



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMORFOLOGICHE E CHIRURGICHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMORFOLOGICHE E FUNZIONALI

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
IMAGING MOLECOLARE

Coordinatore: Ch.mo Prof. Marco SALVATORE

TESI DI DOTTORATO

IMAGING INTEGRATO DEI TUMORI CEREBRALI PRIMITIVI

DR. FELICE ESPOSITO

Ciclo XX

OBIETTIVI DEGLI STUDI OGGETTO DELLA TESI

Definizione delle indagini diagnostiche appropriate, post-processing e integrazione di immagini morfologiche e funzionali con utilizzo di tecniche di diagnostica per immagini, funzionali e metaboliche per estrazione di informazioni quantitative morfo-funzionali in particolare nello studio della patologia neoplastica del sistema nervoso centrale e delle modificazioni morfo-funzionali del parenchima cerebrale legate alla presenza del tumore.

INTRODUZIONE

Background

La Neuro-Oncologia, che ha come oggetto di studio la biologia, epidemiologia, diagnosi e terapia dei tumori, benigni e maligni, del Sistema Nervoso Centrale, è una specialità medico-chirurgica interdisciplinare che coinvolge, in particolare, neurochirurghi, neurologi, neuroradiologi, oncologi, neuropatologi e radioterapisti.

I tumori cerebrali primitivi rappresentano un gruppo di neoplasie che originano dai differenti tipi cellulari del Sistema Nervoso Centrale. Tra questi, i **gliomi** sono i tumori che si riscontrano più frequentemente e possono originare dagli astrociti (*astrocitomi*), dagli oligodendrociti (*oligodendrogliomi*), oppure dalle cellule ependimali (*ependimomi*). Da soli, gli astrocitomi rappresentano circa l'80% dei tumori cerebrali primitivi maligni.

A causa della relativa enorme varietà di diversi istotipi cellulari che danno origine ai tumori cerebrali primitivi, non esiste a tutt'oggi un chiaro ed universale sistema classificativo di tali neoplasie. Nel 2000, la World Health Organization (WHO) ha rivisitato la classificazione dei tumori del Sistema Nervoso Centrale, basandola sulla premessa che ogni linea cellulare da origine ad uno specifico istotipo tumorale. Tale sistema classificativo si fonda sulle caratteristiche istopatologiche del tessuto tumorale mentre non prende in considerazione né la localizzazione anatomica né le dimensioni del tumore, fattori entrambi che condizionano l'aggregabilità chirurgica ed il grado di resecabilità della massa tumorale, importanti per la formulazione del giudizio prognostico *quad valetudinem*. Ma, a dispetto di tali limiti, la classificazione WHO dei tumori cerebrali rimane la base per le scelte terapeutiche adiuvanti più appropriate (terapia farmacologica e/o radiante) e per la formulazione del giudizio prognostico *quad vitam*.

Anche se la stragrande maggioranza dei tumori cerebrali primitivi, soprattutto i gliomi, ha una prognosi pressoché uniformemente infausta, tuttavia la risposta terapeutica individuale è ampiamente variabile, anche in presenza di uno stesso istotipo tumorale, e non è possibile con i metodi diagnostici attuali tracciare precise linee guida per le scelte terapeutiche da utilizzarsi *ad hoc* per un determinato paziente, soprattutto per quanto concerne le terapie che coinvolgono specifici pathways molecolari o genetici della genesi tumorale.

È chiaro che vi è la necessità migliorare la classificazione dei tumori cerebrali primitivi in modo da ottenere uno schema flessibile che possa guidare le varie possibilità terapeutiche e che dia, nello stesso tempo, parametri univoci di risposta a tali terapie in

termini di risposta clinica ed outcome. È tuttavia difficile che, sulla base di quanto detto, la classificazione istopatologica da sola possa fornire risposte sufficienti in termini di end points per i differenti trials clinici. È più plausibile che uno studio contemporaneo di diversi “markers tumorali”, nell’accezione più ampia del termine, possibile con le più moderne tecniche ed apparecchiature di neuroimaging sia morfologico che funzionale possa, in un futuro non troppo remoto, giocare un ruolo pivotale nel fornire informazioni sulle differenze biologiche tra due tumori dello stesso istotipo e dello stesso grado istopatologico di malignità ma che rispondono in maniera drasticamente diversa alla terapia.

È noto che i tumori cerebrali maligni ed i gliomi, in particolare, sono caratterizzati, tra l’altro, da una neovascolarizzazione e neoangiogenesi esuberanti, che rappresentano un evento chiave per la crescita e la progressione tumorale. Purtroppo, i meccanismi fisiopatologici alla base di tale comportamento rimangono poco chiari. Uno degli eventi potrebbe essere quello di una co-opzione dei vasi da parte delle cellule tumorali con induzione dell’espressione di fattori che inducono apoptosi ed involuzione cellulare che, da ultimo, provocano necrosi ed ipossia. Ma proprio tale necrosi ed ipossia comportano l’induzione di fattori angiogenetici associati alla induzione di rilasci del VEGF (vascular endothelial growth factor) e, per esempio, dell’HIF (hypoxia-inducible factor)-1 alfa da parte delle cellule tumorali nella zona per-necrotica. Questi fattori innescano una serie di processi regolatori che da ultimo portano alla neovascolarizzazione tumorale, crescita e progressione tumorale e resistenza alla terapia.

Un'altra caratteristica dei tumori cerebrali e dei gliomi in particolare è che tutti, anche quelli più infiltranti, sono più o meno confinati all'interno delle varie “barriere”, fisiche e/o funzionali, dell'encefalo - come la barriera emato-encefalica (BEE) o le barriere strutturali create dai rivestimenti mielinici oppure dalla composizione assonale della sostanza bianca o dalla densità cellulare della sostanza grigia - e devono accrescersi e nutrirsi nel micro e nel macroambiente creato dalle stesse. Queste barriere cito-architettoniche del cervello offrono, tra l'altro, l'opportunità per le tecniche di neuroimaging di studiare i cambiamenti nei movimenti protonici, l'attività metabolica e le alterazioni dell'emodinamica create dalla presenza del tumore.

La possibilità di studiare in vivo ed in maniera incruenta tali meccanismi e stadierne la progressione potrebbe, in un futuro prossimo, comportare due effetti positivi: i) la possibilità di individuare il tipo istologico di un tumore cerebrale, soprattutto primitivo della serie gliale e posto in aree “eloquenti”, by-passando la necessità della terapia chirurgica con il solo scopo biottico; ii) avviare il paziente alle terapie farmacologica e radiante, anche di tipo “antiangiogenetico”, sulla scorta delle informazioni ottenute dalle tecniche di imaging sia morfologico che, soprattutto, funzionale.

In collaborazione con i Dott. Ciro Mainolfi e Mario Quarantelli, per quanto concerne l'Imaging PET/TC, con i Dott. Ferdinando Caranci, Andrea Elefante e Mario Quarantelli, sotto la supervisione del Prof. Arturo Brunetti, per quanto concerne gli studi di Risonanza Magnetica, e con la Prof.ssa Marialaura Del Basso De Caro, per quanto concerne gli studi istologici ed immunoistochimici, è stato effettuato il progetto di ricerca dal titolo “Imaging Integrato dei Tumori Cerebrali”.

Lo scopo di tale studio è stato quello di sottoporre i pazienti con tumori cerebrali maligni primitivi a studio PET/TC e Risonanza Magnetica con sequenze per diffusione, perfusione e spettroscopia in modo da anticipare, sulla scorta di tali esami, il grado di neo-angiogenesi tumorale e correlare tale dato alla potenziale malignità del tumore (grading istologico) ed offrire la possibilità di prevedere il tipo e sottotipo istologico del tumore già nella fase pre-operatoria. Tali dati sono stati poi correlati ai risultati degli studi istologici e, soprattutto, immunoistochimici sui campioni chirurgici degli stessi tumori ed analizzarne statisticamente i risultati.

METODI

Caratteristiche dei pazienti

Nel corso del triennio 2004-2007 sono stati studiati una serie di 21 pazienti affetti da tumore cerebrale primitivo maligno sotto la coordinazione del Dr. Felice Esposito. Tali soggetti erano 12 donne e 9 uomini, con età variabile tra 21 e 71 anni (media 56,6 anni; mediana 58 anni) (Tabella 1). Quindici pazienti (7 uomini e 8 donne) erano portatori di un astrocitoma WHO grado IV (glioblastoma multiforme); 3 soggetti (1 uomo e 2 donne) di un astrocitoma WHO grado III (anaplastico); due soggetti (1 uomo e 1 donna) di un oligodendroglioma WHO grado III; un soggetto maschio era portatore di un astrocitoma WHO grado II. La classificazione WHO del grado di malignità dei gliomi cerebrali prevede la suddivisione in 4 gradi (I-IV) sulla scorta di specifiche caratteristiche

istologiche quali: i) cellularità; ii) atipie nucleari; iii) attività mitotica; iv) pleomorfismo cellulare; v) iperplasia vascolare; vi) presenza di necrosi.

Tabella 1 – Caratteristiche dei pazienti oggetti dello studio

Sesso	Età	Diagnosi	Sede	Rimozione chirurgica*	Sopravvivenza**
F	58	GBM	Parieto-occipitale destro	Totale	Vivente - 12 mesi
F	46	Astrocitoma anaplastico	Frontale destro	Totale	Vivente - 12 mesi
F	57	GBM	Frontale sinistro	Totale	Vivente - 13 mesi
M	56	GBM	Fronto-temporale destro	Totale	Vivente - 16 mesi
F	61	GBM	Fronto-temporo-parietale destro	Totale	Vivente - 17 mesi
M	71	GBM	Temporo-insulare destro	Subtotale	Vivente - 18 mesi
F	55	GBM	Frontale destro	Totale	Vivente - 19 mesi
F	69	GBM	Frontale destro	Totale	Vivente - 19 mesi
F	66	GBM	Temporale sinistro	Totale	Vivente - 2 mesi
M	68	Astrocitoma anaplastico	Frontale destro	Totale	Vivente - 28 mesi
F	57	Oligodendroglioma grado III	Fronto-temporale sinistro	Subtotale	Vivente - 30 mesi
F	32	Astrocitoma grado II	Fronto-temporale destro	Totale	Vivente - 32 mesi
M	21	Oligodendroglioma grado III	Temporale sinistro	Subtotale	Vivente - 9 mesi
M	49	GBM	Fronto-temporale sinistro	Totale	Deceduto - 11 mesi
M	63	GBM	Parieto-occipitale sinistro	Totale	Deceduto - 13 mesi
F	59	GBM	Carrefur temporo-parieto-occipitale destro	Subtotale	Deceduto - 13 mesi
F	54	Astrocitoma anaplastico	Temporo-parietale destro	Totale	Deceduto - 18 mesi
F	64	GBM	Fronto-temporo-parietale destro	Totale	Deceduto - 20 mesi
M	56	GBM	Fronto-temporale destro	Totale	Deceduto - 23 mesi
M	58	GBM	"Butterfly glioma"	Biopsia	Deceduto - 4 mesi
M	69	GBM	Talamico destro	Biopsia	Deceduto - 5 mesi

Leggenda: **GBM**: glioblastoma multiforme (grado IV WHO); **Totale**: rimozione macroscopicamente totale della lesione; **Subtotale**: rimozione di $\geq 80\%$ della massa tumorale; **Biopsia**: semplice biopsia della lesione o rimozione $< 80\%$ della massa tumorale. ******: sulla scorta dell'ultimo follow-up.

I criteri di inclusione/esclusione sono stati: i) pazienti con nuova diagnosi di lesione occupante spazio intracranica intradurale intraparenchimale (tumore intracerebrale intraparenchimale); ii) pazienti in cui poteva essere esclusa con discreta probabilità la diagnosi di metastasi cerebrale da tumore maligno in altra sede; iii) tutti i pazienti dovevano essere candidabili all'intervento chirurgico, quanto meno di biopsia stereotassica della lesione cerebrale, in maniera di potere avere la possibilità di effettuare

gli studi istologici ed immunoistochimici di conferma dei risultati dell'imaging; iv) nessun paziente doveva essere stato già sottoposto ad intervento chirurgico di biopsia/rimozione della lesione nè a terapia farmacologica e/o radioterapica neo-adiuvante.

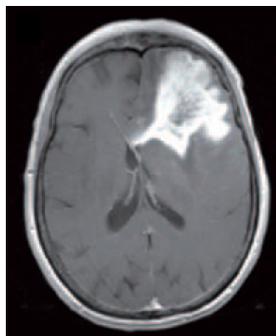
Tutti i pazienti sono stati sottoposti a Risonanza Magnetica 1.5 Tesla prima e dopo per fusione di mezzo di contrasto paramagnetico, con immagini ottenute anche per lo studio della diffusione, perfusione e spettroscopia. Gli stessi pazienti sono stati anche sottoposti ad esame PET/TC per lo studio del metabolismo delle cellule tumorali e per una valutazione del consumo del radiocomposto quale indice indiretto del grado di angiogenesi e, quindi, del grading tumorale. Una volta sottoposti ad intervento neurochirurgico, i campioni di tumore sono stati inviati in anatomia patologica per gli studi istologici ed immunoistochimiche.

METODOLOGIA DI STUDIO

Risonanza Magnetica morfologica

Tale esame costituisce la base di partenza per lo studio neuroradiologico dei tumori cerebrali ed ha costituito uno screening preliminare dei pazienti da includere nello studio e da avviare alle successive indagini. I pazienti sono stati sottoposti ad esame di risonanza magnetica nucleare con l'acquisizione di immagini pesate in T1 (tempo di rilassamento breve), in T2 ed in densità protonica (tempo di rilassamento lungo) sui tre piani dello spazio (assiale, sagittale e coronale), prima e dopo per fusione endovenosa di mezzo di contrasto paramagnetico (gadopentate dimeglumine [Gd-DTPA]). Le immagini

sono state ottenute utilizzando un'apparecchiatura convenzionale di 1.5 Tesla di potenza di campo magnetico.



Risonanza Magnetica encefalica 1.5 Tesla. Immagine assiale. Sequenza T1-weighted post-Gd-DTPA.

Paziente con GBM frontale sinistro. Il tumore mostra un netto ma disomogeneo incremento di segnale dopo gadolinio per la presenza di un'area centrale ipo-intensa da probabile necrosi. E' presente un discreto alone di edema perilesionale ed effetto massa sulle strutture circumviciniori e sul corno frontale del ventricolo laterale sinistro.

Il contrast enhancement di una lesione tumorale cerebrale alla RM convenzionale non è sempre affidabile dal punto di vista dell'ottenimento di informazioni circa il grado di vascolarizzazione tumorale e della conseguente neoangiogenesi. Infatti, l'enhancement tumorale è piuttosto dipendente dal grado di compromissione della barriera emato-encefalica (BEE) oltre che dalla reale proliferazione vascolare. Di conseguenza, non sempre glomi che mostrano scarso o nullo incremento contrastografico nel loro contesto si possono definire "di basso grado" e, di converso, non sempre tumori con incremento contrastografico sono forzatamente "di alto grado". Dalla letteratura si evince, infatti, che fino ad un 20% dei low-grade gliomas (LGG) mostra l'enhancement dopo gadolinio e fino ad un terzo dei glomi che non incrementano sono invece tumori più maligni.

Diffusion Weighted Imaging (DWI)

Le applicazioni della DWI nei tumori cerebrali sono utilizzate per stabilire: i) grading e cellularità; ii) danno post-chirurgico; iii) edema peritumorale; iv) integrità dei tratti di sostanza bianca.

Il razionale alla base dell'utilizzo della DWI per quantificare la *cellularità tumorale* si basa sulla premessa che la diffusività dell'acqua nel compartimento extracellulare è inversamente proporzionale alla densità ed alla capacità di attenuazione dei costituenti dello spazio intracellulare. In altre parole, maggiore è la cellularità tumorale e, quindi, il volume dello spazio intracellulare, minore è il coefficiente

di attenuazione apparente (Apparent Diffusion Coefficient [ADC]) a causa della minore diffusività dell'acqua data dalla riduzione relativa della possibilità per i protoni di muoversi nello spazio extracellulare. Di conseguenza, maggiore è il grado tumorale (maggiore cellularità), minore sarà il valore dell'ADC tumorale. Alcuni studi hanno dimostrato che il grado tumorale correla inversamente con l'ADC, possibilmente perché con l'aumentare del grado di malignità aumenta anche la cellularità. Ma, nonostante ciò, il ruolo della DWI quale esame per l'attribuzione del grado di malignità non può essere preso in grossa considerazione visto che i differenti gradi tumorali mostrano un sensibile overlap. Ciò può essere spiegato dall'ampia eterogeneità tissutale mostrata dai glomi sia di differenti gradi di malignità, sia dello stesso grado o, addirittura, all'interno dello stesso tumore. Infatti, è noto che un particolare glioma, soprattutto di grado elevato (III-IV), spesso contiene un continuum di aree con caratteristiche istologiche differenti (aree di grado II, aree di grado III ed aree di grado IV). Quindi, di conseguenza, l'ADC dipende dal sito che costituisce la ROI (region of interest)

Il razionale alla base dell'utilizzo della DWI per quantificare il *danno parenchimale post-operatorio* si basa sul fatto che un qualunque processo che risulti in un rigonfiamento cellulare, soprattutto se di insorgenza acuta, provoca una riduzione dello spazio extracellulare e, di conseguenza, una riduzione della diffusibilità protonica nel cervello. Ciò detto, dopo un intervento neurochirurgico, un danno cellulare si può verificare per varie ragioni: i) danno chirurgico diretto; ii) danno da spapolamento parenchimale; iii) danno vascolare da coagulazione e devascularizzazione del tumore. L'aspetto importante dell'utilizzo della DWI in questi casi non è tanto l'osservazione *sic et simpliciter* di tale effetto, quanto piuttosto l'evoluitività nel tempo delle aree di ridotta ADC nei pazienti che vengono sottoposti a terapie adiuvanti. Infatti, in alcuni casi aree di ridotta ADC possono mostrare enhancement contrastografico alla RM morfologica per rottura della BEE ma poi evolvono in encefalomalacia. È importante, quindi, sapere valutare quando tale enhancement significa ciò e quando significa ripresa di malattia e, in questi casi, la DWI può fare chiarezza e non scambiare erroneamente tali aree per recidiva tumorale e sottoporre il paziente a terapie aggressive e potenzialmente tossiche ma inutili.

L'utilizzo della DWI per la *differenziazione dell'edema peritumorale vasogenico versus infiltrativo* è stato tentato senza grosso successo vista l'ampia sovrapposizione dei valori di ADC nei due tipi principali di edema cerebrale, mentre è un campo di assoluto interesse il suo ruolo nell'ottenere le immagini di *trattografia della sostanza bianca* con l'utilizzo del *Diffusion Tensor Imaging (DTI)*.

La tecnica DTI permette di studiare la diffusibilità tridimensionale delle molecole (anisotropia) che, nel cervello, è fondamentale influenzata da due fattori citoarchitetturali: la mielina e gli assoni. Infatti, la membrana lipidica del rivestimento mielinico crea una barriera per la diffusione delle molecole che, in ultima analisi, risulta in differenti gradi di diffusione su piani prestabiliti. In ogni caso, la mielina non è la sola responsabile di tale fenomeno in quanto anche gli assoni che formano le fibre nervose, con le strutture subcellulari quali micro e macrofilamenti, microtubuli e membrane, contribuiscono alla diffusione anisotropica. Questa è massima lungo i piani paralleli alle fibre della sostanza bianca e minima sui piani verticali, specialmente in corrispondenza di grossi tratti di fibre come il tratto cortico-spinale. Nello studio dei tumori cerebrali, la trattografia DTI ha l'indubbio vantaggio di servire come *image-guided surgery* durante la resezione tumorale, specialmente quando tali esami sono fusi con altre immagini anatomiche.

Perfusion MR Imaging

Per i tumori cerebrali, le tecniche di *Perfusion MR Imaging* si propongono di studiare semiquantitativamente il grado di angiogenesi tumorale e permeabilità capillare, entrambi importanti markers biologici di malignità e fattori prognostici importanti. Come detto, la vascolarizzazione e la neoangiogenesi dei tumori cerebrali gioca un ruolo fondamentale non solo nel rifornire le cellule tumorali di ossigeno e metaboliti, ma anche per il potere infiltrativo delle cellule tumorali nel parenchima cerebrale adiacente e, inoltre, nel determinismo dell'ipossia e della necrosi tumorale.

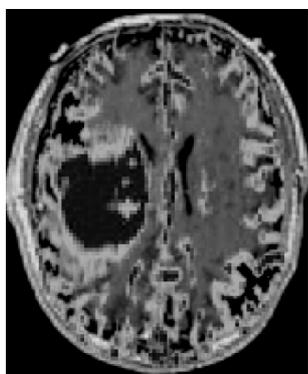
Come detto, molti fattori di crescita entrano in gioco nel determinismo del processo neoangiogenetico dei glomi cerebrali. Tra questi, in particolare, il VEGF. Alcuni studi hanno suggerito la possibilità di valutare il rCBF (relative Cerebral Blood Volume) sulla scorta del perfusion-weighted imaging (PWI) e, di conseguenza, di studiare e stimare con tali metodiche di imaging il grado di neovascolarizzazione tumorale. Quindi, con la PWI è possibile ottenere una misura indiretta del grado di espressione del VEGF in un determinato tumore, *in vivo*, sia nella fase diagnostica preoperatoria che nel follow up in corso di terapia con farmaci anti-angiogenetici.

I vari metodi di perfusion MR imaging permettono di stabilire in modo non invasivo tali caratteristiche dei tumori gliali. I due metodi più utilizzati sono la Dynamic Susceptibility Contrast-enhanced (DSC) Perfusion Imaging e la Dynamic Contrast-enhanced (DCE) T1-Weighted Permeability Imaging.

Come già più volte sottolineato, la permeabilità vascolare endoteliale costituisce una valida stima dell'integrità della BEE e sul grado di neovascolarizzazione. La DCE perfusion MR imaging consiste nell'acquisizione di immagini nelle sequenze a TR breve (T1-weighted) con la stima della forma della curva di concentrazione del mezzo di contrasto nel plasma, riferita alla funzione sistolica cardiaca, ed il time course dell'accumulo del mezzo di contrasto nei tessuti misurato in voxel individuali in modo da avere un calcolo dello spazio extravascolare extracellulare e del coefficiente di trasferimento endoteliale K^{trans} . Il metodo più usato per misurare la permeabilità vascolare è il DCE steady state T1-weighted method basato sul modello farmacocinetico di Tofts e Kermode, che utilizza una curva di incremento esponenziale correlata ad un modello teorico di analisi compartimentale dopo iniezione di una singola dose di Gd-DTPA. Questo modello matematico farmacocinetico compartimentale permette di calcolare la concentrazione del Gd-DTPA nei tessuti come funzione del tempo dopo un bolo endovenoso di mezzo di contrasto. I parametri principali di tale modello sono la permeabilità dell'endotelio, la misura frazionale del compartimento extracellulare extravascolare, la dose iniettata di Gd-DTPA, ed il time

corse della concentrazione plasmatica del Gd-DTPA stesso. Un secondo modello utilizzato compara l'intensità del segnale RM in T1 e la concentrazione del Gd-DTPA in Tq.

La DCE MR imaging offre anche altri importanti parametri quali: i) lo slope iniziale; ii) il time to peak; iii) l'area sotto la curva della concentrazione del mezzo di contrasto, che caratterizza il comportamento dell'incremento di segnale RM. Tali parametri, comunque, sono soggetti a relativa ampia variabilità a causa delle differenze di acquisizione del segnale RM e, quindi, il loro significato non è univoco.



Mappa rCBV su immagine assiale con sequenza T1-weighted post-Gd-DTPA.

Paziente con GBM fronto-temporale destro. La mappa mostra anomalità del volume ematico regionale che risulta marcatamente aumentato soprattutto alla periferia della massa tumorale indicante un alto grado di vascolarizzazione periferica e scarsa centrale, per la presenza di necrosi tissutale.

In ogni caso, il K^{trans} che, come detto, è una misura generale delle relazioni tra il time course della concentrazione plasmatica del Gd-DTPA ed i cambiamenti di concentrazione dello stesso Gd-DTPA nei voxel di tessuto cerebrale, fornisce una misura quantitativa del grado di accumulo del mezzo di contrasto nelle sequenze T1. Per il fatto che i gliomi di alto grado tendono a dimostrare un incremento in T1 dopo somministrazione del Gd-DTPA, non sorprende che il K^{trans} correla fortemente con il grado tumorale. Inoltre, anche il CBV, derivato dalla DCE MR imaging, correla fortemente con il grado di malignità tumorale, con i markers istologici di proliferazione e con l'indice MIB-1 (Ki-67). Infatti, con l'aumentare del grado di malignità tumorale, vi è un più alto incremento contrastografico sulle sequenze post-contrasto pesate in T1 e, quindi, del K^{trans} .

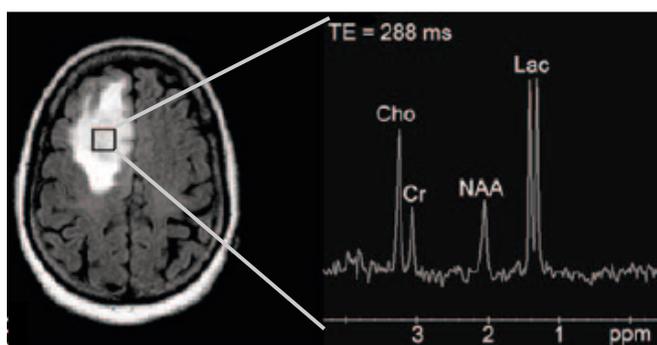
Proton MR Spectroscopic Imaging

Il valore nella pratica clinica del grading tumorale dei gliomi cerebrali stabilito con la risonanza magnetica spettroscopica ($^1\text{H-MR spectroscopy}$) è ancora *sub iudice* anche se molti studi hanno stabilito che la $^1\text{H-MR spectroscopy}$ permette di stabilire con un discreto margine di sicurezza tra gliomi di basso grado e di alto grado. La $^1\text{H-MR spectroscopy}$ permette anche la discriminazione tra tumore attivo e necrosi tumorale post-trattamento, nonché la discriminazione tra gliomi di basso grado (LGG) e gliomi di alto grado (HGG) mediante l'utilizzo di studi con lungo e/o corto tempo di eco.

Un interessante campo di studio della $^1\text{H-MR spectroscopy}$ è sul glioblastoma multiforme (GBM). Tale sottotipo di gliomi mostra relativamente vaste aree di ipossia e necrosi e già si è detto che l'ipossia è un forte promotore di angiogenesi ed invasione tumorale grazie alla liberazione di HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1). La neoangiogenesi tumorale indotta dall'ipossia provoca un circolo vizioso di produzione di microcircolo immaturo ed anormale che, non funzionando propriamente, induce ulteriore ipossia e, da ultimo, necrosi.

Come è risaputo, il lattato è il prodotto finale della glicolisi anaerobia e, per questo, la sua concentrazione può essere correlata con l'ipo-ossigenazione (ipossia) nel tessuto tumorale. Inoltre, la presenza di certi lipidi (lipidi "mobili") è correlata con la presenza di necrosi tissutale dove la morte cellulare si associa a rottura delle membrane lipidiche. Nei gliomi cerebrali, la presenza dei lipidi viene osservata primariamente nei HGG ed, in particolare, nel GBM mentre la presenza di lattati correla con minore efficacia. Negli studi di $^1\text{H-MR spectroscopy}$ il picco del lattato e dei lipidi mobili si sovrappongono parzialmente nella regione compresa tra 0.9 e 1.3 ppm (parti per milione) e, a causa di tale sovrapposizione più o meno parziale, i lattati ed i lipidi possono essere trattati come un singolo metabolita pur rappresentando significati diversi. Infatti, le regioni "del lattato" rappresentano più specificatamente aree ipossiche ma ancora vitali, mentre le regioni "dei lipidi mobili" rappresentano più tessuto necrotico non vitale. Dunque, la differenziazione seppur fine dei due picchi può essere importante nello studio e nella differenziazione dell'ipossia e della necrosi in un particolare glioma

cerebrale. Di fatti, il picco di lipidi mobili è presente quasi esclusivamente nei HGG mentre è assente o, comunque, molto ridotto nel LGG; al contrario, il picco di lattato è riscontrato in entrambi i sottogruppi tumorali. Inoltre, le regioni con alto picco di lattato e/o lipidi sono spesso presenti in prossimità delle aree con alto indice di anormalità vascolare studiato con le tecniche di DSC MR imaging.



¹H Spettroscopia RM

Paziente con astrocitoma grado III frontale destro.

Lo spettro mostra la presenza di metaboliti del lattato all'interno della massa tumorale.

Infine, studi recenti suggeriscono che la presenza di metaboliti quali il lattato possono costituire un indice di relativa radioresistenza dei gliomi.

Tomografia ad Emissione di Positroni (PET)

La Tomografia ad Emissione di Positroni (PET) è una tecnica di imaging funzionale e metabolico che utilizza un radiotracciante la cui azione e metabolismo vengono seguiti e misurati *in vivo*. Primariamente, la PET viene utilizzata per misurare l'indice di attività neuronale ma anche per la stima del metabolismo regionale cerebrale (regional Cerebral Metabolic Rate [rCMR]) ed il flusso ematico cerebrale (regional Cerebral Blood Flow [rCBF]). Per il presente studio è stata eseguita la metodica PET/TC con l'utilizzo del ¹⁸F-Desossiglucosio (FDG) quale radiotracciante. E' inoltre possibile, ma non è stato attuato nei pazienti oggetto di questo studio, la resezione dei glomi usando le immagini PET/TC nei sistemi di *image guided surgery* come la neuronavigazione, tali da avere in real time la guida verso ciò che è parenchima cerebrale e ciò che sono aree di ipercaptazione del radiotracciante.

L'esame PET/TC è stato eseguito a digiuno e con valori glicemici $\leq 120\text{mg/dL}$, 60 minuti dopo la somministrazione endovenosa di $370\text{ MBq } [^{18}\text{F}]\text{FDG}$.

Successivamente è stato eseguito il topogramma del cranio per la definizione dell'inclinazione e dello spessore delle scansioni TC.

Sono state eseguite scansioni con collimazione del fascio di $4 \times 2.5\text{ mm}$, 120 kV , 120 mA , tempo di rotazione 0.5 secondi .

Successivamente sono state acquisite le immagini PET della distribuzione del tracciante.

Le immagini TC ottenute sono state ricostruite con spessore di $2.5\text{ e }5\text{ mm}$ ed intervallo di ricostruzione di 1 mm per la generazione di immagini di PET-TC.

Le immagini PET sono state ricostruite con sezioni tomografiche di 4.25 mm di spessore orientate secondo piani assiali, coronali e sagittali utilizzando la TC come mappa per la correzione dell'attenuazione e mediante ricostruzione iterativa (OSEM) con FOV di 28 cm .

Le immagini TC e PET sono state trasferite sulla workstation Xeleris, sulla quale l'esame TC viene ricampionato allo spessore della PET con trasformazione della matrice da 512×512 a 128×128 .

Le immagini PET-TC sono state analizzate sulla workstation Xeleris con protocollo PET CT Review.

Le sole immagini TC sono trasferite anche sulla workstation Vitrea.

Un medico nucleare ed un radiologo hanno letto gli esami indipendentemente, senza conoscere i risultati delle altre metodiche diagnostiche mediante RM.

Il medico nucleare ha interpretato le immagini PET ed ha descritto il pattern di captazione del tracciante a livello del parenchima cerebrale

Il grado di uptake del tracciante è stato valutato con analisi qualitativa e semiquantitativa ed espresso come Standardised Uptake Value (SUV_{max}). Per la localizzazione anatomica il medico nucleare ha utilizzato la stessa classificazione anatomica usata dal radiologo.

Il radiologo ed il medico nucleare: i) hanno espresso un giudizio sulla co-registrazione delle immagini a livello dell'encefalo utilizzando una scala qualitativa (scarsa, discreta, buona ed eccellente sovrapposizione delle informazioni morfologiche e funzionali a livello dell parenchyma cerebrale); ii) hanno successivamente analizzato congiuntamente le immagini PET-TC cerebrale confrontando le informazioni che ciascuno aveva ottenuto dalla lettura del singolo esame; iii) hanno poi valutato il valore aggiunto della informazione metabolica relativamente alle altre indagini effettuate definendo il grado di metabolismo tumorale in base: a) all'accumulo ed al consumo del radiotracciante; b) alla diffusione del radiotracciante a seguito della rottura della BEE (barriera emato-encefalica); c) alla diffusione del radiotracciante a seguito della aumentata vascolarizzazione intratumorale e/o peritumorale.

Intervento chirurgico

Nel corso dello stesso ricovero (in caso di regime di ricovero ordinario) o, comunque, entro due settimane dalla esecuzione di tutti gli esami (in caso di esecuzioni delle indagini neuroradiologiche in regime di day hospital) i pazienti sono stati sottoposti ad intervento neurochirurgico di rimozione o biopsia della massa tumorale cerebrale.

Il giudizio "chirurgico" all'esame macroscopico del tessuto tumorale è stato espresso nella valutazione dei seguenti parametri: i) colore del tessuto; ii) grado di vascolarizzazione del tumore; iii) consistenza; iv) presenza o meno di una demarcazione tra la massa tumorale ed il parenchima cerebrale sano; v) presenza o meno di necrosi.

Nei casi in cui non vi era indicazione all'intervento chirurgico "a cielo aperto" cioè mediante craniotomia (cattive condizioni del paziente, tumore in aree profonde, etc.) è stata eseguita una biopsia

della lesione mediante tecnica stereotassica frameless. Tale tecnica ha comportato l'esecuzione di una RM standard post-contrasto con l'acquisizione di immagini sul piano assiale con sequenze volumetriche (SPGR) senza inclinazione del piano assiale. Sullo scalpo del paziente erano stati precedentemente applicati dei markers cutanei (fiducials) rilevabili dalla RM. Le immagini acquisite in formati DICOM sono state trasferite alla workstation BrainLAB per l'elaborazione e per l'acquisizione delle coordinate tridimensionali dei fiducials e la preparazione del target e dell'entry point per stabilire il percorso della sonda bioptica. Le immagini processate sono state poi trasferite all'apparecchiatura di neuronavigazione presente in sala operatoria. Il paziente è in anestesia generale; la testa viene fissata alla testiera a tre punte di Mayfield-Kees sulla quale viene altresì fissata l'antenna a tre sfere del sistema di neuronavigazione in maniera da renderla solidale con la testa. Il sistema di neuronavigazione è dotato di telecamere a raggi infrarossi che riconoscono in ogni momento la posizione dei fiducials cutanei riferita all'antenna a tre sfere e rielabora una mappa volumetrica del contenuto intracranico grazie alle immagini di RM. La sonda bioptica, dotata anch'essa di sferette riconoscibili dalle telecamere, è quindi guidata in real time dalle immagini fornite dal neuronavigatore che ricostruisce momento per momento la posizione relativa dei vari strumenti (antenna, sonda bioptica, etc). In tal modo è possibile mediante un foro di trapano di circa 1 cm di diametro, praticato in corrispondenza dell'entry point stabilito, guidare la sonda nella direzione voluta verso il target ed eseguire un prelievo della lesione tumorale da inviare agli studi istopatologici. Quantunque la biopsia stereotassica frameless – vi è anche la possibilità di eseguire una biopsia "framed", cioè con l'ausilio del casco stereotassico, è una procedura minimamente invasiva e di veloce esecuzione, cionondimeno vi sono alcuni svantaggi quali: i) possibilità di sanguinamento tale da richiedere la conversione a craniotomia; ii) inadeguatezza del prelievo bioptico; iii) prelievo bioptico adeguato ma eseguito in aree "non adeguate" (aree di necrosi, area di "basso grado" coesistente con aree di "alto grado") tale da rendere la diagnosi istologica non corretta e quindi fornire un falso grado tumorale; etc.

Esame istopatologico

Tutte le lesioni reseccate chirurgicamente o biopsizzate sono state analizzate istologicamente.

L'anatomopatologo ha analizzato gli specimens tumorali in termini di aspetto macroscopico (colore, consistenza, dimensioni, etc.), di caratteristiche alla microscopia ottica ed in base alle indagini immunoistochimiche volte a valutare i seguenti parametri: i) cellularità del tessuto tumorale; ii) presenza di atipie cellulari e/o nucleari; iii) pleomorfismo nucleare; iv) necrosi; v) presenza di mitosi; vi) presenza e grado di immunopositività per i diversi fattori di crescita; grado di espressione degli antigeni ki-67 e bcl-2.

Le sezioni istologiche sono state studiate dal patologo ignaro dei risultati dei precedenti esami neuroradiologici.

Il tessuto tumorale è stato incluso in paraffina per ottenere sezioni di 5 mcm di spessore. Queste sono state successivamente deidratate a 60°C per 24 ore, passate in xilolo, alcool e acqua distillate, poi in H₂O₂ al 3% per 10 minuti. Le sezioni sono state poi passate in citrato tamponato in microonde a 650 W (3 cicli per 5 minuti) allo scopo di smascherare gli antigeni. Alla fine sono state incubate in camera umida insieme con l'anticorpo primario.

Gli studi immunoistochimici sono stati eseguiti per ogni campione sui vasi tumorali (endotelio e sub-endotelio), sul tessuto perivascolare, sul parenchima tumorale e sul parenchima cerebrale circostante il tumore.

Tra gli altri, è stata testata l'espressione del VEGF (Vascula Endothelial Growth Factor) (Neomarkers 1:50 overnight), TGF- β (Trasforming Growth Factor β) (BIODESA 1:300 per 40 minuti), EGF-R (Epidermal Growth Factor – Receptor) (DAKO 1:200, 18-40 minuti di incubazione e poi incubazione in pepsina acida). Campioni di cute per il EGF-R, mammella per il VEGF ed intestino per il TGF- β sono stati utilizzati quali controlli positivi. I controlli positivi sono stati ottenuti eliminando l'anticorpo monoclonale primario. Le sezioni sono state poi lavate in TRIS per eliminare l'eccesso di anticorpi, incubate in camera umida con l'anticorpo secondario per 20 minuti e lavate nuovamente in

TRIS per 5 minuti. Il complesso streptavidina-biotina e diaminobenzidina (DAB) è stato utilizzato per la detezione dell'antigene. Le sezioni sono state poi colorate con ematossilina per 1 minuto per evidenziare i nuclei e preparate per l'esame microscopico.

Il Ki-67 è stato determinato usando l'anticorpo monoclonale MIB-1 (Immunothech, diluizione 1:100, overnight incubation) ed il sistema DAB-streptavidina-biotina per l'evidenza dell'antigene. La componente proliferativa è stata espressa come indice nucleare (numero di nuclei positivi da 5 centri random). Un campione di carcinoma mammario è stato usato quale controllo positivo. L'espressione del bcl-2 è stato determinato usando l'anticorpo monoclonale anti bcl-2 (Menarini 1:100, incubazione in camera umida per 1 ora).

L'immunopositività per i fattori di crescita è stata valutata come: i) 0 (assente); ii) 1 (equivoca); iii) 2 (lieve e/o focale); iv) 3 (moderata); v) 4 (intensa e/o diffusa). L'immunopositività per il Ki-67 e per il bcl-2 è stata valutata come: i) 0 (assente); ii) 1 (positività fino al 5%); iii) 2 (positività tra 5 e 10%); iv) 3 (positività > 10%).

Analisi statistica

I dati ottenuti da ognuna delle tecniche sono stati correlati a gradi numerici per facilitare il confronto statistico in modo da individuare il grado di predittività delle tecniche di imaging di anticipare i risultati ottenuti dagli studi immunoistochimici.

È stato creato un database *ad hoc* ed i dati sono stati valutati utilizzando softwares di analisi statistica (SPSS 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL; Systat 13.0, Point Richmond, CA), sia con analisi univariata che multivariata ed usando il Pearson Chi-square test ed il Fisher's exact test (two tails). Il livello di significatività statistica è stato fissato a $p=0.05$.

RISULTATI

Tutti i pazienti hanno ben tollerato le procedure diagnostiche e chirurgiche cui sono stati sottoposti, senza riportare alcuna complicanza di rilievo.

I dati relativi alla diagnosi neuroradiologica effettuata sulla scorta della Risonanza Magnetica morfologica sono stati confrontati sia con quelli derivato dalle altre metodiche di Risonanza Magnetica (DWI, perfusion e spettroscopia), sia con le informazioni derivate dall'esame PET-TC. Questi poi sono stati confrontati con le informazioni derivate dall'intervento chirurgico e tutte queste insieme sono state confrontate con i risultati degli esami istopatologici (Tabella II).

Studi di Risonanza Magnetica standard

Sulla scorta dei soli dati di RM morfologica, è stato possibile porre il sospetto diagnostico di GBM in 12/15 pazienti. Nei rimanenti tre casi la diagnosi neuroradiologica era stata di tumore di alto grado sì, ma non era certo se trattavasi di grado IV ($p < 0.01$).

Riguarda ai casi di astrocitoma anaplastico (WHO grado III), la RM morfologica aveva fornito una diagnosi esatta in 2/3 casi, mentre in entrambi gli oligodendrogliomi grado III e nel LGG era stato possibile anticipare la diagnosi corretta.

Studi DWI

Sulla scorta del Diffusion Weighted Imaging (DWI), 13/15 GBM erano stati correttamente sospettati mentre due casi erano stati erroneamente diagnosticati come astrocitomi anaplastici. Tutti i casi di astrocitoma grado III, di oligodendroglioma grado III e dell'astrocitoma grado II erano comunque stati correttamente sospettati ($p < 0.01$).

Perfusion MR imaging

Gli studi di perfusion MR imaging sono stati quelli che maggiormente hanno correlato con la diagnosi finale istopatologica. Infatti tutti i casi di GBM, i casi di HGG grado III, di oligodendroglioma grado III e di LGG, diagnosticati pre-operatoriamente, sono stati poi confermati dai reperti anatomopatologici ($p < 0.001$).

Proton MR Spectroscopic Imaging

Tali studi hanno fatto correttamente sospettare tutti i 15 casi di GBM ($p < 0.001$), mentre 1 caso sospetto per gliomi grado II è poi risultato essere di grado III ed 1 caso dato per grado II è stato poi confermato essere un oligodendroglioma III. La diagnosi del caso di LGG è risultata essere corretta.

PET

In 14 dei 15 casi di pazienti poi confermati avere un glioblastoma multiforme, l'esecuzione degli esami neuroradiologici e della PET-TC ha dato come risultato quello di un tumore ad alto indice di proliferazione e vascolarizzazione con alto metabolismo soprattutto nelle porzioni periferiche. In particolare, l'esame PET ha evidenziato in tutti i casi un marcato accumulo del radiocomposto nella sede della neoplasia, soprattutto nella porzione periferica, indicativo di intensa attività metabolica e di neoangiogenesi, compatibile con la diagnosi di glioma di alto grado. Nel caso rimanente, a dispetto dell'alto SUV_{max} , era stato diagnosticato come HGG grado III.

Nei casi di astrocitoma anaplastico (WHO grado III), la predittività del grading tumorale è stato esatto in due casi su tre mentre in un caso il grado è stato sovrastimato rispetto alla diagnosi istologica definitiva.

Nei casi di oligodendroglioma WHO grado III, vi è stato un notevole grado di predittività oltre che del grado istologico, anche dell'istotipo tumorale, grazie soprattutto alla correlazione con le immagini TC, che hanno evidenziato la presenza di calcificazioni intratumorali, caratteristiche di tale istotipo tumorale.

Infine, nel caso di glioma di basso grado (WHO grado II), esso era stato effettivamente individuato come tale; in particolare l'esame PET aveva evidenziato un moderato/scarso accumulo del radiocomposto nella sede della neoplasia, indicativo di modesta attività metabolica e di neoangiogenesi, compatibile con la diagnosi di glioma di basso grado.

Tabella 2 – Risultati delle singole metodiche di Imaging.

Diagnosi finale	RM morfologica	DWI	Perfusion MRI	1H Spettroscopy	PET/TC
GBM	12/15	13/15	15/15	15/15	14/15
HGG grado III	2/3	3/3	3/3	2/3	2/3
Oligo grado III	2/2	1/2	2/2	1/2	2/2
LGG	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1

Leggenda: **GBM:** glioblastoma multiforme (grado IV WHO); **HGG:** High Grade Glioma; **Oligo:** Oligodendroglioma; **LGG:** Low Grade Glioma.

CONCLUSIONI

Gli studi di Imaging Integrato rappresentano un interessante campo di ricerca e applicazione clinica nello studio delle caratteristiche radiologiche e metaboliche dei tumori cerebrali primitivi quali i gliomi. Sulla scorta di tali studi è possibile ottenere una diagnosi preoperatoria di tali tumori ed una stima accurata del grado di malignità istologica. Tali risultati potrebbero in un futuro prossimo avviare alle procedure neurochirurgico nei pazienti non candidabili all'intervento, anche al solo scopo bioptico col fine di ottenere una corretta diagnosi anatomopatologica prima di avviare il paziente a radio e/o chemioterapia. Inoltre, tali studi possono costituire un valido ed interessante strumento di follow-up di tali terapie e permettere lo studio di nuovi farmaci antiangiogenetici o differenti protocolli radioterapici.

BIBLIOGRAFIA

(1-21)

1. Bulakbasi N, Guvenc I, Onguru O, Erdogan E, Tayfun C, Ucoz T: The added value of the apparent diffusion coefficient calculation to magnetic resonance imaging in the differentiation and grading of malignant brain tumors. **J Comput Assist Tomogr** 28:735-746, 2004.
2. Bulakbasi N, Kocaoglu M, Farzaliyev A, Tayfun C, Ucoz T, Somuncu I: Assessment of diagnostic accuracy of perfusion MR imaging in primary and metastatic solitary malignant brain tumors. **AJNR Am J Neuroradiol** 26:2187-2199, 2005.
3. Cai J, Ahmad S, Jiang WG, Huang J, Kontos CD, Boulton M, Ahmed A: Activation of vascular endothelial growth factor receptor-1 sustains angiogenesis and Bcl-2 expression via the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in endothelial cells. **Diabetes** 52:2959-2968, 2003.
4. Cai W, Chen K, Mohamedali KA, Cao Q, Gambhir SS, Rosenblum MG, Chen X: PET of vascular endothelial growth factor receptor expression. **J Nucl Med** 47:2048-2056, 2006.
5. Cai W, Chen X: Multimodality imaging of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor expression. **Front Biosci** 12:4267-4279, 2007.
6. Cha S: Update on brain tumor imaging. **Curr Neurol Neurosci Rep** 5:169-177, 2005.

7. Cha S: Update on brain tumor imaging: from anatomy to physiology. **AJNR Am J Neuroradiol** 27:475-487, 2006.
8. Fischer I, Gagner JP, Law M, Newcomb EW, Zagzag D: Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. **Brain Pathol** 15:297-310, 2005.
9. Gagner JP, Law M, Fischer I, Newcomb EW, Zagzag D: Angiogenesis in gliomas: imaging and experimental therapeutics. **Brain Pathol** 15:342-363, 2005.
10. Gumprecht H, Grosu AL, Souvatsoglou M, Dzewas B, Weber WA, Lumenta CB: 11C-Methionine positron emission tomography for preoperative evaluation of suggestive low-grade gliomas. **Zentralbl Neurochir** 68:19-23, 2007.
11. Huang Y, Lisboa PJ, El-Deredy W: Tumour grading from magnetic resonance spectroscopy: a comparison of feature extraction with variable selection. **Stat Med** 22:147-164, 2003.
12. Inglese M, Brown S, Johnson G, Law M, Knopp E, Gonen O: Whole-brain N-acetylaspartate spectroscopy and diffusion tensor imaging in patients with newly diagnosed gliomas: a preliminary study. **AJNR Am J Neuroradiol** 27:2137-2140, 2006.
13. Kuesel AC, Sutherland GR, Halliday W, Smith IC: 1H MRS of high grade astrocytomas: mobile lipid accumulation in necrotic tissue. **NMR Biomed** 7:149-155, 1994.
14. Lev MH, Ozsunar Y, Henson JW, Rasheed AA, Barest GD, Harsh GRt, Fitzek MM, Chiocca EA, Rabinov JD, Csavoy AN, Rosen BR, Hochberg FH, Schaefer PW, Gonzalez RG: Glial tumor grading and outcome prediction using dynamic

- spin-echo MR susceptibility mapping compared with conventional contrast-enhanced MR: confounding effect of elevated rCBV of oligodendrogliomas [corrected]. **AJNR Am J Neuroradiol** 25:214-221, 2004.
15. Maia AC, Jr., Malheiros SM, da Rocha AJ, da Silva CJ, Gabbai AA, Ferraz FA, Stavale JN: MR cerebral blood volume maps correlated with vascular endothelial growth factor expression and tumor grade in nonenhancing gliomas. **AJNR Am J Neuroradiol** 26:777-783, 2005.
 16. Moulin-Romsee G, D'Hondt E, de Groot T, Goffin J, Sciote R, Mortelmans L, Menten J, Bormans G, Van Laere K: Non-invasive grading of brain tumours using dynamic amino acid PET imaging : does it work for (11)C-Methionine? **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, 2007.
 17. Pauleit D, Langen KJ, Floeth F, Hautzel H, Riemenschneider MJ, Reifenberger G, Shah NJ, Muller HW: Can the apparent diffusion coefficient be used as a noninvasive parameter to distinguish tumor tissue from peritumoral tissue in cerebral gliomas? **J Magn Reson Imaging** 20:758-764, 2004.
 18. Potzi C, Becherer A, Marosi C, Karanikas G, Szabo M, Dudczak R, Kletter K, Asenbaum S: [11C] methionine and [18F] fluorodeoxyglucose PET in the follow-up of glioblastoma multiforme. **J Neurooncol** 84:305-314, 2007.
 19. Sorensen AG, Tievsky AL, Ostergaard L, Weisskoff RM, Rosen BR: Contrast agents in functional MR imaging. **J Magn Reson Imaging** 7:47-55, 1997.
 20. Xia G, Kumar SR, Hawes D, Cai J, Hassanieh L, Groshen S, Zhu S, Masood R, Quinn DI, Broek D, Stein JP, Gill PS: Expression and significance of vascular

endothelial growth factor receptor 2 in bladder cancer. **J Urol** 175:1245-1252, 2006.

21. Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, Semenza GL: Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. **Cancer** 88:2606-2618, 2000.

INDICE

Obiettivi degli Studi oggetto della Tesi	2
Introduzione	2
<i>Background</i>	2
Metodi	6
<i>Caratteristiche dei pazienti</i>	6
Metodologia di Studio	8
Risonanza Magnetica morfologica	8
Diffusion Weighted Imaging (DWI)	9
Perfusion MR Imaging	11
Proton MR Spectroscopic Imaging	14
Tomografia ad Emissione di Positroni (PET)	15
Intervento chirurgico	17
Esame istopatologico	19
<i>Analisi statistica</i>	20
Risultati	21
<i>Studi di Risonanza Magnetica standard</i>	21
<i>Studi DWI</i>	22
<i>Perfusion MR imaging</i>	22
<i>Proton MR Spectroscopic Imaging</i>	22
<i>PET</i>	23
Conclusioni	24
Bibliografia	25
Indice	29