore sopravvivenza cosicché pazienti sempre più anziani saranno sottoposti a nuovi trattamenti antitumorali, con la diretta conseguenza di aumentare il rischio di trombosi. Per queste ragioni, è previsto che l'incidenza di TEV aumentarti ulteriormente in futuro.

	Popolazione	Tipo di studio	Numero pazienti	Stima
<i>Incidenza di TEV associato al cancro</i>	Popolazione del Minnesota	Caso-controllo	625	18% (rischio attribuibile)
	Codici di dimissione California	Coorte	21.002	21%
	Registro RIETE	Coorte	35.539	17%
	Studio Tromsø	Coorte	462	23%
<i>RR per TEV per cancro vs non cancro</i>	Studio MEGA	Caso-controllo	2131/3220	OR 6.7 (95%CI 5.2-8.6)
	Popolazione del Minnesota	Caso-controllo	625/625	OR 4.1 (95%CI 1.9-8.5)
	Registri sulla popolazione danese	Coorte	57.591/287.476	HR 4.7 (95%CI 4.3-5.1)
<i>Rischio assoluto di TEV nel cancro</i>	Codici di dimissione California	Coorte	235.149	1.6% a 2 anni
	Studio CATS	Coorte	840	8% a 1 anno
	38 lavori di coorte	Meta-analisi	NA	13/1000 anni-pz (medio rischio) 68/1000 anni-pz (alto rischio)
<i>Fattori di rischio per TEV</i>				
<i>Tipo di cancro</i>	38 lavori di coorte	Meta-analisi	NA	Pancreas 110/1000 anni-pz
				Encefalo 80/1000 anni-pz
				Polmone 45/1000 anni-pz
				Ematologici 40/1000 anni-pz
				Colon-retto 30/1000 anni-pz
				Osso 30/1000 anni-pz
				Prostata/mammella 10/1000 anni-pz
<i>Stadio del cancro</i>	Codici di dimissione California	Coorte	235.149	HR 1.1-21.5 per cancro metastatico vs localizzato
	Studio CATS	Coorte	740	HR 2.0 (95%CI 1.1-3.5) per tumori solidi G3+G4 vs G1+G2
<i>Tempo dalla diagnosi di cancro</i>	Studio MEGA	Caso-controllo	2131/3220	OR 53.5 (95%CI 8.6-334.3) nei primi 3 mesi dopo la diagnosi
				OR 14.3 (95%CI 5.8-35.2) 3-12 mesi dopo la diagnosi
				OR 1.1 (95%CI 0.6-2.2) > 15 anni dopo la diagnosi
<i>Trattamento</i>	Popolazione del	Caso-controllo	625/625	OR 4.1 vs 6.5 per

Minnesota			chemioterapia vs non chemioterapia	
Carcinoma operabile mammella	Trial controllato randomizzato	353/352	Incidenza cumulativa TEV 13.6-2.6% a 2 anni per 6 mesi di chemioterapia con tamoxifene vs no tamoxifene	
35 lavori su trials	Meta-analisi	6769	RR 1.7 (95%CI 1.4-2.1) per TEV in pz trattati con agenti stimolanti l'eritropoiesi vs non trattati	
15 lavori su trials in tumori solidi	Meta-analisi	7956	RR 1.3 (95%CI 1.1-1.6) per TEV in pz trattati con aggiunta di bevacizumab vs no bevacizumab	
<i>Fattori di rischio legati al paziente</i>	Codici di dimissione della California + cancro colon-retto	Coorte	68.142	HR 2.0 (95%CI 1.7-2.3) per ≥ 3 comorbidità vs no comorbidità
	Studio MEGA	Caso-controllo	2131/3220	OR 2.2 (95%CI 0.3-17.8) per TEV in pz con cancro e fattore V Leiden vs no fattore V Leiden

Tab. I: Incidenza e fattori di rischio per malattia tromboembolica venosa (tratto da Timp JF et alⁱⁱ).

4.2. TEV e gliomi di alto grado

L'incidenza di tromboembolismo venoso (TEV) nei pazienti operati per neoplasie cerebrali è stimata in un range del 3-20% durante il periodo perioperatorio ed il rischio di sviluppare una TEV è del 7-28% ad un anno [49]. Uno studio prospettico condotto da Brandes et al a Padova nel 1997 su 77 pazienti con glioma di alto grado ha individuato un rischio di VTE del 20.8% a 12 mesi dalla diagnosi e del 31.7% a 24 mesi [50]. Nello stesso studio viene individuato il periodo di massimo rischio nei primi 7 mesi successivi all'intervento chirurgico. La percentuale di embolie polmonari è stata del 5%, nel 3% dei casi fatale. Dalla letteratura disponibile appare evidente come il primo periodo postchirurgico sia gravato da maggiore incidenza di eventi tromboembolici; tale rischio deriva direttamente dal rilascio in circolo di

microparticelle (MP) con attività procoagulante [51,52,53]. Nello studio del Glioma Outcomes Project del 2001 viene dimostrata una TEV nel 10.7% dei pazienti nei 9-12 mesi successivi alla diagnosi e nel 22.9% a 12-15 mesi [54]. In un lavoro pubblicato da Marras et al nel 2000 viene individuato un rischio di trombosi di 1,5-2% per mese di sopravvivenza nei pazienti con glioma di alto grado [55]. Nel 2013 è stato pubblicato, da Kaisorn et al, un lavoro che ha valutato l'incidenza di eventi tromboembolici venosi in 4293 pazienti sottoposti ad intervento di craniotomia per diverse tipologie di neoplasia cerebrale nei primi 30 giorni postoperatori (riporto le tipologie di tumori più rappresentate: 984 per glioblastoma (WHO grade IV), 283 per glioma anaplastico (WHO grade III), 281 glioma di basso grado (WHO grade II), 536 per metastasi cerebrali, 826 meningiomi e 237 schwannomi) [56]. Dall'analisi multivariata dei dati è emerso che i fattori maggiormente associati a sviluppo di tromboembolismo venoso sono: un basso Karnofsky [odds ratio (OR), 1.040; 95% confidence interval (CI), 1.026-1.052; P<0.0001], diagnosi di glioblastoma [OR,1.702;95%CI, 1.176-2.465; P<0.005], l'età avanzata [OR,1.033;95%CI,1.020-1.046;P<0.0001], l'ipertensione arteriosa [OR 1.785;95%CI, 1.180-2.699;P=0.006] e la presenza di deficit motori [OR,1.854;95%CI,1.244-2.763;P=0.002] [56]. Negli studi che hanno comparato il rischio di tromboembolismo venoso nei pazienti oncologici in generale è emerso che le neoplasie maggiormente correlate con la TEV sono il cancro dell'ovaio, del pancreas e il glioblastoma e, tra queste, il glioblastoma presenta il rischio più elevato [57,58].

4.3.Eziopatogenesi

I fattori che influenzano il rischio di TEV nei pazienti con glioma di alto grado sono indubbiamente molteplici, derivano sia dalla neoplasia che da fattori propri del paziente e dai trattamenti a cui è sottoposto. L'età, eventuali altre patologie concomitanti e storia di precedenti VTE costituiscono degli indubbi fattori di

rischio. Nei glioblastomi bisogna considerare l'eventuale immobilizzazione derivante da deficit neurologici oltre che la ridotta mobilità che può caratterizzare il periodo perioperatorio. La terapia antiedemigena corticosteroidea gioca a sua volta un ruolo nell'aumentare il rischio di trombosi venosa come anche alcuni trattamenti, basti pensare agli agenti antiangiogenetici. La chemioterapia è associata ad un aumentato rischio di trombosi e si è dimostrata un fattore di rischio indipendente nei pazienti con glioma di alto grado. Non è stato chiarito l'effetto della radioterapia sul rischio di trombosi venosa nei pazienti con glioma tuttavia, tale rischio, è dimostrato per altri tipi di neoplasia [59,60,61].

I pazienti oncologici, in generale, presentano uno stato di ipercoagulabilità anche in assenza di trombosi clinicamente manifeste [62,63] legato alle proprietà protrombotiche delle cellule tumorali stesse. Tali cellule sono in grado di attivare la cascata coagulativa, mediante la produzione di sostanze procoagulanti come ad esempio il "Fattore Tissutale" (TF) o tromboplastina tissutale. Il TF è una glicoproteina trans membrana di 47 kD ed è il principale iniziatore della cascata coagulativa. E' espresso costitutivamente dalle cellule di glioma e forma un complesso con il fattore VII in grado di attivare la cascata coagulativa. In particolare è stato dimostrato che l'espressione del TF nei gliomi è direttamente proporzionale al grado di malignità e alla vascolarizzazione. Dati di letteratura, infatti evidenziano una positività al TF nel 10- 20% nei gliomi di grado I, fino al 43% nei grado II, 58-86% nei grado III, fino ad arrivare al 95% nei grado IV [64,65].

Il sistema coagulativo può essere attivato anche in maniera indiretta ad esempio mediante la produzione e secrezione di citochine proinfiammatorie quali il TNF- α e IL-1 β che sono in grado di indurre l'espressione di TF da parte delle cellule endoteliali e di ridurre l'espressione di Trombomodulina (TM). La riduzione della TM porta ad una ridotta attivazione del sistema della Proteina C che può essere considerato uno dei più importanti sistemi ad azione anticoagulante

dell'organismo. L'aumento del TF determina un'alterazione del normale equilibrio antitrombotico proprio dell'endotelio che, quindi, viene a trovarsi in uno stato protrombotico [66]. Le cellule tumorali, come ulteriore proprietà, sono in grado di secernere Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Questo porta ad un aumento della permeabilità microvascolare ed è in grado di promuovere la neoangiogenesi. Il VEGF è un mitogeno selettivo ed un fattore chemotattico sia per le cellule endoteliali che per i monociti-macrofagi. Esso è in grado, infine, di attivare numerosi geni tra cui quello del TF.

Le cellule tumorali possiedono, come aggiuntiva proprietà protrombotica, quella di regolare il sistema fibrinolitico. Sono, infatti, in grado sia di attivare la fibrinolisi mediante l'espressione di Urokinasi (u-PA) e Attivatore Tissutale del plasminogeno (t-PA), sia di produrre un aumento della concentrazione plasmatica degli inibitori 1 e 2 dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1, PAI-2). Questo determina una riduzione dell'attività fibrinolitica e aumento dello stato protrombotico. Le cellule tumorali posseggono molecole di adesione di superficie e sono in grado di aderire direttamente alle cellule endoteliali, alle piastrine e ai leucociti mediante molecole di adesione. L'adesione determina l'attivazione di queste cellule e ciò induce localmente la formazione di fibrina. Tramite il rilascio di citochine, la cellula neoplastica può promuovere l'adesione di macrofagi e piastrine. L'adesione delle cellule maligne, sia tra loro che all'endotelio vascolare, può essere implicata nello stravasamento, nella migrazione e disseminazione cellulare. Le piastrine, attivate dalle cellule tumorali, subiscono un aumento della capacità aggregante e una riduzione dell'emivita. Recentemente stanno emergendo ulteriori proprietà del TF. Il TF potrebbe avere la capacità di modulare la produzione di VEGF da parte delle cellule tumorali e questo determinerebbe una spinta alla neovascolarizzazione tumorale. Questo meccanismo costituirebbe un link importante tra lo stato pro-trombotico e infiammatorio determinato dal tumore e la crescita e diffusione del tumore stesso [67,68]. I meccanismi molecolari accennati, sommati ad altri fattori

generali quali: come la stasi da compressione venosa determinata dalle masse tumorali, la presenza di uno stato infiammatorio, le infezioni, e l'allettamento, contribuisce allo stato di ipercoagulabilità dei pazienti oncologici [69].

4.4.Problemi diagnostici

La presentazione clinica di una trombosi può essere caratterizzata da alcuni sintomi classici come dolore, rossore, tumefazione e maggiore rappresentazione dei circoli venosi superficiali a carico del distretto interessato, febbre.

Oltre a questi segni individuabili all'ispezione esistono altri segni evocabili, ad esempio il dolore al gastrocnemio stimolato dalla dorsiflessione passiva del piede (segno di Homans) oppure il dolore alla palpazione del polpaccio o del tallone (segno di Bauer) ecc.

Il solo quadro clinico, tuttavia, non permette la diagnosi di trombosi, infatti il 50% dei pazienti colpiti non presenta alcun segno e, per contro, tra i pazienti che mostrano segni clinici di trombosi se ne ha l'effettivo riscontro in meno del 25% dei casi. Per meglio comprendere quanto siano aspecifiche le manifestazioni cliniche di TEV basti pensare che i segni clinici compatibili con tale quadro sono presenti in 4-5 per mille abitanti.

Esistono nella pratica clinica degli scores utilizzabili per valutare il rischio di TEV, come per esempio il Wells score (Fig. 2). In base al punteggio attribuito al paziente si deduce il rischio di tromboembolismo venoso e si procede all'esecuzione di esami diagnostici (Fig. 3) [70,71,72].

Clinical feature	Score
Active cancer	1
Paralysis, paresis, or recent plaster immobilization of the lower extremity	1
Recently bedridden for more than 3 days or major surgery within 12 weeks	1
Localized tenderness along the distribution of the deep venous system	1
Entire leg swollen	1
Calf swelling by more than 3 cm when compared with the asymptomatic leg	1
Pitting oedema (greater in the symptomatic leg)	1
Collateral superficial veins (nonvaricose)	1
Alternative diagnosis as likely or more possible than that of deep venous thrombosis	-2

Well's score: ≥ 3	alta probabilità di ETV
1 o 2	probabilità intermedia di ETV
≤ 0	bassa probabilità di ETV

Fig. 2 : Wells score.

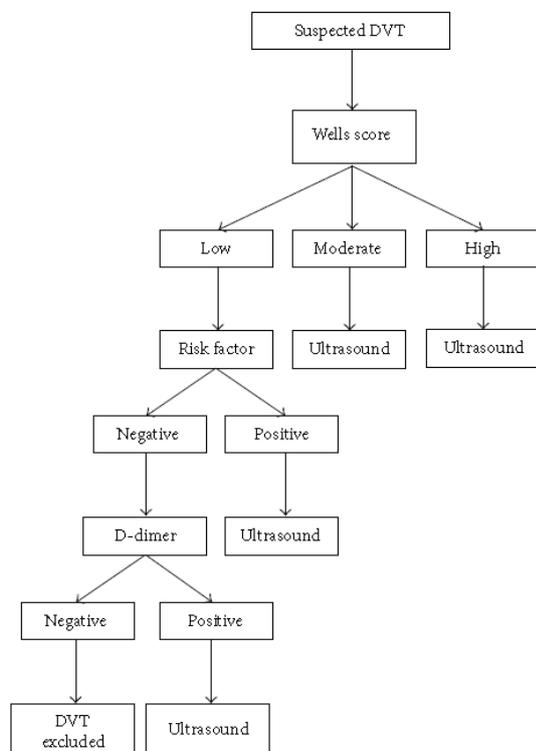


Fig. 3: algoritmo decisionale in presenza di un sospetto di TEV[74]

5.D-dimero

Il D-dimero costituisce il prodotto di degradazione, da parte del sistema fibrinolitico, della fibrina stabilizzata, cioè la fibrina resa stabile dai legami covalenti operati dal fattore XIII attivato dalla trombina circolante. Il D-dimero è normalmente dosabile nel plasma di soggetti sani in quanto esiste un continuo equilibrio tra attivazione della cascata coagulativa e conseguente formazione di fibrina e inibizione della trombina circolante e lisi della fibrina stabilizzata (bilancia emostatica). Il D-dimero ha un'emivita di 4-6 ore; esso può essere aumentato in alcune condizioni fisiologiche come nel periodo neonatale, nell'età avanzata o in gravidanza. I valori alterati di D-dimero presenti in gravidanza riflettono un reale stato di ipercoagulabilità che interessa questa condizione. Al terzo trimestre è possibile riscontrare valori di D-dimero cinque volte superiori rispetto ai livelli pregestazionali [75,76]. I determinanti della concentrazione plasmatica del D-dimero sono: l'entità della formazione e deposizione di fibrina stabilizzata, l'entità dell'attività del sistema fibrinolitico, la clearance dei prodotti di degradazione della fibrina e un'eventuale terapia anticoagulante in atto. I farmaci anticoagulanti riducono la formazione e deposizione di fibrina e di conseguenza si riducono i livelli di D-dimero come suo prodotto di degradazione. I livelli di D-dimero circolante sono aumentati in presenza di un processo coagulativo, tuttavia, una sua aumentata concentrazione plasmatica non consente attualmente diagnosi certa di trombosi[77]. Essendo il dosaggio del D-dimero plasmatico dotato di un'elevata sensibilità e una bassa specificità, l'informazione che il clinico ricava ha un alto valore predittivo negativo. Possibili fonti di D-dimero sono: trombi venosi; trombi arteriosi; fibrina extravascolare (liquido ascitico); ferite chirurgiche; estese lesioni cutanee (es.: contusioni, ematomi ecc.); lesioni aterotrombotiche. Attualmente, nonostante gli sforzi volti ad individuare un range di normalità dei valori di D-dimero plasmatico, tale dato ha uno scarso impatto nella pratica clinica [78]. Molto più importante è il valore che il D-dimero ha nella diagnosi di esclusione di eventi

tromboembolici. Il dosaggio del D-dimero plasmatico risente, ovviamente, della sensibilità dei diversi tests disponibili, tuttavia, in letteratura si ricava come valore cut-off la concentrazione di 500 µg/L. In considerazione delle “fisiologiche” variazioni del D-Dimero in funzione dell’età, la tendenza attuale è volta a considerare il valore di D-dimero in relazione all’età del paziente. Dopo i 50 anni di età è stato proposto di non considerare un valore cut-off standard ma di applicare una piccola formula matematica ($\text{anni di età} \times 10\mu\text{g/L}$) per meglio interpretare il dato di laboratorio [80]. I metodi per dosare la concentrazione plasmatica di D-dimero sono molteplici: metodi ELISA; metodi di agglutinazione semiquantitativi; metodi di agglutinazione quantitativi (fotometrici o turbidimetrici); metodi che impiegano sangue in toto.

Il valore di D-dimero che pure presenta un elevato valore predittivo negativo può, in alcuni casi di trombosi o embolia polmonare, essere poco o per nulla alterato. I valori di D-dimero si abbassano se è in corso una terapia anticoagulante o se l’evento trombotico è occorso da alcuni giorni, quindi il suo valore è inversamente proporzionale alla durata dei sintomi ed è stato dimostrato che ad una o due settimane dall’evento trombotico la concentrazione plasmatica di D-dimero può essere un quarto di quella iniziale [80,81].

Sulla base di queste considerazioni numerosi studi hanno dimostrato che la diagnosi di ETV si ottiene combinando score clinico a dosaggio del D-Dimero e a esame eco-color Doppler [82].

6. Microparticelle

6.1. Definizione e meccanismo fisiopatologico

Le Microparticelle (MPs) sono microvescicole di diametro compreso tra 0,1 e 1µm che possono derivare dalle membrane di diversi tipi cellulari: piastrine, cellule endoteliali e monociti, ma anche globuli rossi, granulociti, linfociti e cellule tissutali, tuttavia le MPs di origine piastrinica (PMP) sono il 70-90% delle MPs totali circolanti [83]. Le MPs circolanti mostrano una certa

eterogeneità, differendo per dimensione, composizione antigenica e proprietà funzionali [84]. Oltre alle MPs, nel torrente circolatorio sono presenti altre particelle di origine cellulare: corpi apoptotici ed exosomi. La formazione delle MPs avviene sostanzialmente attraverso due processi: l'attivazione cellulare e l'apoptosi [85].

L'attivazione cellulare può avvenire attraverso il legame, da parte di diversi agonisti (collagene, trombina o ADP), a specifici recettori di membrana. Il legame tra agonista e recettore di membrana attiva i recettori transmembrana e si ha la trasmissione del segnale a livello intracellulare. L'attivazione cellulare, a sua volta, porta all'aumento della concentrazione citosolica di calcio prevalentemente nel sito di vescicolazione. Il calcio attiva la Calpaina che degrada le proteine del citoscheletro cellulare con destabilizzazione della membrana e conseguente inizio del processo di vescicolazione e rilascio della MPs. L'apoptosi o morte cellulare programmata è caratterizzata da contrazione della membrana cellulare, condensazione del nucleo e successiva frammentazione del DNA e rilascio MPs e di corpi apoptotici. Le Caspasi intracellulari svolgono un ruolo determinante nel processo apoptotico. La Caspasi 3, in particolare, attiva la Kinasi ROCK 1, responsabile del rilascio delle microvescicole apoptotiche [86].

La membrana delle MPs è costituita prevalentemente da lipidi e proteine e le specifiche differenze nella composizione dipendono principalmente dal tipo cellulare da cui le MPs originano e dal processo di formazione [87].

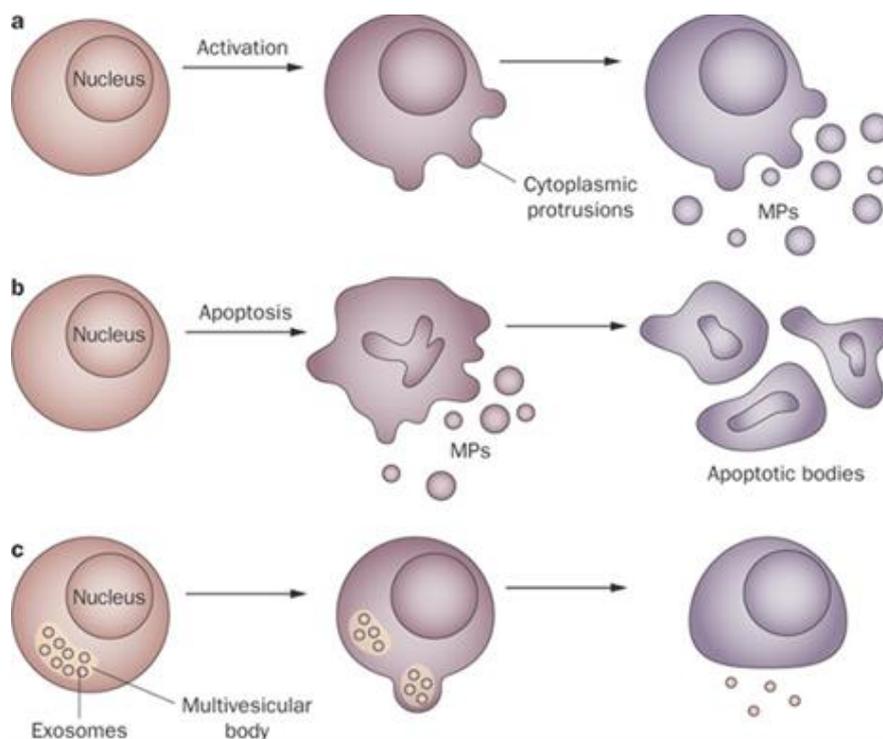


Fig. 4. Beyer, C. & Pisetsky, D. S. (2009)
Nat. Rev. Rheumatol. doi:10.1038/nrrheum.2009.229

Le MPs sono circondate da un bilayer lipidico formato da Fosfatidilcolina (PC) e Sfingomieline (SM), nello strato esterno della membrana, e Fosfatidilserina (PS) e Fosfatidiletanolamina (PE), nello strato interno. Il bilayer lipidico cellulare presenta la caratteristica di essere asimmetrico. Nel momento in cui avviene l'attivazione cellulare o l'apoptosi si ha la perdita dell'asimmetria da parte del bilayer lipidico per traslocazione PS e PE sullo strato esterno della membrana. Questo particolare determina la formazione di microvesicole che espongono cariche negative all'esterno ed è importante nei meccanismi protrombotici in cui le MPs sono implicate [88,89].

Le MPs hanno destato un crescente interesse negli ultimi anni e i molteplici studi condotti hanno contribuito a mettere in luce le loro principali proprietà funzionali. E' stato dimostrato un loro ruolo fondamentale nei meccanismi coagulativi, nei processi infiammatori e nelle funzioni endoteliali, tuttavia molti aspetti rimangono ancora oscuri [90].

Le proprietà procoagulanti delle MPs sono state osservate e descritte sia in vivo che in vitro. Questa capacità deriva dalla presenza delle cariche negative dei fosfolipidi sulla superficie esterna. I fattori della coagulazione, in presenza di calcio, legano, tramite il Gla-domain, i fosfolipidi dando luogo ai complessi tenasi e protrombinasi. Le MPs che espongono il TF, poi, sono in grado di attivare in maniera diretta la cascata coagulativa [91]. E' stato dimostrato come la presenza del TF sulla superficie delle MPs possa intervenire nell'accrescimento del trombo contribuendo all'incremento della deposizione di fibrina. Numerosi autori, avvalendosi di tecniche ELISA e citofluorimetriche, hanno descritto la presenza della glicoproteina TF sulla superficie delle MPs. Pur essendo, questo, un dato interessante, assume una rilevanza limitata per il fatto che queste tecniche non sono in grado di fornire informazioni in merito all'attività funzionale svolta da questa proteina quando associata alla superficie delle MPs. In uno studio del 2006, Keuren e collaboratori, ha dimostrato, tramite test di trombino-generazione e di generazione del fattore X attivato è stato dimostrato che il plasma contenente MPs e TF esprimeva un potenziale protrombotico di circa 15 volte maggiore rispetto ai plasmi di controllo, inoltre tale potenziale si rilevava solo nel plasma dei soggetti in cui l'inibitore del fattore tissutale (TFPI) era stato neutralizzato. Gli stessi autori, mediante tecniche di citofluorimetria per la determinazione del numero, dell'origine cellulare e dell'eventuale espressione del TF da parte delle MPs, hanno dimostrato che solo il 10% delle MPs circolanti esprimono il TF.

Per le caratteristiche proprie, di "TF circolante", questa glicoproteina sembra avere un ruolo decisivo nella formazione del trombo in caso di lesioni vascolari di minima entità o nei casi di trombosi venosa profonda da stasi [92].

L'origine del TF sulla superficie delle MPs rimane un elemento ancora da chiarire. E' oggetto di discussione se questa glicoproteina venga presentata in superficie in seguito a stimoli infiammatori o trombotici o se sia espressa in maniera costitutiva.

Le MPs possono promuovere la coagulazione, oltre che in maniera diretta, anche con meccanismi indiretti. Infatti le PMPs esprimono sulla loro superficie un'importante molecola di adesione intercellulare che trasloca sulla superficie di membrana delle piastrine attivate: la P-Selectina. Le PMPs che espongono la P-Selectina aderiscono ai monociti mediante legame con PSGL-1 ed inducono l'espressione di TF da parte del monocita stesso [93].

In vivo, un riscontro di MPs elevate si è trovato in diverse situazioni patologiche caratterizzate da uno stato di ipercoagulazione (*Tabella II*), per esempio malattie autoimmuni, disordini cardiovascolari, coagulazione intravascolare disseminata e nella malattia tromboembolica venosa. Per esempio nei pazienti affetti da sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS) si sono osservati livelli di MPs di origine endoteliale (EMPs) più elevati, sia rispetto ad una coorte di soggetti sani, sia rispetto ad un gruppo di soggetti con positività sierologica per gli anticorpi antifosfolipidi [94].

Oltre alle influenze sui meccanismi coagulativi, le MPs sono in grado di attivare e stimolare direttamente le altre cellule a produrre mediatori dell'infiammazione. Stimolano, per esempio, il rilascio di citochine da parte delle cellule endoteliali, favorendo così il signalling per i leucociti [95]. Sottogruppi di MPs espongono sulla loro superficie C1q, C3, C4 suggerendo un ruolo diretto nell'attivazione del sistema del complemento. Un aumento delle MPs è stato evidenziato in numerose patologie infiammatorie come ad esempio la sepsi [97], la multiorgan failure [98], le fasi attive dell'artrite reumatoide e il LES. Tutte le condizioni patologiche citate presentano valori aumentati di MPs piastriniche, endoteliali e granulocitarie.

Per completezza è utile citare il ruolo svolto dalla MPs nella regolazione della funzione endoteliale. In letteratura vi è estesa documentazione sugli aumentati livelli di MPs, soprattutto di origine linfocitaria e monocitaria, in pazienti affetti da malattia arterosclerotica e da sindromi coronariche [98,99]. Elevati livelli di MPs endoteliali (EMPs) sono stati rilevati anche in soggetti con ipertensione

arteriosa severa, stenosi aortica serrata [100] e nell'ipertrigliceridemia post-prandiale.

Uno studio pubblicato nel 2001, di Minagar, ha evidenziato che l'incremento dei livelli plasmatici di MPs può essere considerato marcatore di attività di patologie neurologiche quali la vasculopatia ischemica cerebrale e la sclerosi multipla [101].

7. Trattamento del tromboembolismo venoso nei pazienti con glioma di alto grado

In passato, nei pazienti con glioma di alto grado che sviluppavano un episodio trombo embolico venoso, si ricorreva di preferenza al posizionamento del filtro cavale piuttosto che al trattamento con farmaci anticoagulanti. Questa preferenza derivava da un supposto alto rischio di emorragie derivante dalla terapia anticoagulante [102,103,104].

Successivamente è stato dimostrato che il rischio di sanguinamento in questi pazienti era sovrastimato e che le terapie anticoagulanti possono essere impiegate. Anzi, i rischi derivante dal filtro cavale (aumentato rischio di VTE; trombosi cavale; trombosi del filtro stesso; sindrome postflebitica ecc), che nella popolazione generale hanno un tasso del 10%, nei pazienti con glioma di alto grado si manifestano nel 62% del totale. Il rischio di emorragia intratumorale in caso di terapie anticoagulanti è, invece, del 2%. La controindicazione assoluta alla terapia anticoagulante nei pazienti con glioblastoma è costituita, ovviamente, da sanguinamenti in atto o recenti, quindi è consigliabile eseguire una TC cerebrale prima di intraprendere il trattamento anticoagulante. Nei pazienti con glioma di alto grado sono controindicate le terapie trombolitiche in caso di fatti embolici.

Numerosi studi hanno dimostrato che le terapie con eparine a basso peso molecolare (EBPM) (dalteparina, enoxaparina, o tinzaparina) costituiscono

l'attuale gold standard per il trattamento del TEV in pazienti oncologici. Le linee guida più autorevoli (della Società Americana di Oncologia, della Società Europea di Oncologia Medica, dell'American College of Chest Physicians e del National Cancer Comprehensive Network) raccomandano la terapia con EBPM rispetto alla terapia con warfarin, come trattamento di scelta per il TEV nei pazienti oncologici [105,106].

7.1. Aspetti prognostici

Nei pazienti con neoplasia gli eventi trombotici costituiscono la seconda causa di morte [107] e la diagnosi di TEV entro un anno dalla diagnosi di neoplasia è un predittore significativo di morte [108]. Nei pazienti con TEV, il rischio di morte dopo l'evento acuto è 8 volte maggiore se il paziente è neoplastico, rispetto al non neoplastico. Per l'alto rischio di recidiva, che persiste per molti anni dopo l'evento iniziale, la TEV può essere considerata alla stregua di una malattia cronica [109]. In uno studio prospettico pubblicato nel 2002, Prandoni ha sottoposto a follow-up 842 pazienti con TEV, neoplastici e non, al fine di valutare il rischio di recidiva o di sanguinamento durante la terapia anticoagulante. I 181 pazienti che avevano una neoplasia hanno mostrato un'incidenza di recidiva di TEV 3.2 volte più alta rispetto ai pazienti senza neoplasia (20.7% versus 6.8%, rispettivamente) [110].

8.Scopo dello studio

Lo studio si compone di 2 fasi: nella prima fase l'obiettivo è stato valutare l'incidenza delle ETV nell'immediato post operatorio e l'iter diagnostico normalmente seguito nella nostra Struttura in una coorte di pazienti al fine di quantificare nella nostra popolazione standard l'evento ETV.

Nella seconda fase l'obiettivo è stato determinare i livelli basali di MPs circolanti nei pazienti trattati per GBM rispetto ai controlli e l'andamento nel tempo delle MPs circolanti per un follow-up massimo fino a 7 mesi per valutare la correlazione tra microparticelle circolanti e malattia tromboembolica venosa e l'eventuale correlazione tra la loro concentrazione plasmatica e lo stato di malattia (ripresa o progressione) per definirne il potenziale impiego come markers di malattia.

9. Fase I: tromboembolismo venoso durante la prima settimana post-operatoria in pazienti operati per neoplasia cerebrale primitiva

9.1.Materiali e metodi

9.1.1.Criteri di arruolamento:

Tra il 2011 e il 2014 sono stati reclutati 57 pazienti ricoverati presso la Neurochirurgia di Padova per intervento programmato di craniotomia per neoplasia cerebrale primitiva. Tutti i pazienti avevano un'età > 18 anni, una diagnostica neuroradiologica suggestiva per glioma di alto grado (astrocitoma IV secondo la classificazione WHO) o meningioma successivamente confermata dall'esame istologico e assenza di TEV all'Ecodoppler preoperatorio agli arti inferiori.

9.1.2. Variabili cliniche:

Per ogni paziente sono stati annotati i più comuni fattori anamnestici che espongono a rischio trombotico: fumo, obesità (Body Mass Index >30), precedenti ETV, familiarità per ETV, ipertensione arteriosa, dislipidemie, diabete ed eventuale presenza di paresi ed il rischio pre-operatorio trombotico per tutti i pazienti è stato calcolato secondo il Well's score. Tra i fattori post operatori che aumentano il rischio di sviluppare TEV sono stati considerati la durata dell'intervento chirurgico, lo sviluppo o peggioramento di eventuali paresi e il periodo di degenza. Durante il ricovero, tutti i pazienti hanno ricevuto profilassi antitrombotica con eparina a basso peso molecolare (enoxaparina 4000 UI s.c. / die), compressione pneumatica intermittente durante la procedura chirurgica e per le 48 ore successive all'intervento chirurgico e ripresa della terapia con EBPM a dosi profilattiche in II giornata post operatoria.

Analisi di laboratorio:

In collaborazione con i colleghi della Clinica Medica II, i pazienti sono stati sottoposti preoperatoriamente, in III ed in VII giornata postoperatoria a dosaggio di: D-dimero, Fibrinogeno, Piastrine plasmatiche, INR, PTT, globuli bianchi ed emoglobina. I pazienti sono stati sottoposti a doppler venoso preoperatorio e in settima giornata postoperatoria.

9.2. Analisi statistiche

Per l'analisi statistica dei dati sono stati utilizzati il test T di Student per le variabili quantitative, il Chi quadrato per le variabili di tipo qualitativo (sesso, tipo di neoplasia, nuova diagnosi / recidiva, familiarità o pregressa storia di eventi trombotici e presenza o meno di paresi) e l'analisi della varianza per misure ripetute (test di Mann-Whitney). Infine, attraverso il modello di regressione logistica è stata valutata la predittività dei valori del Dimero nel

tempo rispetto all'insorgenza di TEV. La significatività statistica è stata considerata per valori di $p < 0,05$.

9.3. Risultati

Sono stati considerati 57 pazienti (M=28, F=29) di età media pari a 60.9 ± 11.14 anni (mediana=63, range: 36-81). 33 pazienti sono stati operati per glioblastoma (57,9%) e 24 per meningioma (42,1%) e la presenza di ETV è stata dimostrata in 10 pazienti (17,5%). Tutte le TEV sono state diagnosticate mediante Ecodoppler eseguito in VII giornata postoperatoria in assenza di segni o sintomi clinici suggestivi per trombosi venosa profonda. Tra i pazienti con ETV 2 erano stati operati per meningioma (8,3%) e 8 per glioblastoma (24,2%). La durata media dell'intervento è stata di 4,27 ore per i meningiomi e di 3,28 ore per i glioblastomi.

Per quanto riguarda la dicotomizzazione per sesso, tipo di neoplasia (meningioma vs glioma), ipertensione arteriosa, dislipidemia, presenza di paresi, familiarità per precedenti episodi di TEV, obesità e storia di fumo o diabete, durata dell'intervento chirurgico ed insorgenza di TEV non è stata evidenziata una significatività statistica.

Considerando i dosaggi ematici effettuati, invece, il valore medio del D-Dimero è risultato significativamente più alto nel gruppo di pazienti che ha sviluppato la TEV. In particolare il D-Dimero è risultato essere più alto nei pazienti che hanno sviluppato la complicanza trombotica già nel pre-operatorio in assenza di TEV all'Ecodoppler venoso (948.600 ± 1489.968 ug/L vs 223.696 ± 235.160 ug/L, $p=0.002$). Successivamente questa differenza significativa nei due gruppi si è mantenuta anche in III e VII giornata post operatoria ($p=0.007$ e < 0.001 , rispettivamente).

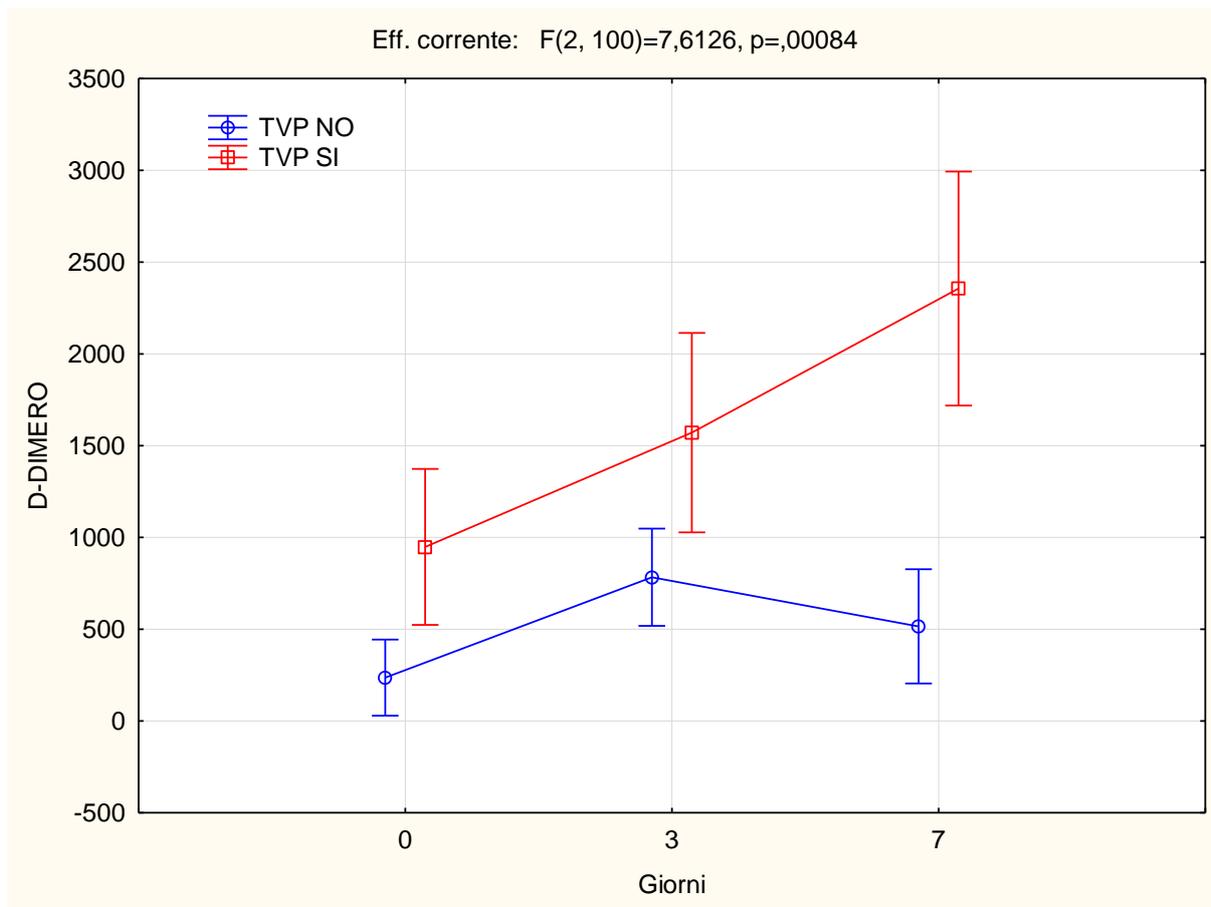
Per quanto riguarda gli altri fattori dosati abbiamo documentato una differenza statisticamente significativa dei valori medi delle piastrine preoperatoriamente ed in III giornata post operatoria e dell'INR in VII giornata post operatoria (Tab. 2).

Tab. 2: confronto dei valori plasmatici dei parametri presi in esame e significatività delle differenze di concentrazione tra pazienti con TEV (tromboembolismo venoso) e non.

	Media		p	N casi		D.S.	
	NO TEV	TEV		NO TEV	TEV	NO TEV	TEV
D-dimero 1 pre	223,6957	948,600	0,002166	46	10	235,1603	1489,968
D-dimero 2-post 3gg	752,9111	1571,100	0,007220	45	10	682,6516	1360,843
D-dimero 3-post 7gg	548,1111	2356,100	0,000003	45	10	469,2725	2186,125
PLT 1 pre	217,6304	170,500	0,004164	46	10	46,8213	35,535
PLT 2 post 3gg	198,9787	156,600	0,048997	47	10	57,7248	72,785
PLT 3 post 7gg	215,6364	184,556	0,217057	44	9	62,0596	93,563
INR 1 pre	1,0463	1,076	0,138842	46	10	0,0578	0,051
INR 2 post 3gg	1,0451	1,079	0,168272	47	10	0,0680	0,078
INR 3 post 7gg	1,0177	1,075	0,002844	44	10	0,0512	0,057
PTT 1 pre	24,0000	22,900	0,221522	47	10	2,5367	2,644
PTT 2 post 3 gg	24,2766	24,200	0,947016	47	10	3,0695	4,264
PTT 3 post 7gg	22,6136	21,200	0,081357	44	10	2,3349	1,932
Fibrinogeno 1 pre	3,0150	3,060	0,915071	40	10	1,0189	1,737
Fibrinogeno 2 post 3gg	3,7500	3,950	0,642708	42	10	1,0782	1,715
Fibrinogeno 3 post 7gg	4,8575	3,667	0,049205	40	9	1,6578	1,272
età all'intervento	59,8298	66,200	0,101042	47	10	11,4841	7,815

Analizzando l'andamento nel tempo del valore medio del D-Dimero si è evidenziata una alta significatività ($p=0.0008$) per l'effetto di interazione gruppo+tempo e una significatività anche per l'effetto del gruppo ($p=0.00002$) (Fig 5).

Fig. 5: andamento delle concentrazioni di D-dimero nei pazienti con e senza complicanze tromboemboliche



Infine, abbiamo esaminato gli incrementi dei valori del D-Dimero rispetto allo sviluppo di TEV (Fig.6) ottenendo un'informazione significativa sia nella differenza fra il D-Dimero in VII ed in III giornata ($p=0.0005$) sia in VII giornata post operatoria rispetto ai valori preoperatori ($p=0.004$).

Fig.6: incremento dei valori di D-dimero nei pazienti con TEV e non.

	Media		P	N casi		D.S.	
	NO TEV	TEV		NO TEV	TEV	NO TEV	TEV
Dimero 2-1	529,136	622,500	0,757779	44	10	695,1549	1400,232
Dimero 3-2	-261,605	785,000	0,000525	43	10	702,8562	1169,822
Dimero 3-1	320,045	1407,500	0,004934	44	10	494,9315	2299,022

Con un modello di regressione logistica abbiamo analizzato i valori di D-Dimero pre operatori, al III e VII giorno post operatorio, PLT ed età: solo il D-Dimero è risultato significativo. Abbiamo quindi valutato una « predittività

precoce » (capacità di identificare coloro che svilupperanno una TEV sulla base dei valori del D-Dimero pre operatori ed in III giornata post operatoria) ed una « predittività tardiva », considerando i valori di D-dimero in VII giornata post operatoria.

La « predittività precoce » è risultata estremamente bassa con una capacità di identificare l'evento TEV solo nel 20% dei casi.

Tab. 3: predittività precoce del valore di D-dimero

		Valori previsti			
		TEV (0=NO, 1=SI)		Percentuale di correttezza	
		0	1		
	Osservate				
Fase 1	TEV (0=NO, 1=SI)	0	46	0	100,0
		1	8	2	20,0
Percentuale globale					85,7

a. Il valore di divisione è ,500

La « predittività tardiva » invece, calcolata utilizzando i valori di D-Dimero in VII giornata post operatoria, è risultata 40% con una percentuale di correttezza del 97.7%

Tab.4: predittività tardiva del valore di D-dimero

		Valori previsti			
		TEV (0=NO, 1=SI)		Percentuale di correttezza	
		0	1		
	Osservate				
Fase 2	TEV (0=NO, 1=SI)	0	43	1	97,7
		1	6	4	40,0
Percentuale globale					87,0

a. Il valore di divisione è ,500

10. Fase II: microparticelle circolanti (MPs) nei pazienti con glioma cerebrale di alto grado

10.1. Materiali e metodi

10.1.1 Criteri di arruolamento

Abbiamo arruolato pazienti con nuova diagnosi di glioblastoma multiforme ricoverati nella Neurochirurgia del nostro centro. I pazienti sono stati sottoposti a visita medica con prelievo ematico prima dell'intervento chirurgico di asportazione della neoplasia cerebrale e successivamente dopo 1, 4 e 7 mesi dalla diagnosi per i pazienti con diagnosi di glioblastoma. Sono stati registrati prospetticamente gli eventi tromboembolici venosi e l'andamento della malattia neoplastica (remissione, progressione, exitus).

Un gruppo di controllo è stato arruolato presso il reparto di Clinica Medica 2 nello stesso periodo dell'arruolamento dei casi.

I pazienti sono stati considerati eleggibili per lo studio se rispondenti ai seguenti criteri:

- età maggiore di 18 anni;
- firma del consenso informato;
- nuova diagnosi confermata di glioblastoma multiforme.

Criteri di esclusione dallo studio:

- età minore di 18 anni;
- rifiuto di firmare il consenso informato;
- Karnofsky Performance status < 60%;
- aspettativa di vita < 3 mesi

- gravidanza/puerperio;
- trattamento anticoagulante in atto;
- infezione acuta e sepsi in atto;
- trombosi venosa o arteriosa nei 3 mesi precedenti;
- intervento chirurgico nel mese precedente;
- insufficienza epatica e renale acuta;

La diagnosi radiologica ottenuta mediante RM cerebrale è stata successivamente confermata dall'analisi istologica post-operatoria. Dopo l'arruolamento, tutti i pazienti sono stati sottoposti a craniotomia e resezione della massa tumorale. Sulla base del dato intraoperatorio e dell'immediato controllo radiologico postoperatorio (TC cerebrale senza e con mezzo di contrasto eseguita nell'immediato postoperatorio), i pazienti sono stati divisi in due gruppi: il primo costituito dai pazienti sottoposti a resezione totale (definita come assenza di captazione all'esame con mezzo di contrasto post operatorio); il secondo gruppo da quelli con resezione subtotale (con residuo tumorale documentato dalla captazione di mezzo di contrasto). Entro 6 settimane dall'intervento, tutti i pazienti hanno ricevuto le terapie adiuvanti secondo il protocollo Stupp. I pazienti hanno ricevuto inoltre terapia con desametasone per il trattamento dell'edema cerebrale, farmaci antiepilettici per la profilassi di eventi comiziali, e farmaci antiemetici. Durante la loro permanenza in ospedale, tutti i pazienti hanno ricevuto profilassi antitrombotica con eparina a basso peso molecolare (enoxaparina 4000 U s.c. al giorno), con compressione pneumatica intermittente durante la procedura chirurgica e per le 48-72 h successive.

Gli eventi trombotici venosi sono stati diagnosticati mediante esecuzione di EcoDoppler venoso degli arti inferiori (trombosi venosa profonda prossimale o distale, trombosi venosa superficiale), Angio-TC polmonare o Scintigrafia polmonare perfusoria (embolia polmonare), esami che venivano eseguiti, a discrezione del medico curante, sulla base della comparsa di una sintomatologia suggestiva per evento tromboembolico.

L'andamento della neoplasia cerebrale (eventuale recidiva o progressione) è stata valutata mediante esecuzione di RM cerebrale con contrasto di follow up.

10.1.2 Variabili

Abbiamo valutato:

- (1) lo stato coagulativo basale dei pazienti mediante analisi citofluorimetrica dei livelli di MPs totali, di origine piastrinica, endoteliale, leucocitaria, veicolanti il TF e di derivazione tumorale, e mediante test di trombinogenerazione (TG), i valori così ottenuti sono stati confrontati con quelli del gruppo di controllo;
- (2) l'andamento nel tempo dei vari sottotipi di MPs e del test di TG;
- (3) la possibile correlazione tra elevati livelli di MPs circolanti basali e successivo sviluppo di complicanze tromboemboliche venose, identificando nei valori plasmatici delle MPs un possibile meccanismo eziopatogenetico dello stato protrombotico proprio della malattia neoplastica .
- (4) la presenza di una possibile correlazione tra livelli basali di MPs e l'andamento della malattia neoplastica, per valutare il possibile ruolo delle MPs come biomarcatore prognostico.

10.1.3 Metodiche di laboratorio

A tutti i soggetti arruolati nello studio sono stati prelevati, da una vena antecubitale, 18 ml di sangue intero in una siringa preriempita con 2 ml di Na-Citrato 109 Mol. Il sangue così ottenuto è stato utilizzato per la determinazione, in ciascun soggetto arruolato, dei seguenti parametri: tempo di tromboplastina parziale attivato (aPTT), tempo di protrombina (PT), D-Dimero, mediante metodica standard con BCT-Analyser (Dade Behring, Marburg, Germania).

La conta piastrinica e leucocitaria è stata ottenuta mediante metodica automatizzata di routine (Sysmex Counter XE-2100 Dasit Spa, Milano).

Il sangue prelevato è stato sottoposto a duplice centrifugazione a 2500 giri per 15 minuti a temperatura ambiente, entro 3 ore dal prelievo; il plasma povero di piastrine (PPP) così ottenuto è stato subito stoccato in aliquote da 1,5 mL e congelato a -80° fino alle successive analisi.

10.1.3.1 Dosaggio delle microparticelle circolanti

Il dosaggio delle microparticelle circolanti è stato effettuato mediante citofluorimetria a flusso (FC500 flow cytometer, Beckman Coulter). Le MPs totali sono state identificate mediante caratteristiche dimensionali e marcatura con anticorpo monoclonale anti-Annessina V coniugato con FITC (Bender Med Systems GmbH, Vienna, Austria). I vari sottotipi di MPs sono stati identificati mediante marcatura con specifici anticorpi monoclonali contro antigeni di superficie cellulari [111]. In particolare, per l'analisi citofluorimetrica 30 µL di PPP sono stati incubati, per 15 minuti, a 20 °C, in ambiente buio, con 3 µL anti-Annessina V-FICT e con 3 µL di anticorpo monoclonale specifico per i diversi antigeni. A questo campione vengono aggiunti 30µL di Flow-Counts (FLOW-COUNT™ Fluorospheres, Beckman Coulter, USA), biglie dotate di fluorescenza che, aggiunte al campione prima dell'analisi citofluorimetrica, permettono il calcolo del numero assoluto di MPs presenti. Dopo incubazione di altri 15 minuti, tale soluzione viene successivamente diluita con 400 µL di Annexin-V kit binding buffer (Bender Med Systems GmbH, Vienna, Austria) prima dell'analisi al citofluorimetro.

Il “gate dimensionale” per microparticelle è stato ottenuto con le apposite biglie di polistirene (Megamix, BioCytex, Diagnostica Stago, Asnieres, France). Questa procedura ci ha permesso di discriminare unicamente elementi di dimensioni inferiori ad 1 µm.

In particolare per distinguere i diversi sottotipi di MPs abbiamo utilizzato i seguenti anticorpi monoclonali:

- anti- CD61-PE (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) per analizzare le MPs di origine piastrinica (PMP);
- anti-CD62E-PC5 (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) per le MPs di origine endoteliale (EMP);
- anti-CD45-PC5 (BioLegend Europe, Uithoorn, The Netherlands) per le MPs di origine leucocitaria (LMP);
- anti-CD142-PE (BD, Biosciences, Milano) per le MPs veicolanti TF (TF+MP)
- anti-GFAP (Glial fibrillary acidic protein)- FITC (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) per le MPs di derivazione gliale nei pazienti con glioblastoma multiforme (GFAP+)

10.1.3.2 Quantificazione dell'attività procoagulante delle MPs

L'attività procoagulante delle MPs è stata misurata mediante il test STA® Procoagulant Phospholipids assay (PPL, Diagnostica Stago). Il test misura il tempo di coagulazione dipendente dai fosfolipidi procoagulanti presenti in un campione. Il test viene eseguito con un substrato plasmatico povero di fosfolipidi per eliminare l'influenza di fattori della coagulazione monte. Il fattore Xa e il calcio presenti nel substrato, innescano la cascata coagulativa in un tempo che è dipendente solo dai fosfolipidi presenti nel plasma testato. Perciò, un accorciamento del tempo di coagulazione, misurato in secondi, di un campione indica un aumento della concentrazione di fosfolipidi procoagulanti. E' dimostrato che l'attività procoagulante misurata con il test PPL correla linearmente con l'attività funzionale di MP presenti nel campione [112,113].

10.1.3.3 Trombinogenerazione

Il test è stato eseguito mediante il metodo fluorimetrico Calibrated Automated Thrombogram® (CAT). Relativamente ad ogni campione sono stati dispensati 80 µl di PPP su due pozzetti di una piastra. In uno di essi sono stati aggiunti 20

μl di calibratore (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands) al fine di costruire una curva di calibrazione utile alla quantificazione della trombina generata nei due restanti pozzetti. Nel secondo pozzetto sono stati aggiunti 20 μl di buffer contenente TF e fosfolipidi, a concentrazioni finali nel pozzetto rispettivamente di 1 pM e 30 μM quali trigger della cascata coagulativa. Lo strumento avvia le reazioni coagulative in tutti i pozzetti dispensando 20 μl di reagente costituito da una miscela di calcio cloruro (CaCl_2) e substrato fluorogenico (Z-Gly-Gly-Arg-AMC, BACHEM AG, Bubendorf, Switzerland) in una concentrazione finale di 16 mM di CaCl_2 e 300 μM di substrato fluorogenico. La fluorescenza generata viene letta in un lettore Fluoroskan Ascent® (ThermoLab systems, Helsinki, Finland) e, mediante il confronto con la curva di calibrazione, viene calcolata la curva di generazione della trombina da parte di un Software Thrombinoscope (Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands) che fornisce anche i parametri descrittivi della curva.

10.2. Analisi statistiche

Le variabili parametriche sono state espresse mediante media \pm deviazione standard, quelle non parametriche (MPs, PPL clotting time, parametri di trombinogenerazione) mediante mediana ed intervallo interquartile, quelle nominali mediante frequenza. I confronti tra variabili sono stati calcolati mediante test t di Student per le parametriche, test di Mann-Whitney per le non parametriche e χ^2 per le differenze tra frequenze. La correlazione tra le diverse variabili è stata calcolata mediante test di Spearman. Per valutare l'effetto delle MPs nello sviluppo di TEV e nella progressione di malattia è stata utilizzata la regressione lineare di Cox. I dati sono stati censorizzati all'evento trombotico, alla morte, alla perdita nel follow-up o alla fine dell'osservazione. Sono stati considerati significativi livelli di $p < 0.05$. L'analisi statistica è stata condotta mediante il programma SPSS Statistics per Windows versione 19 (IBM Corp, Armonk, NY).

10.3 Risultati

Sono stati arruolati 25 pazienti consecutivi con nuova diagnosi di astrocitoma di IV grado (sec WHO) da gennaio 2011 a dicembre 2013, trattati presso il reparto di Neurochirurgia di Padova. Come controlli sono stati arruolati nello stesso periodo di tempo, presso il reparto di Clinica Medica 2 e previo consenso informato, 75 soggetti sani confrontabili ai casi per sesso ed età. Questo gruppo di soggetti di controllo è stato scelto tra gli accompagnatori non consanguinei dei pazienti afferenti alla Clinica Medica 2 per la diagnosi e cura delle coagulopatie trombotiche ed emorragiche.

Dei 25 pazienti consecutivi arruolati nello studio 14 (56%) erano maschi e 11 (44%) erano femmine. L'età media (\pm DS) della popolazione era 58.9 ± 15 anni.

Sedici (64%) dei pazienti sono stati sottoposti a resezione completa, 9 (36%) a resezione sub-totale. Il tempo medio di osservazione dei pazienti (mediana e range interquartile) è stato di 207 giorni (104-308 giorni). Sei (24%) pazienti hanno sviluppato un evento tromboembolico venoso; in particolare abbiamo osservato 4 trombosi venose profonde degli arti inferiori (2 prossimali e 2 distali), una trombosi venosa superficiale dell'arto inferiore ed una embolia polmonare fatale. Diciannove (76%) pazienti hanno avuto una progressione di malattia nel corso del follow-up e 15 (60%) sono deceduti. Come si evince dalla *Tabella 4* la popolazione dei controlli non differisce in maniera statisticamente significativa dai casi per età, sesso e BMI.

Tabella 4: caratteristiche della popolazione partecipante al nostro studio

	Glioblastoma multiforme N. 25	Controlli N. 75	p
Età -anni	58.9±15	56.0±11.8	<i>ns</i>
Sesso -n(%)			
Maschi -n(%)	14 (56)	41 (55)	<i>ns</i>
Femmine -n(%)	11(44)	34 (45)	<i>ns</i>
BMI -(Kg/m ²)	25.7 [22.9-27.4]	27.1 [19.3-29.1]	<i>ns</i>
KPS -n(%)			
90-100% -n(%)	10 (40)	-	-
60-80% -n(%)	15 (60)	-	-
Resezione chirurgica			
Completa -n(%)	16 (64)	-	-
Subtotale -n(%)	9 (36)	-	-
Durata media del follow-up -giorni	207 (104-308)	-	-
Eventi tromboembolici TEV -n(%)	6(24%)		
TVP prossimale -n	2		
TVP distale -n	2	-	-
TVS -n	1		
Embolia polmonare -n	1		
Progressione di malattia -n(%)	19 (76)	-	-
Decesso -n(%)	15 (60)	-	-

10.3.1 Dosaggio delle MPs circolanti e PPL clotting time

I pazienti con glioblastoma multiforme hanno mostrato un numero di MPs totali (Annessina V+) di 4029 [3359-5462] MP/ μ L, misurato come mediana e range interquartile, significativamente più elevato rispetto ai controlli (1714 [1010-2116] MP/ μ L, $p < 0.001$). Il tempo di coagulazione fosfolipide-dipendente (PPL clotting time) era significativamente più corto (52 [41-69] sec) nei casi rispetto ai controlli sani (69 [50-82] sec, $p < 0.01$). Il numero delle MPs totali correlava inversamente ed in maniera significativa, con il PPL clotting time ($r = 0.89$, $p < 0.01$) [Figura 7].

Per quanto riguarda i diversi sottotipi di MPs circolanti, i pazienti con glioblastoma multiforme hanno mostrato livelli significativamente più alti di PMP (540 [427-801] MP/ μ L) ed EMP (132 [99-202] MP/ μ L), rispetto ai controlli (354 [276-465] MP/ μ L, $p = 0.006$ e 71 [48-95] MP/ μ L, $p = 0.0001$). Infine i pazienti con glioblastoma multiforme hanno evidenziato livelli più alti di LMP (105 [72-125] MP/ μ L), TF+MP (106 [51-140] MP/ μ L) e MP di derivazione gliale (82 [51-104] MP/ μ L) rispetto ai controlli ($p < 0.001$ in tutti i confronti eseguiti) (Figura 8).

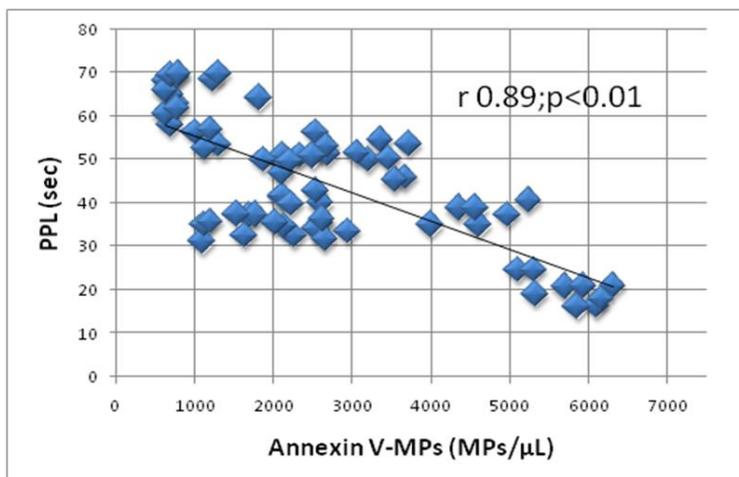


Fig. 7: Correlazione tra numero di MP totali, misurate mediante anticorpo monoclonale anti-Annessina V e PPL clotting time

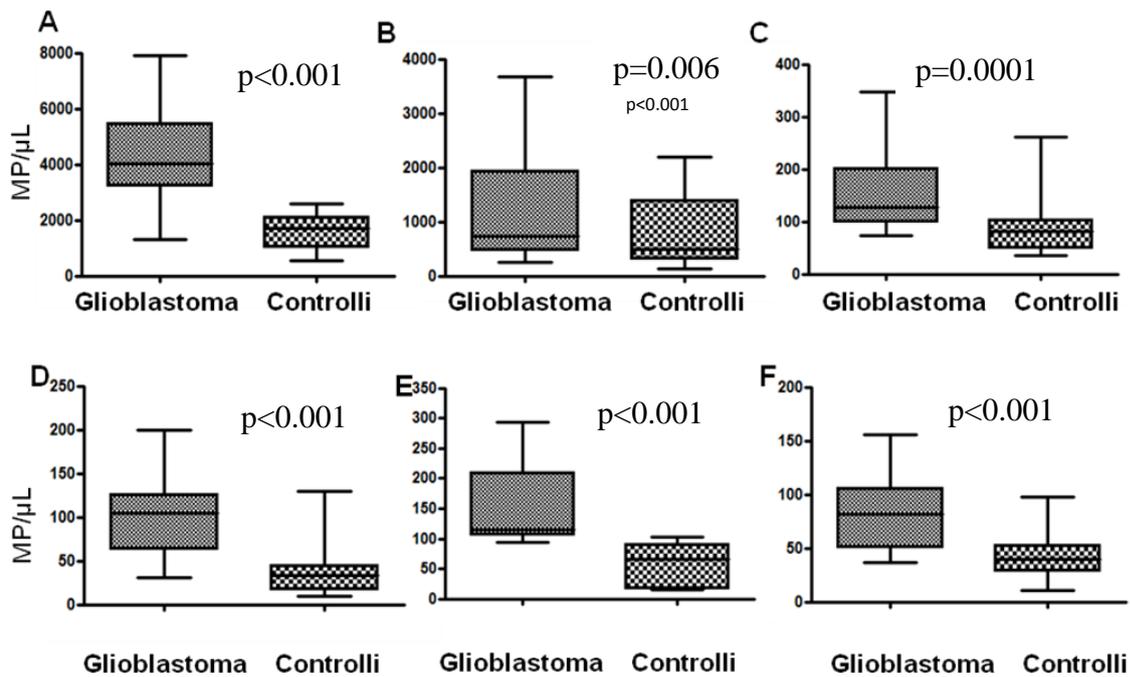


Fig. 8: Microparticelle plasmatiche circolanti nei pazienti con glioblastoma multiforme e nei controlli. A MP totali. B MP piastriniche. C MP endoteliali. D MP leucitarie. E TF+MP. F MP di derivazione gliale.

10.3.2 Trombinogenazione

La *Tabella 5* mostra i risultati del test di trombinogenazione. I casi (pazienti con glioblastoma multiforme) hanno mostrato Lag Time significativamente più corto (2 [2-2.33] min) rispetto ai controlli (2.67 [2.22-2.96] min, $p=0.001$), ETP (1186 [1097-1240] nM*min) e peak height (242 [224-271] nM) significativamente più alti rispetto ai controlli (1121 [705-965] nM*min e 202 [110-253] nM, rispettivamente) con $p=0.007$ e 0.022 rispettivamente.

	Glioblastoma multiforme N. 25	Controlli N. 75	p
LagTime - minuti	2 [2-2.33]	2.67 [2.22-2.96]	0.001
ETP - nM*min	1186 [1097-1240]	1121 [705-965]	0.007
Peak height - nM	242[224-271]	202 [110-253]	0.022

Tab. 5: Trombinogenazione nei pazienti con glioblastoma multiforme e nei controlli
I dati sono espressi in mediana a range interquartile. ETP Endogenous thrombin potential

10.3.3 MPs e trombosi venosa profonda

Nel corso dello studio 6 pazienti (24%) hanno sviluppato un evento tromboembolico venoso. Cinque degli eventi sono avvenuti entro il primo mese dalla diagnosi, uno è avvenuto al terzo mese. Questi pazienti hanno dimostrato livelli basali di TF+MP significativamente più alti (175 [100-198] MP/ μ L) rispetto ai pazienti che non hanno sviluppato TEV (139 [95-148] MP/ μ L, $p < 0.01$). La *Figura 9* mostra l'andamento dei livelli delle TF+MP nel corso dello studio nei pazienti con e senza TEV.

Per quantificare il rischio trombotico dei pazienti con elevati livelli basali di TF+MP abbiamo calcolato il 95° percentile dei livelli di TF+MP nella popolazione sana di controllo (97 MP/ μ L); i pazienti con glioblastoma multiforme e TF+MP basali maggiori a questo cut-off hanno mostrato un Hazard Ratio per TEV di 7.1 [1.18-33.2] rispetto ai pazienti con glioblastoma multiforme e TF+MP inferiori a 97 MP/ μ L [*Figura 9*].

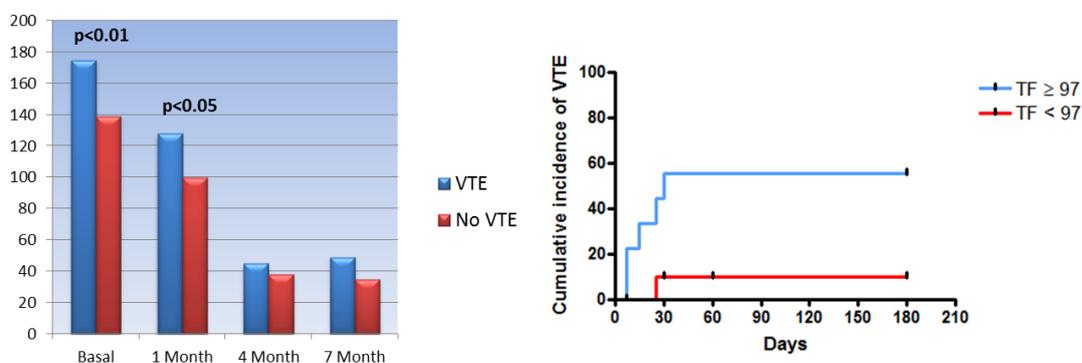


Fig. 9: Andamento delle microparticelle TF+ nel corso del follow-up nei pazienti con TEV versus non TEV ed HR per TEV nei pazienti con glioblastoma multiforme e TF+MP > 97 MP/ μ L.

10.3.4 MPs e progressione di malattia

Nel corso del follow-up dello studio 19 pazienti (76%) sono andati incontro a progressione di malattia. Questi pazienti hanno dimostrato livelli basali di TF+MP significativamente più alti (169 [108-201] MP/ μ L) rispetto ai pazienti che sono andati incontro a remissione (119 [100-134] MP/ μ L, $p < 0.001$). La *Figura 10* mostra l'andamento delle TF+MP nel corso dello studio nei pazienti con progressione e remissione di malattia. Anche i livelli di TF+MP a 7 mesi erano significativamente più alti nei pazienti con progressione di malattia (81 [64-124] versus 32 [22-40] MP/ μ L, $p < 0.001$).

I pazienti con glioblastoma multiforme e TF+MP basali maggiori del cut-off calcolato (97 MP/ μ L) hanno mostrato una mediana di sopravvivenza di 180 giorni versus i 210 giorni dei pazienti con TF+MP < 97 MP/ μ L con un HR per progressione di malattia non statisticamente significativo (1.9 [0.86-8.53])

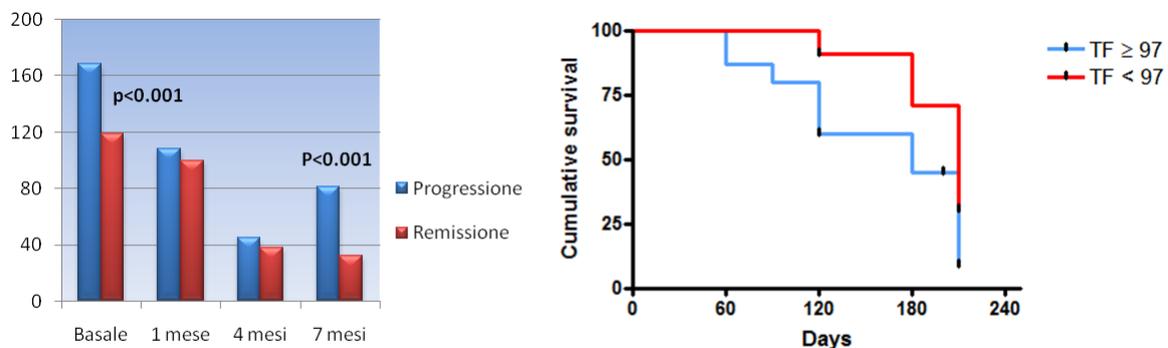


Fig. 10: Andamento delle microparticelle TF+ nel corso del follow-up nei pazienti con progressione di malattia versus remissione ed HR per progressione di malattia nei pazienti con glioblastoma multiforme e TF+MP > 97 MP/ μ L.

11. Discussione e conclusioni

Fase I

La correlazione tra neoplasia cerebrale e malattia tromboembolica venosa è nota ormai da molti anni. Si tratta di un problema di grande interesse, sia per l'elevata incidenza e sia per i risvolti prognostici che assume un evento TEV nel paziente con tumore cerebrale. In letteratura infatti viene riportata un'incidenza compresa tra il 3 ed il 60% entro le prime 6 settimane post operatorie nei pazienti affetti da GBM [55] e del 7.2% nei pazienti affetti da meningioma [114]. Nella nostra casistica abbiamo ritrovato dati analoghi a quelli descritti: infatti nel gruppo di pazienti operati per GBM vi è stato lo sviluppo di TEV nel 24.2% dei casi (8/33) e nell'8.3% dei pazienti trattati per meningioma (2/24). Gli episodi di ETV sono stati più frequenti nei pazienti affetti da glioma, rispetto ai pazienti operati per meningioma, tuttavia senza una significatività statistica verosimilmente a causa dell'esiguità del campione in esame.

Le modificazioni dei parametri della coagulazione, dell'infiammazione e della funzione endoteliale favoriscono il verificarsi, nel paziente neoplastico, di uno stato di ipercoagulabilità. Sono numerosi gli studi finora pubblicati che hanno permesso di chiarire i molteplici fattori di rischio ed i complessi meccanismi patogenetici che sottendono allo sviluppo della patologia tromboembolica nel paziente oncologico, tuttavia molti aspetti rimangono ancora da chiarire. L'insorgenza di eventi tromboembolici venosi costituisce, per il clinico, un evento temibile e non sempre facilmente riconoscibile. I sintomi "classici" di una trombosi (dolore, rossore, tumefazione dell'arto interessato, febbre; maggiore rappresentazione dei circoli venosi superficiali, segno di Homans, segno di Bauer ecc,) sono presenti solo nel 50% dei pazienti colpiti mentre la restante metà non presenta alcun sintomo. Viceversa, in letteratura è riportata l'osservazione che tra i pazienti che mostrano i segni clinici di una possibile

trombosi se ne ha l'effettivo riscontro in meno del 25% dei casi [115]. Nel nostro gruppo di pazienti che hanno sviluppato una trombosi venosa profonda invece nessuno ha presentato segni o sintomi clinici suggestivi per TEV rendendo la diagnosi clinica estremamente difficoltosa.

La presenza di altre comorbidità nell'incidenza di TEV è già stata oggetto di studio in letteratura. Come descritto da alcuni autori ipertensione arteriosa, dislipidemia, obesità e pregressi episodi di TEV espongono ad un aumentato rischio di TEV [116]. Tali fattori tuttavia non hanno dimostrato rappresentare un rischio aumentato nel nostro gruppo ma probabilmente perché presenti in pochi pazienti di una casistica ristretta.

Ad oggi la scala di Wells rappresenta un valido strumento per classificare i pazienti più a rischio di sviluppare TEV (rischio basso 0, intermedio = score 1-2, rischio alto = score ≥ 3) e da sottoporre a Ecodoppler venoso (intermedio e alto rischio). Tuttavia nei pazienti affetti da lesione cerebrale tale rischio risulta pressochè invariabilmente almeno di grado intermedio. Ne consegue la necessità di individuare un test obiettivo a disposizione del clinico per selezionare in modo accurato i pazienti da sottoporre ad Ecodoppler venoso evitando errori diagnostici ed al contempo garantendo un corretto impiego delle risorse.

Il dosaggio del D-dimero plasmatico costituisce a tutt'oggi un test di relativa utilità a tale riguardo avendo però una bassa specificità ed alta sensibilità ed avendo solamente un valore predittivo negativo [75].

I dati relativi al dosaggio del D-dimero ottenuti sul nostro campione di pazienti studio sembrano dimostrare che i valori del D-dimero preoperatorio sono significativamente aumentati nei pazienti con trombosi. Inoltre, tale differenza significativa si mantiene anche in III e VII giornata post operatoria ($p=0.007$ e < 0.001 , rispettivamente). Questo significa che nei pazienti che hanno sviluppato la TEV c'è un aumento non solo in toto dei valori di D-dimero ma anche una evoluzione significativamente diversa dei suoi valori nel tempo. Infatti il D-dimero continua a salire nel tempo, nonostante l'introduzione della terapia

eparinica, mentre nei pazienti senza TEV ritorna ai livelli pre-intervento. Tuttavia, come riportato nei risultati, sulla base di questi dati non abbiamo ottenuto una «predittività precoce» affidabile. Calcolando invece la «predittività tardiva» la percentuale di identificazione dell'evento TEV sale al 40%. Tale risultato certamente non può essere considerato dirimente ma sottolinea come sia da osservare l'andamento nel tempo del D-Dimero piuttosto che il valore di per sè. Infatti gli incrementi dei suoi valori rispetto allo sviluppo di TEV sono risultati maggiormente significativi tra VII e III giornata post operatoria.

Questi risultati, pur con le necessarie precauzioni legate alla bassa numerosità del campione in esame, evidenziano come il singolo valore del D-Dimero pre operatorio non permetta di predire l'evento TEV nei pazienti affetti da GBM o meningioma cerebrale. Sicuramente conoscere la dinamica dei valori del Dimero aiuta ad identificare i pazienti da sottoporre a esame diagnostico strumentale in assenza di segni o sintomi che rivelino sospette TEV. Pertanto effettuare un dosaggio seriato dei valori del Dimero può permettere di identificare precocemente fenomeni trombotici ed evitarne le possibili complicanze emboliche.

Fase II

Tra le condizioni eziopatogenetiche dello stato procoagulante nei pazienti neoplastici un ruolo di rilievo è legato alla presenza delle MPs plasmatiche. Infatti in Letteratura sono descritte numerose neoplasie correlate ad elevati livelli di MPs circolanti e a questa condizione si associa una notevole incidenza di complicanze tromboemboliche. Queste microvescicole, che originano da processi di attivazione e/o apoptosi cellulare, hanno dimostrato proprietà procoagulanti grazie alla loro composizione fosfolipidica. La maggior fonte di MPs è costituita dalle piastrine, ma anche le cellule endoteliali ed i monociti-macrofagi sono in grado, se attivati o danneggiati, di vescicolare. Recenti studi disponibili in Letteratura analizzano il ruolo della cellula neoplastica stessa

nell'originare MPs che esprimono costitutivamente il TF sulla loro superficie con conseguente attività procoagulante. Nel nostro studio abbiamo dapprima confrontato i livelli plasmatici di MPs totali, piastriniche, endoteliali, leucocitarie, veicolanti il TF e di derivazione tumorale nei pazienti con nuova diagnosi di glioblastoma multiforme rispetto a quelli di un gruppo di controlli sani. Abbiamo inoltre eseguito un test funzionale per valutare l'attività procoagulante delle MPs ed il test di trombinogenerazione per confermare lo stato ipercoagulante nei pazienti neoplastici.

In accordo con i dati pubblicati in Letteratura [117] anche nella nostra casistica è emersa la presenza di elevati livelli di MPs totali, piastriniche, endoteliali, leucocitarie, veicolanti il TF e di derivazione tumorale nella popolazione dei casi rispetto ai controlli. L'incremento delle MPs in toto e di ciascuno dei sottogruppi, nei pazienti con GBM, è risultato statisticamente significativo rispetto ai controlli. La presenza di una elevata concentrazione delle MPs nel preoperatorio sembra suggerire l'ipotesi che, a causa del danno della barriera ematoencefalica presente nei gliomi di alto grado, vi sia una aumentata permeabilità e un aumentato rilascio di MPs nel sangue.

Inoltre il test funzionale sull'attività procoagulante PPL clotting time ed il test di trombino generazione hanno effettivamente confermato lo stato ipercoagulante nei pazienti con GBM rispetto ai controlli. Nei 6 pazienti (24%) che hanno sviluppato una complicanza tromboembolica venosa si è dimostrato un livello basale di TF+MP significativamente più alto rispetto ai pazienti che non hanno sviluppato TEV. Abbiamo calcolato che i pazienti con GBM e livelli basali di TF+MP $>95^{\circ}$ percentile, calcolato sui livelli di TF+MP nella popolazione sana, hanno una Hazard Ratio per TEV di 7.1. Una analoga valutazione è stata condotta nel lavoro pubblicato da Hernandez e collaboratori [118] in cui è stata esaminata la correlazione tra MPs – TF e TEV in pazienti neoplastici. Diversamente dalla nostra casistica, i risultati di questo studio dimostrano che il TF associato alle MPs correla con la mortalità ma non con la

trombosi. Tuttavia, questo lavoro prende in esame una popolazione molto eterogenea di pazienti affetti da diversi tipi di neoplasia (gastrointestinale, pancreatico, polmonare, linfoma non Hodgkin e carcinoma mammario) con differente grado di espressione del TF. Altri studi in Letteratura, tuttavia, evidenziano il maggiore rischio di sviluppo di TEV nei pazienti neoplastici che presentano elevati livelli di TF-MPs rispetto ai pazienti con livelli di tali microparticelle circolanti minori [114].

Questi dati suggeriscono che le microparticelle di derivazione neoplastica che esprimono il TF sono fortemente associate a TEV e potrebbero rivestire un ruolo cruciale per la patogenesi della trombosi associata a neoplasia.

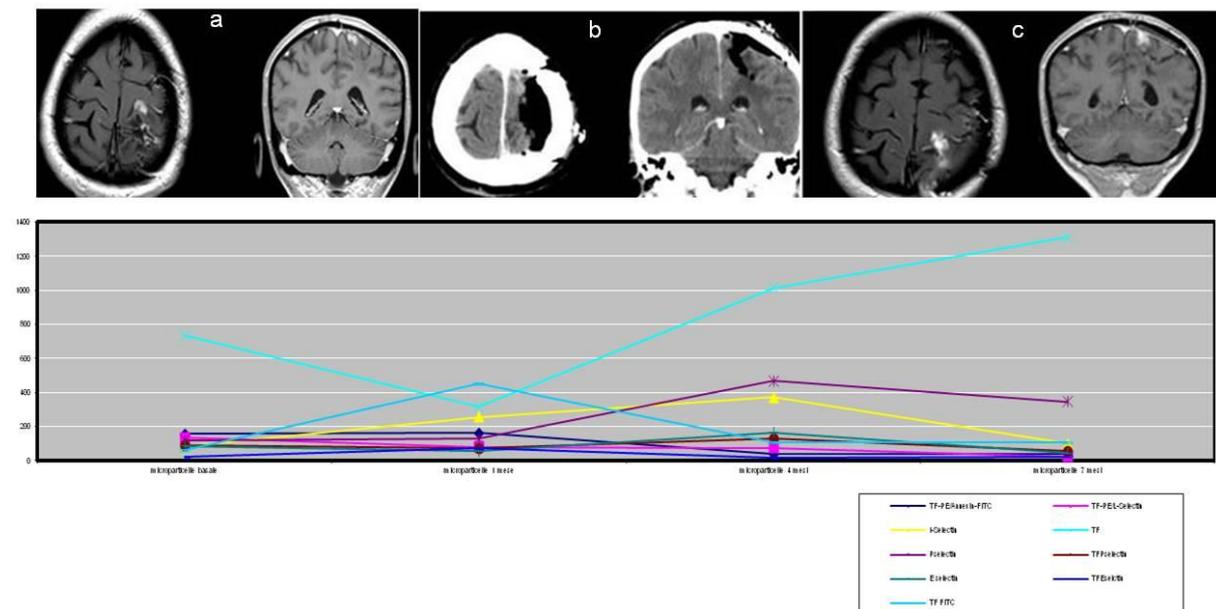
Per quanto riguarda il rapporto tra microparticelle circolanti e progressione di malattia abbiamo documentato che i pazienti che nel follow up sono andati incontro a progressione di malattia avevano livelli basali di TF-MPs significativamente aumentati rispetto ai pazienti che non hanno sviluppato progressione a 7 mesi. L'HR tuttavia non è risultato significativo, verosimilmente per la ridotta numerosità campionaria.

Nell'immediato post operatorio e durante le terapie adiuvanti invece, non vi è stata una differenza nei 2 gruppi di pazienti. Viceversa i livelli di TF-MPs sono nuovamente aumentati ai controlli a 7 mesi nei pazienti in fase di progressione di malattia rispetto a quelli senza evidenza radiologica di progressione. Questi dati sembrano suggerire che l'effetto della recente chirurgia e della radio- e chemioterapia in corso nei primi mesi post intervento possano determinare livelli di MPs circolanti sostanzialmente sovrapponibili nei due gruppi di pazienti.

Al controllo del 7° mese, terminate le terapie adiuvanti, si è evidenziato invece un netto aumento delle MPs circolanti nei pazienti correlato con evidenza radiologica di malattia diversamente dai pazienti con RM stabile. Questo dato sottolinea il potenziale ruolo delle MPs come effettivo marcatore di malattia.

In conclusione, il nostro studio conferma la presenza di uno stato protrombotico caratterizzato da elevati livelli di MPs procoagulanti totali, piastriniche, endoteliali e veicolanti il TF e da un aumento della trombinogenerazione in una popolazione di pazienti con glioma cerebrale di alto grado. Inoltre, i livelli basali di MPs veicolanti il TF predicono in maniera significativa il successivo sviluppo di complicanze trombotiche venose nei pazienti con glioblastoma multiforme. Le associazioni dimostrate nel nostro studio e le evidenze suggerite in Letteratura sembrerebbero poter confermare un coinvolgimento delle MPs nella patogenesi degli eventi tromboembolici nei pazienti oncologici. Sono necessari studi prospettici su popolazioni più ampie per confermare il loro ruolo effettivo come biomarcatore prognostico e come target terapeutico.

Figura 11: correlazione tra neoplasia cerebrale e concentrazioni plasmatiche delle microparticelle. A) RM preoperatoria; B) TC postoperatoria (asportazione completa); C) RM a 4 mesi (ripresa di malattia).



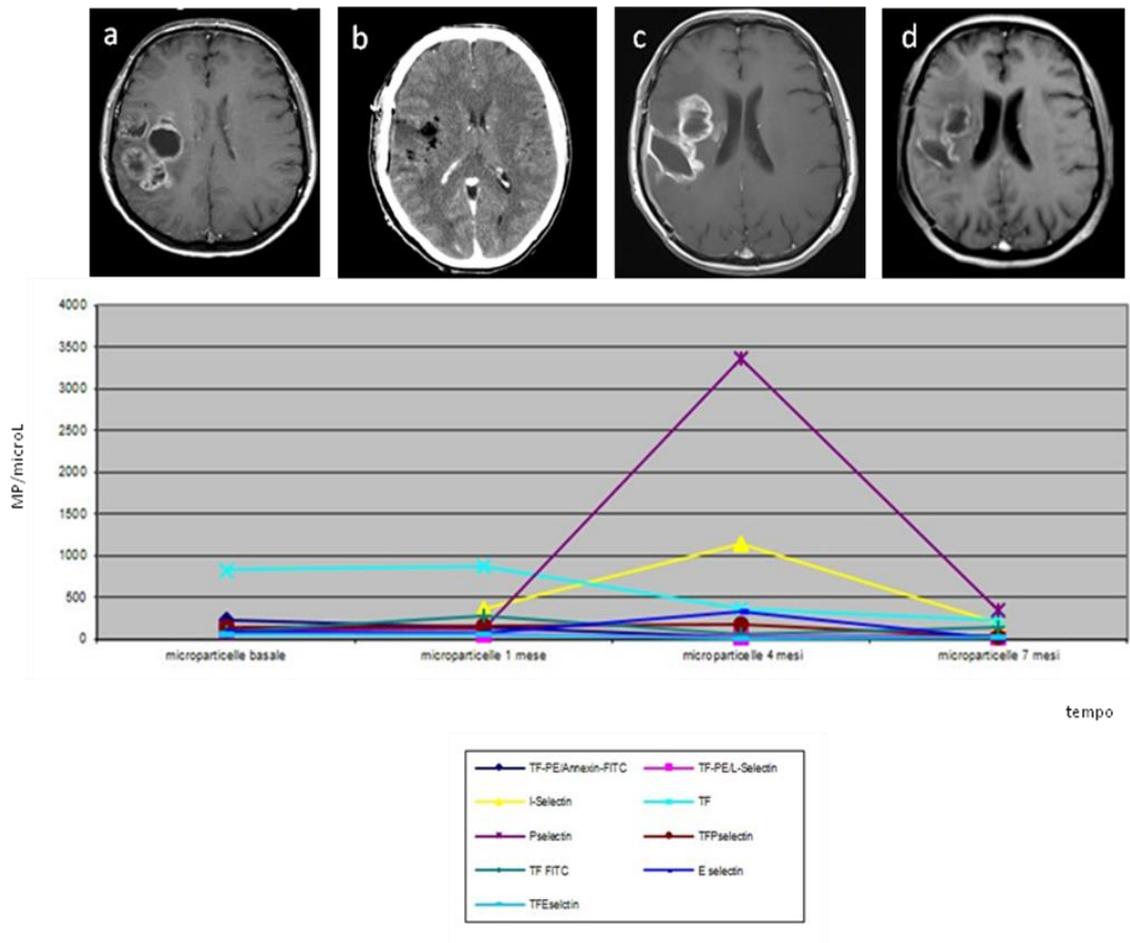


Figura 12: correlazione tra neoplasia cerebrale e concentrazioni plasmatiche delle microparticelle. A) RM preoperatoria; B) TC postoperatoria (asportazione completa); C) RM a 4 mesi (ripresa di malattia); D) RM a 7 mesi (ridotto enhancement dopo terapie adiuvanti).

Bibliografia

1. Kleihues P and Cavaneer W, World Health Organization Classification of Tumor, Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System. 2000
2. Virchow R, Die krankhaften Geschwülste, Achtzente Vorlesung: Psammome, Melanome, Gliome. Verlag von augus. Hirschwald, Berlin: 106-116, 1864-65
3. Bailey, P. and Cushing, H. A Classification of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis. Philadelphia: Lippincott, 1926
4. Zulch, K. Histological typing of tumors of the central nervous system. In: World Health Organization, Geneva, 1979
5. Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavaneer, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., and Kleihues, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 2007, 114: 97-109.
6. Shih, A. H. and Holland, E. C. Developmental neurobiology and the origin of brain tumors. *J Neurooncol*, 2004, 70: 125-136.
7. Cairncross, J. G., Ueki, K., Zlatescu, M. C., Lisle, D. K., Finkelstein, D. M., Hammond, R. R., Silver, J. S., Stark, P. C., Macdonald, D. R., Ino, Y., Ramsay, D. A., and Louis, D. N. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Nat Cancer Inst*, 1998, 90: 1473-1479.
8. Kouwenhoven, M. C., Kros, J. M., French, P. J., Biemond-ter Stege, E. M., Graveland, W. J., Taphoorn, M. J., Brandes, A. A., and van den Bent, M. J. 1p/19q loss within oligodendroglioma is predictive for response to first line temozolomide but not to salvage treatment. *Eur J Cancer*, 42: 2499-2503, 2006
9. Cairncross, G. and Jenkins, R. Gliomas with 1p/19q codeletion: a.k.a. oligodendroglioma. *Cancer J*, 2008, 14: 352-357
10. Labussière M, Idbaih A, Wang XW, Marie Y, Boisselier B, Falet C, Paris S, Laffaire J, Carpentier C, Crinière E, Ducray F, El Hallani S, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Sanson M, All the 1p19q codeleted gliomas are mutated on IDH1 or IDH2, *Neurology*, 2010, 8;74(23):1886-90.
11. Nutt, C. L. Molecular genetics of oligodendrogliomas: a model for improved clinical management in the field of neurooncology. *Neurosurg Focus*, 19: E2, 2005.
12. Ducray, F., Crinière, E., Idbaih, A., Mokhtari, K., Marie, Y., Paris, S., Navarro, S., Laigle-Donadey, F., Dehais, C., Thillet, J., Hoang-Xuan, K., Delattre, J. Y., and Sanson, M. alpha-Internexin expression identifies 1p19q codeleted gliomas. *Neurology*, 2009, 72: 156-161
13. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB, Herman JG, Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents, *N Engl J Med.*, 2000, 9;343(19):1350-4
14. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R, MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005, 10;352(10):997-1003.
15. Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, Colman H, De La Cruz C, Sulman EP, Bekele BN, Aldape KD, MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant

alkylating chemotherapy for glioblastoma, *Neuro Oncol.* 2010 Feb;12(2):116-21 Epub 2009 Dec 14. Erratum in: *Neuro Oncol.* 2010 Jun;12(6):617

16. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial, *Lancet Oncol.* 2009 May;10(5):459-66

17. Glas M, Happend C, Rieger J, Wiewrodt D, Bähr O, Steinbach JP, Wick W, Kortmann RD, Reifenberger G, Weller M, Herrlinger U, Long-term survival of patients with glioblastoma treated with radiotherapy and lomustine plus temozolomide, *J Clin Oncol.* 2009 Mar 10;27(8):1257-61

18. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA Jr, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW, An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme, *Science*, 2008, Sep 26;321(5897):1807-12

19. Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Seo SI, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH, Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers. *Int J Cancer*, 2009, Jul 15;125(2):353-5

20. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD, IDH1 and IDH2 mutations in gliomas, *N Engl J Med.*, 2009, Feb 19;360(8):765-73

21. Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, Ohgaki H. IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res.*, 2009, Oct 1;15(19):6002-7

22. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre JY Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol.*, 2009, Sep 1;27(25):4150-4

23. Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Friedman HS, Werner MH, Bigner DD, Bigner SH Amplification and expression of the epidermal growth factor receptor gene in human glioma xenografts. *Cancer Res.*, 1988, Apr 15;48(8):2231-8

24. Agosti RM, Leuthold M, Gullick WJ, Yasargil MG, Wiestler OD Expression of the epidermal growth factor receptor in astrocytic tumours is specifically associated with glioblastoma multiforme. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1992;420(4):321-5

25. Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP, Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Nov;87(21):8602-6

26. Heimberger AB, Suki D, Yang D, Shi W, Aldape K, The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients. *J Transl Med.*, 2005, Oct 19;3:38

27. Bar EE, Lin A, Tihan T, Burger PC, Eberhart CG Frequent gains at chromosome 7q34 involving BRAF in pilocytic astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 2008, Sep;67(9):878-87

28. Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Bäcklund LM, Ichimura K, Collins VP. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res.* 2008, Nov 1;68(21):8673-7
29. Korshunov A, Meyer J, Capper D, Christians A, Remke M, Witt H, Pfister S, von Deimling A, Hartmann C, Combined molecular analysis of BRAF and IDH1 distinguishes pilocytic astrocytoma from diffuse astrocytoma. *Acta Neuropathol.*, 2009, Sep;118(3):401-5
30. Pfister S, Janzarik WG, Remke M, Ernst A, Werft W, Becker N, Toedt G, Wittmann A, Kratz C, Olbrich H, Ahmadi R, Thieme B, Joos S, Radlwimmer B, Kulozik A, Pietsch T, Herold-Mende C, Gnekow A, Reifenberger G, Korshunov A, Scheurlen W, Omran H, Lichter P, BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas, *J Clin Invest.*, 2008, May;118(5):1739-49
31. Marko NF, Weil RJ, Schroeder JL, Lang FF, Suki D, Sawaya RE Extent of resection of glioblastoma revisited: personalized survival modeling facilitates more accurate survival prediction and supports a maximum-safe-resection approach to surgery. *J Clin Oncol.* 2014 Mar 10;32(8):774-82. doi: 10.1200/JCO.2013.51.8886
32. Wang XW, Ciccarino P, Rossetto M, Boisselier B, Marie Y, Desestret V, Gleize V, Mokhtari K, Sanson M, Labussière M IDH mutations: genotype-phenotype correlation and prognostic impact. *Biomed Res Int.* 2014;2014:540236
33. Boisselier B, Gállego Pérez-Larraya J, Rossetto M, Labussière M, Ciccarino P, Marie Y, Delattre JY, Sanson M Detection of IDH1 mutation in the plasma of patients with glioma. *Neurology.* 2012, Oct 16;79(16):1693-8
34. Fisher JL, Palmisano S, Schwartzbaum JA, Svensson T, Lönn S Comorbid conditions associated with glioblastoma *J Neurooncol.* 2014, Feb;116(3):585-91
35. D'Asti E, Fang Y, Rak J Brain neoplasms and coagulation-lessons from heterogeneity. *Rambam Maimonides Med J.* 2014, Oct 29;5(4):e0030
36. Bouillard JB, Bouillaud S. De l'obliteration des veines et de son influence sur la formation des hydropisies partielles: consideration sur la hydropisies passive et general. *Arch Gen Med* 1923; 1: 188–204
37. Trousseau A. Phlegmasia alba dolens. *Clinique Medicale de l'Hotel-Dieu de Paris* 1965; 3: 654-712
38. Perry JR. Thromboembolic disease in patients with high-grade glioma. *Neuro Oncol.* 2012, Sep;14 Suppl 4:iv73-80
39. Scarvelis D, Wells PS, Diagnosis and treatment of deep-vein thrombosis. *CMA J.* 2006, Oct 24;175(9):1087-92. Review. Erratum in: *CMAJ.* 2007 Nov 20;177(11):1392.
40. Gussoni G, Frasson S, La Regina M, Di Micco P, Monreal M; RIETE Investigators Three-month mortality rate and clinical predictors in patients with venous thromboembolism and cancer. Findings from the RIETE registry. *Thromb Res.* 2013, Jan;131(1):24-30
41. Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, Rosendaal FR, Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA.* 2005, Feb 9;293(6):715-22.
42. Braekkan SK, Borch KH, Mathiesen EB, Njølstad I, Wilsgaard T, Hansen JB. Body height and risk of venous thromboembolism: The Tromsø Study. *Am J Epidemiol* 2010, 171(10): 1109-15.
43. White RH, Zhou H, Murin S, Harvey D. Effect of ethnicity and gender on the incidence of venous thromboembolism in a diverse population in California in 1996. *Thromb Haemost* 2005, 93(2): 298-305.

44. Cronin-Fenton DP, Søndergaard F, Pedersen LA, et al. Hospitalisation for venous thromboembolism in cancer patients and the general population: a population-based cohort study in Denmark, 1997-2006. *Br J Cancer* 2010, 103(7): 947-53.
45. Walker AJ, Card TR, West J, Crooks C, Grainge MJ. Incidence of venous thromboembolism in patients with cancer - a cohort study using linked United Kingdom database. *Eur J Cancer* 2013; 49(6): 1404-13.
46. Horsted F, West J, Grainge MJ. Risk of venous thromboembolism in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2012; 9(7): e1001275.
47. Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Kuderer NM, Lyman GH. Frequency, risk factors, and trends for venous thromboembolism among hospitalized cancer patients. *Cancer* 2007, 110(10): 2339-46.
48. Stein PD, Beemath A, Meyers FA, Skaf E, Sanchez J, Olson RE. Incidence of venous thromboembolism in patients hospitalized with cancer. *Am J Med* 2006, 119(1): 60-8.
49. Jenkins EO, Schiff D, Mackman N, Key NS Venous thromboembolism in malignant gliomas *J Thromb Haemost.* 2010, Feb;8(2):221-7
50. Brandes AA, Scelzi E, Salmistraro G, Ermani M, Carollo C, Berti F, Zampieri P, Baiocchi C, Fiorentino MV. Incidence of risk of thromboembolism during treatment high-grade gliomas: a prospective study. *Eur J Cancer.* 1997, Sep;33(10):1592-6.
51. Semrad TJ, O'Donnell R, Wun T, Chew H, Harvey D, Zhou H, White RH Epidemiology of venous thromboembolism in 9489 patients with malignant glioma. *J Neurosurg.* 2007, Apr;106(4):601-8
52. Alcalay AI, Wun T, Khatri V, Chew HK, Harvey D, Zhou H, White RH Venous thromboembolism in patients with colorectal cancer: incidence and effect on survival. *J Clin Oncol.* 2006, Mar 1;24(7):1112-8.
53. Ruff RL, Posner JB. Incidence and treatment of peripheral venous thrombosis in patients with glioma. *Ann Neurol.* 1983, Mar;13(3):334-6.
54. Laws ER, Parney IF, Huang W, Anderson F, Morris AM, Asher A, Lillehei KO, Bernstein M, Brem H, Sloan A, Berger MS, Chang S; Glioma Outcomes Investigators. Survival following surgery and prognostic factors for recently diagnosed malignant glioma: data from the Glioma Outcomes Project. *J Neurosurg.* 2003, Sep;99(3):467-73
55. Marras LC, Geerts WH, Perry JR The risk of venous thromboembolism is increased throughout the course of malignant glioma: an evidence-based review. *Cancer.* 2000, Aug 1;89(3):640-6. Review
56. Chaichana KL, Pendleton C, Jackson C, Martinez-Gutierrez JC, Diaz-Stransky A, Aguayo J, Olivi A, Weingart J, Gallia G, Lim M, Brem H, Quinones-Hinojosa A, Deep venous thrombosis and pulmonary embolisms in adult patients undergoing craniotomy for brain tumors, *Neurol Res.* 2013, Mar;35(2):206-11
57. Venous thrombosis in patients with solid tumors: determination of frequency and characteristics. Sallah S, Wan JY, Nguyen NP. *Thromb Haemost.* 2002, Apr;87(4):575-9
58. Venous thromboembolism and cancer: risks and outcomes. Lee AY, Levine MN. *Circulation.* 2003, Jun 17;107(23 Suppl 1):I17-21. Review
59. Hemostatic complications of angiogenesis inhibitors in cancer patients. Elice F, Jacoub J, Rickles FR, Falanga A, Rodeghiero F. *Am J Hematol.* 2008, Nov;83(11):862-70 Review
60. Venous thromboembolism and survival in patients with high-grade glioma. Simanek R, Vormittag R, Hassler M, Roessler K, Schwarz M, Zielinski C, Pabinger I, Marosi C. *Neuro Oncol.* 2007, Apr;9(2):89-95. Epub 2007 Feb 27

61. Thromboembolism in brain tumors. Walsh DC, Kakkar AK. *Curr Opin Pulm Med.* 2001, Sep;7(5):326-31. Review
62. Falanga A, Barbui T, Rickles FR and Levine MN: Guidelines for clotting studies in cancer patients. *J Thromb Haemost* 1993; 70: 343-350
63. Rickles FR, Falanga A: Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thromb Res* 2001; 102: 215-224.
64. Guan M, Jin J, Su B, Liu WW, Lu Y, Tissue factor expression and angiogenesis in human glioma, *Clin Biochem.* 2002 Jun;35(4):321-5
65. Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y, Takeshima H, Nishi T, Ushio Y, Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma, *Cancer.* 1996, May 1;77(9):1877-83
66. Zwicker JI, Furie BC, Furie B: Cancer-associated thrombosis. *Critical Rev Oncol/Haematol* 2007; 62: 126-136.
67. Schaffner F, Yokota N, Ruf W. Tissue Factor proangiogenic signaling in cancer progression. *Thromb Res* 2012, 129 (Suppl 1): S127-31
68. Khorana AA, Ahrendt SA, Ryan CK, Francis CW, Hruban RH, HuYC, et al. Tissue factor expression, angiogenesis, and thrombosis in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2007, 13(10); 2870-5
69. De Cicco M: The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms. *Critical Rev Oncol/Haematol* 2004; 50: 187-196
70. Wells PS, Owen C, Doucette S, Fergusson D, Tran H. Does this patient have deep vein thrombosis? *JAMA.* 2006, Jan 11;295(2):199-207. Review
71. Wells PS. Advances in the diagnosis of venous thromboembolism. *J Thromb Thrombolysis.* 2006, Feb;21(1):31-40. Review.
72. Wells PS, Anderson DR, Bormanis J, Guy F, Mitchell M, Gray L, Clement C, Robinson KS, Lewandowski Value of assessment of pretest probability of deep-vein thrombosis in clinical management. *B.Lancet.* 1997, Dec 20-27;350(9094):1795-8
73. Prisco D, Paniccia R, Bonechi F, Francalanci I, Abbate R, Gensini GF. Evaluation of new methods for the selective measurement of fibrin and fibrinogen degradation products. *Thromb Res.* 1989 Nov 15;56(4):547-51
74. Rahiminejad M, Rastogi A, Prabhudesai S, McClinton D, MacCallum P, Platton S, Friedman E. Evaluating the Use of a Negative D-Dimer and Modified Low Wells Score in Excluding above Knee Deep Venous Thrombosis in an Outpatient Population, Assessing Need for Diagnostic Ultrasound. *ISRN Radiol.* 2014, Mar 9;2014:519875
75. Prisco D, Conti AA, Giurlani L, Falciani M. Clinical application of fibrinolysis laboratory tests: a review. *Ann Ital Med Int.* 1998 Apr-Jun;13(2):81-7. Review.
76. Francalanci I, Comeglio P, Liotta AA, Cellai AP, Fedi S, Parretti E, Mello G, Prisco D, Abbate R. D-dimer concentrations during normal pregnancy, as measured by ELISA *Thromb Res.* 1995, Jun 1;78(5):399-405
77. Franco JA. Diagnosis of deep vein thrombosis on the basis of clinical findings *Am J Med.* 1990, Sep;89(3):396-7
78. Goodacre S, Stevenson M, Wailoo A, Sampson F, Sutton AJ, Thomas S. How should we diagnose suspected deep-vein thrombosis? *QJM.* 2006, Jun;99(6):377-88. Review.

79. Schouten HJ, Geersing GJ, Koek HL, Zuithoff NP, Janssen KJ, Douma RA, van Delden JJ, Moons KG, Reitsma JB. Diagnostic accuracy of conventional or age adjusted D-dimer cut-off values in older patients with suspected venous thromboembolism: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2013, May 3;346:f2492. Review
80. Legnani C, Pancani C, Palareti G, Guazzaloca G, Fortunato G, Grauso F, Golfieri R, Gianpalma E, Coccheri S. Comparison of new rapid methods for D-dimer measurement to exclude deep vein thrombosis in symptomatic outpatients. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1997, Jul;8(5):296-302
81. Wells PS, Anderson DR, Bormanis J, Guy F, Mitchell M, Gray L, Clement C, Robinson KS, Lewandowski B. Value of assessment of pretest probability of deep-vein thrombosis in clinical management. *Lancet*. 1997 Dec 20-27;350(9094):1795-8.
82. Bernardi E, Prandoni P, Lensing AW, Agnelli G, Guazzaloca G, Scannapieco G, Piovella F, Verlato F, Tomasi C, Moia M, Scarano L, Girolami A. D-dimer testing as an adjunct to ultrasonography in patients with clinically suspected deep vein thrombosis: prospective cohort study. The Multicentre Italian D-dimer Ultrasound Study Investigators Group. *BMJ*. 1998, Oct 17;317(7165):1037-40.
83. Flaumenhaft R: Formation and fate of platelet microparticles. *Blood cells, molecules and disease* 2006; 36: 182-7.
84. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R: Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 2004; 34 (6): 392-401
85. Simak J, Gelderman MP: Cell membrane microparticles in blood and blood products: potentially pathogenic agents and diagnostic markers. *Transfusion Medicine Reviews* 2006; 20(1): 1-26.
86. Coleman M.L., Sahai E.A., Yeo M., et al: Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* 2001, 3(4): 339-345
87. Ahn YS: Cell-derived microparticles: "Miniature envoys with many faces". *J Thromb.Haemost* 2005; 3: 1-4
88. Piccin A, Murphy WG, Smith OP: Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Reviews* 2007; 21(3): 157-71
89. Hussein MNA, Boing AN, Birò et al: Phospholipid composition of in vitro endothelial microparticles and their in vivo thrombogenic properties. *Thromb Res* 2008, 121(6): 865- 71
90. Ardoin SP, Shanahan JC, Pisetsky DS: The role of microparticles in inflammation and thrombosis. *Scandinavian Journal of immunology* 2007; 66: 159-165
91. Morel O, Morel N, Freyssinet JM, Toti F: Platelet microparticles and vascular cells interactions: a checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses. *Platelets* 2008; 19(1): 9-23
92. Polgar J, Matuskova J, Wagner DD: The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb.Haemost* 2005; 3: 1590-6
93. Myers DD, Hawley AE, Farris DM et al: P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. *J Vasc.Surg* 2003, 38: 1075-89
94. Dignat-George F, Camoin-Jau L, Sabatier F et al: Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb.Haemost* 2004; 91(4): 667-73
95. Meziani F, Tesse A, Andriantsitohaina R: Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. *Pharmacological Reports* 2008; 60: 75-84

96. Nieuwland R., Berckmans R.J., McGregor S., et al. Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000; 95(3): 930–5
97. Joop K, Berckmans RJ, Nieuwland R: Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanism. *Thromb.Haemost* 2001; 85: 810-20
98. VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R: Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 277-7
99. Mallat Z, Benamer H, Hugel B et al: Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000; 101: 841-3
100. Yeon SA, Wenche JY, laurence LH, Jiemenez JJ: Cell-derived microparticles: a mediator of inflammation in aortic valve stenosis? *Thromb.Haemost* 2008; 99: 657-8
101. Minagar A, Jy W, Jimenez JJ et al: Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis. *Neurology* 2001; 56: 1319-24
102. Ghanim AJ1, Daskalakis C, Eschelmann DJ, Kraft WK. A five-year, retrospective, comparison review of survival in neurosurgical patients diagnosed with venous thromboembolism and treated with either inferior vena cava filters or anticoagulants. *J Thromb Thrombolysis*. 2007, Dec;24(3):247-54
103. Dickinson LD, Miller LD, Patel CP, Gupta SK. Enoxaparin increases the incidence of postoperative intracranial hemorrhage when initiated preoperatively for deep venous thrombosis prophylaxis in patients with brain tumors. *Neurosurgery*. 1998, Nov;43(5):1074-81
104. Schwarz RE1, Marrero AM, Conlon KC, Burt M. Inferior vena cava filters in cancer patients: indications and outcome. *J Clin Oncol*. 1996, Feb;14(2):652-7
105. Lyman GH, Khorana AA, Falanga A, et al; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology guideline: recommendations for venous thromboembolism prophylaxis and treatment in patients with cancer. *J Clin Oncol* 2007, 25(34): 5490–505
106. Kearon C, Akl EA, Comerota AJ, et al. American College of Chest Physicians. Antithrombotic therapy for VTE disease: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012; 141(2 Suppl): e419S-e494S
107. Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Kuderer NM, Lyman GH. Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy. *J Thromb Haemost* 2007, 5(3): 632-4
108. Sørensen HT, Mellekjaer L, Olsen JH, Baron JA. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2000, 343(25): 1846-50
109. Noble S, Pasi J. Epidemiology and pathophysiology of cancer-associated thrombosis. *Br J Cancer* 2010; 102 (Suppl1): S2-S9
110. Prandoni P, Lensing AW, Piccioli A, et al. Recurrent venous thromboembolism and bleeding complications during anticoagulant treatment in patients with cancer and venous thrombosis. *Blood* 2002, 100(10): 3484-8.
111. Campello E, Spiezia L, Radu CM, Bon M, Gavasso S, Zerbinati P, Woodhams B, Tormene D, Prandoni P, Simioni P. Circulating microparticles in carriers of factor V Leiden with and without a history of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2012; 108(4): 633-9

112. Campello E, Spiezia L, Radu CM, Gavasso S, Woodhams B, Simioni P. Evaluation of a procoagulant phospholipid functional assay as a routine test for measuring circulating microparticle activity. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2014, Jul;25(5):534-7
113. Noubouossie DC, Lê PQ, Rozen L, et al. Evaluation of the procoagulant activity of endogenous phospholipids in the platelet-free plasma of children with sickle cell disease using functional assays. *Thromb Res* 2011; 130(2): 259-64
114. Hoefnagel D, Kwee LE, van Putten EH, Kros JM, Dirven CM, Dammers R. The incidence of postoperative thromboembolic complications following surgical resection of intracranial meningioma. A retrospective study of a large single center patient cohort. *Clin Neurol Neurosurg.* 2014, Aug;123:150-4
115. Exclusion of deep vein thrombosis using the Wells rule in clinically important subgroups: individual patient data meta-analysis. Geersing GJ, Zuithoff NP, Kearon C, Anderson DR, Ten Cate-Hoek AJ, Elf JL, Bates SM, Hoes AW, Kraaijenhagen RA, Oudega R, Schutgens RE, Stevens SM, Woller SC, Wells PS, Moons KG. *BMJ.* 2014, Mar 10;348:g1340. Review.
116. Wendelboe AM, McCumber M, Hylek EM, Buller H, Weitz JI, Raskob G Global public awareness of venous thromboembolism., *J Thromb Haemost.* 2015, Aug;13(8):1365-71
117. Sartori MT, Della Puppa A, Ballin A, Campello E, Radu CM, Saggiorato G, d'Avella D, Scienza R, Cella G, Simioni P. Circulating microparticles of glial origin and tissue factor bearing in high-grade glioma: a potential prothrombotic role. *Thromb Haemost.* 2013 Aug;110(2):378-85
118. Hernández C, Orbe J, Roncal C, Alvarez-Hernandez M, Martinez de Lizarrondo S, Alves MT, García Mata J, Páramo JA. Tissue factor expressed by microparticles is associated with mortality but not with thrombosis in cancer patients. *Thromb Haemost.* 2013 Sep;110(3):598-608
-