



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

RUOLO DELL'IMAGING DI PERFUSIONE NELLA VALUTAZIONE
DEI GLIOMI CEREBRALI

DR. FABIO TORTORA

Ciclo XXII

OBIETTIVI DEGLI STUDI OGGETTO DELLA TESI

Obiettivo. Chiarire il ruolo dell'imaging di perfusione (PWI) nella caratterizzazione dell'eterogeneità emodinamica dei gliomi cerebrali e dei tessuti circostanti, e nella differenziazione dei gliomi di alto grado da quelli di basso grado. L'impostazione terapeutica e la prognosi dipendono dalla accurata distinzione tra tumori di alto e di basso grado, e sono state proposte diverse modalità di imaging per permettere l'accurata identificazione del grado di malignità. Lo studio morfologico con utilizzo di immagini pesate in T1, prima e dopo mezzo di contrasto, e in T2 è considerato il gold standard per la diagnosi dei tumori cerebrali, ma sono state segnalate alcune discrepanze tra reperti RM e risultati anatomico-patologici

INTRODUZIONE

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. 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 trias 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 centrale 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 stadiarne 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.

Lo studio di perfusione (PWI) è una tecnica RM veloce ed efficace che viene sempre più spesso utilizzata nello studio delle neoformazioni cerebrali. Numerose sono le tecniche proposte per misurare parametri di perfusione cerebrale quali il volume ematico, il tempo di transito, la clearance, la frazione di estrazione, il flusso ematico e il prodotto permeabilità-area di superficie. Nella pratica clinica, comunque, la metodica che è stata più largamente utilizzata è quella dinamica basata sulla suscettibilità magnetica da iniezione in bolo di un mezzo di contrasto endovascolare esogeno, quale il gadopentetato di dimeglumina, ed il parametro emodinamico più misurato è stato il volume ematico cerebrale (CBV). Tale metodica consente di individuare, nel contesto della massa tumorale e dei tessuti circostanti, aree con diverse caratteristiche emodinamiche e può

aiutare nell'identificazione del grado di malignità dei gliomi. Diversi studi hanno dimostrato che la valutazione quantitativa del CBV riflette la micro vascolarizzazione e l'angiogenesi tumorale. Il grado di vascolarizzazione di un tumore è correlato direttamente col suo grado di malignità, e la densità dei microvasi tumorali è un importante indice prognostico in pazienti con glioma. Tuttavia, i gliomi di basso grado quali gli oligodendrogliomi possono presentare aree con alti valori di rCBV non indicativi di malignità, limitando l'accuratezza delle mappe di CBV nella definizione della malignità dei tumori di origine gliale. Con l'introduzione nella pratica clinica di scanner a 3T, si sta diffondendo l'interesse per le potenzialità diagnostiche dell'imaging RM a 3T rispetto al più diffuso e consolidato imaging a 1,5 T. La RM praticata a campi magnetici più alti permette di ottenere un maggiore rapporto segnale/rumore (SNR) e una migliore risoluzione spaziale e temporale. Tali vantaggi possono essere in parte perduti per effetto di alcune limitazioni, quali le modificazioni dei tempi di rilassamento, l'aumento degli artefatti da chemical shift e da suscettibilità magnetica e le problematiche inerenti la sicurezza.

Lo scopo di tale studio è stato quello di valutare in maniera retrospettiva i pazienti con tumori cerebrali maligni primitivi a studio Risonanza Magnetica con sequenze morfologiche e di perfusione in modo da anticipare, sulla scorta di tali esami, il grado di neo-angiogenesi tumorale e correlare tale dato al grading istologico e , soprattutto, immunohistochimici sui campioni chirurgici degli stessi tumori.

METODI

Caratteristiche dei pazienti

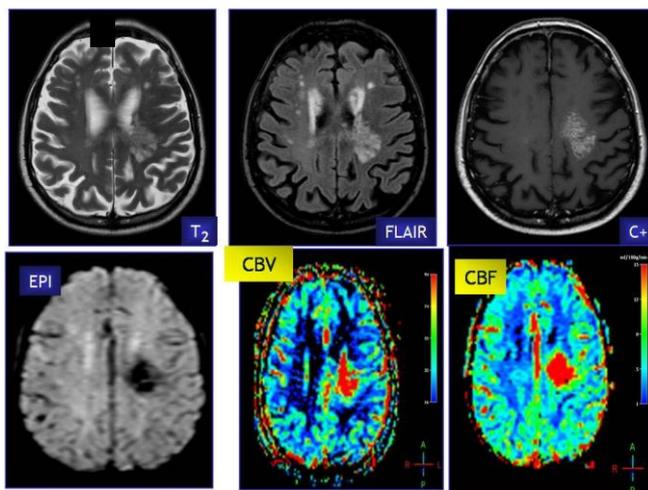
Sono stati analizzati retrospettivamente 21 pazienti affetti da tumore cerebrale primitivo maligno seguiti dal Dr. Felice Esposito, presso il reparto di neurochirurgica dell'Università Federico II di Napoli. Tali soggetti erano 12 donne e 9 uomini, con età variabile tra 21 e 71 anni (media 56,6 anni; mediana 58 anni). Quindici pazienti erano portatori di un astrocitoma WHO grado IV (glioblastoma multiforme); 3 soggetti di un astrocitoma WHO grado III (anaplastico); due soggetti 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.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a Risonanza Magnetica 1.5 o 3 Tesla con studio morfologico prima e dopo perfusione di mezzo di contrasto paramagnetico e con studio di perfusione. Una volta sottoposti ad intervento neurochirurgico, i campioni di tumore sono stati inviati in anatomia patologica per gli studi istologici ed immunohistochemiche.

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. La RM convenzionale includeva le seguenti immagini: a) assiali pesate in T2 fast spin echo (FSE) (spessore 5 mm, gap 1 mm, TR 5000 ms, TE 85 ms, FOV 24 cm, NEX 1, matrice 448×320, tempo di acquisizione 2 min 39 s); b) assiali FLAIR (fluid attenuated inversion recovery) (spessore 5 mm, gap 1 mm, TR 11000 ms, TE 140 ms, tempo di inversione, IT 2250, FOV 24 cm, NEX 2, matrice 288×192; tempo di acquisizione 5 min 53 s); c) T1-pesate 3D FSPGR (volume- fast spoiled gradient echo) dopo somministrazione di gadolinio (spessore: 1,4 mm, TR 225 ms, TE 3,2 ms, FOV 24 cm, FA 15°, NEX 1, matrice 320×288, tempo di acquisizione 2–3 min) che venivano acquisite dopo il PWI.



Risonanza Magnetica encefalica 1.5 Tesla.

Immagine assiale. Sequenze T2, FLAIR e T1 dopo post-Gd-DTPA con studio della perfusione e mappa di CBV e CBF

Paziente con Glioma fronto-parietale sinistro.

Il tumore mostra un basso segnale in T2 da elevata cellularità con netta e disomogenea impregnazione dopo gadolinio. Lo studio di perfusione mostra un netto incremento delle mappe di CBV e CBF nella sede della lesione.

L'impregnazione 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'impregnazione tumorale è piuttosto dipendente dal grado di compromissione della barriera emato-encefalica (BEE) oltre che dalla reale proliferazione vascolare (Fig. 1). 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 (Fig. 2).

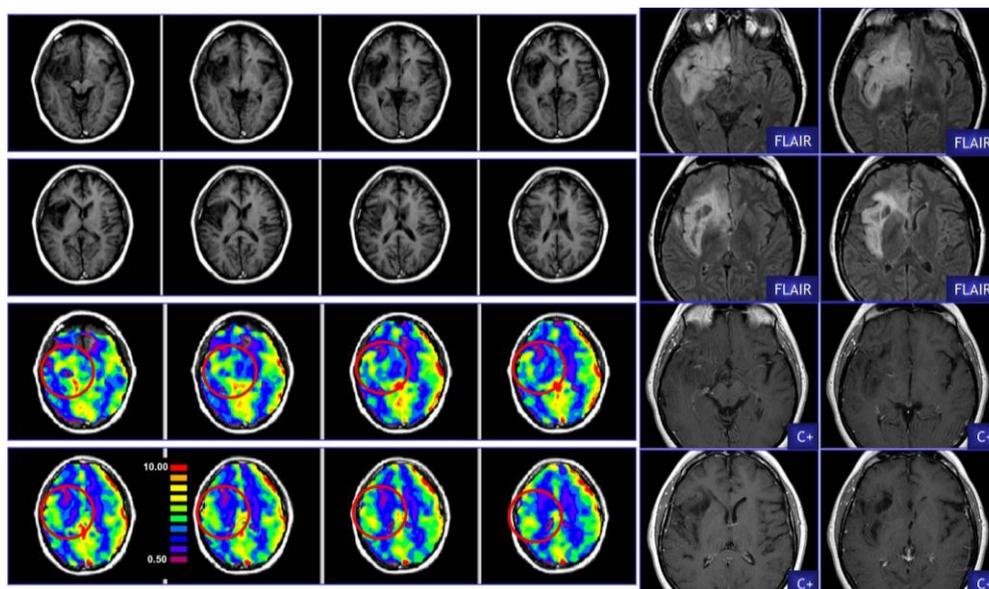


Fig. 2.

Immagine assiale. Sequenze T1, FLAIR e T1 dopo post-Gd-DTPA con studio della perfusione e mappa di rCBV

Paziente con astrocitoma di grado III fronto-insulare destro.

Il tumore mostra diffuse caratteristiche infiltranti con elevato segnale in FLAIR e basso segnale in T1 con coinvolgimento dell'insula e della capsula esterna. Nonostante la mancanza di impregnazione dopo gadolinio, lo studio di perfusione mostra un netto incremento del rCBV segno di elevata malignità della lesione confermata dall'esame istologico.

Perfusion MR Imaging

L'imaging mediante RM con valutazione della perfusione trae vantaggio dall'uso di campi magnetici elevati sia utilizzando mezzo di contrasto (MdC) esogeno (DSC, "dynamic susceptibility contrast") che MdC endogeno (ASL, "arterial spin labelling").

DSC

È sicuramente la più veloce e la più usata nella pratica clinica. Il più alto S/R e l'accentuata suscettibilità magnetica rispetto alle apparecchiature da 1,5 T rendono l'imaging molto più affidabile. Alla potenza di campo di 1,5 T la misurazione dei parametri emodinamici è limitata dal basso rapporto S/R dato che il passaggio del MdC è così rapido che non consente di raccogliere dati sufficienti a calcolare questi parametri con precisione. Ciò si nota in particolare in condizioni come l'ischemia, in cui la ipoperfusione limita la quantità di MdC presente nei voxel. Sfruttando l'elevato rapporto S/R offerto dai sistemi a 3,0 T si possono ottenere informazioni utilizzando voxel più piccoli (accentuazione della risoluzione spaziale) ad intervalli di tempo più brevi (incremento della risoluzione temporale). I gradienti rapidi inoltre consentono di usare un TE breve con risoluzione temporale attorno a 1 s, il tempo necessario per seguire il passaggio del bolo di MdC attraverso l'encefalo ed i suoi vasi ematici. Questo non è possibile con apparecchiature da 1,5 T in quanto le immagini sono in genere acquisite a bassa risoluzione spaziale per ottimizzare la velocità di acquisizione, ed anche aumentando il numero delle sezioni è impossibile analizzare l'intero encefalo. Inoltre l'uso frequente nei sistemi a 3,0 T di sequenze T2* pesate con valutazione della presa di contrasto e della perfusione offre alcuni potenziali vantaggi. In particolare, tempi di rilassamento T2 e T2*

più brevi ed un aumentato rapporto S/R possono consentire di ottenere una maggiore caduta di segnale T2* utilizzando la stessa quantità di bolo di MdC nella fase di transito capillare. Pertanto anche la dose di MdC deve essere adattata ai parametri dell'alto campo. A tale proposito, anche se a 1,5 T gli studi strutturali dopo somministrazione di MdC sono solitamente effettuati utilizzando 0,1 mmol/kg di peso corporeo di MdC, nella maggior parte dei casi si usa 0,2 mmol di gadolinio chelato, per gli studi di perfusione DSC. La maggiore sensibilità delle apparecchiature a campo magnetico di 3,0 T per la suscettibilità magnetica significa che lo stesso effetto può essere ottenuto somministrando dosi di MdC paramagnetico molto più piccole di quelle comunemente iniettate utilizzando campi di minore intensità. In particolare, gli effetti di suscettibilità più forti determinano una completa assenza di segnale in occasione del primo passaggio di gadolinio, specialmente nella sostanza grigia, e compromettono l'accuratezza dei calcoli di caduta di segnale nonché la sensibilità ad eventuali deficit di perfusione; la dose può anche essere dimezzata senza compromettere la sensibilità delle curve intensità/tempo dalle quali si ottengono i valori di volume ematico cerebrale relativo (rCBV) e tempo di transito medio (MTT). La dose standard di MdC non è quindi necessaria per studi di perfusione effettuati a 3,0 T, e la dose può essere ulteriormente ridotta somministrando concentrazioni più elevate (1 molare). Come per la diffusione anche lo studio di perfusione ad alto campo è limitato dai problemi causati dagli artefatti da suscettibilità magnetica che aumentano di pari passo con l'aumento del campo magnetico. A 3,0 T infatti la distorsione dell'immagine può essere critica, in particolare se si usano sequenze EPI, come nella maggior parte dei protocolli per gli studi di perfusione DSC. Infatti

L'utilizzo delle sequenze EPI comporta gli svantaggi di un aumento della disomogeneità del B0 e differenze di suscettibilità magnetica a livello delle interfacce aria-tessuto che determinano una caduta di segnale e distorsioni geometriche evidenti maggiormente nella direzione della codifica di fase. La qualità dell'immagine può essere in tal modo gravemente compromessa da distorsioni in corrispondenza delle interfacce tissutali, specialmente in aree anatomiche critiche (come la fossa posteriore e le regioni vicine alla base del cranio: per esempio l'ippocampo e il tronco encefalico) ed in pazienti sottoposti ad intervento neurochirurgico (ad es. in corrispondenza delle interfacce tra tessuti differenti, o a causa di prodotti dell'emorragia chirurgica o di materiale chirurgico dovuti alla craniotomia), con la conseguenza che la valutazione dell'intensità di segnale al momento del passaggio di un bolo di MdC può non essere accurata. Altre conseguenze della suscettibilità magnetica nelle sequenze T2* sono la sovrastima sistematica della perfusione a causa della diversa rilassività del MdC paramagnetico nei vasi di maggiore diametro (dai quali si ottiene la funzione di "input") e nei capillari; problemi nel definire una buona funzione di "input" a causa della bassa risoluzione spaziale nelle sequenze EPI pesate T2*, ed infine problemi nel valutare un'alterata barriera emato-encefalica. Quest'ultimo è un elemento critico nella valutazione della perfusione del letto tumorale cerebrale, dato che la rilassività è diversa quando il MdC è limitato all'ambito di un piccolo compartimento rispetto a quando si distribuisce nello spazio interstiziale. Per minimizzare questi effetti negativi è stato proposto l'uso di particolari sequenze (Fast Field-Echo T1 pesata 3D) o la scelta di un corretto TE.

Importanti vantaggi sono stati recentemente ottenuti con l'uso di sequenze EPI per la perfusione DSC a 3,0 T usando l'imaging parallelo, anche utilizzando un sistema di antenne multi-canale, o usando sequenze Spin Echo EPI, in alternativa alle sequenze Gradient Echo EPI.

ASL

I sistemi di imaging ad alto campo possono consentire una applicazione ideale anche delle tecniche di marcatura degli spin arteriosi (ASL) grazie al rapporto S/R intrinseco (circa due volte quello a 1,5 T), l'uso di immagini pesate in densità protonica, e il T1 più lungo del sangue (1,6–1,8 s rispetto a 1,2–1,4 a 1,5 T); tutto questo migliora la sensibilità per gli spin marcati e diminuisce la sensibilità alle incertezze nel tempo di arrivo arterioso. Ne deriva un migliore rapporto S/R in quanto la marcatura decade più lentamente e, cosa più importante, una minore sensibilità per differenze del tempo di arrivo arterioso in quanto sono consentiti ritardi più lunghi post-marcatura. Tale aumentata sensibilità circa il rapporto S/R può essere sfruttata per ridurre il tempo di scansione (meno di 5 min rispetto agli oltre 15 di un sistema a 1,5 T), per acquisire immagini a più alta risoluzione o per applicare tempi di ritardo post-marcatura più lunghi. Una recente applicazione della ASL è l'imaging del territorio di perfusione regionale al fine di visualizzare il territorio vascolare irrorato da uno specifico vaso marcato. La marcatura selettiva può essere utile nei pazienti con stenosi vascolare elevata od occlusione completa in modo da guidare la scelta fra angioplastica e stenting, per valutare impianti di by-pass cerebrovascolare, o per stimare la probabilità di eventi aterotrombotici od embolici in pazienti con reperto all'imaging pesato in diffusione di molteplici zone a segnale elevato. È importante notare

che in passato l'unico modo per ottenere questa informazione era l'angiografia per cateterismo selettivo, metodo invasivo. Tali dati possono essere utili per ottenere una migliore comprensione delle dinamiche vascolari nei pazienti ad alto rischio di ictus o nei pazienti valutati per procedure chirurgiche correttive.

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 neo-angiogenesi 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.

TECNICA DI STUDIO

Il PWI è stato ottenuto con sequenze echo-planari ad impulso singolo di tipo gradient-echo (spessore 5 mm, gap 1 mm, TR 1700 ms, TE 48 ms, FA 90°, FOV 22, matrice 164×164, NEX 1, n° di fette 12, tempo di acquisizione 1min). Dopo le prime 10 acquisizioni, è stato somministrato un bolo di gadopentetato di dimeglumina (0,07 mmol/kg) con un iniettore automatico (3 ml/s) attraverso un catetere endovenoso di 18–20 gauge, seguito immediatamente dalla somministrazione di 20 ml di soluzione fisiologica. Le immagini ottenute sono state prima visionate per valutare la loro qualità e la eventuale presenza di artefatti da movimento, e poi sono state trasferite su una workstation per l'elaborazione mediante un software dedicato. Il software calcolava, per ogni voxel: le curve di variazione nel tempo dell'intensità di segnale, il tasso di

rilassamento $T2^*$ ($\Delta R2^*$), la linea di base da sottrarre alla curva di $\Delta R2^*$, e infine l'area sottesa alla curva $\Delta R2^*$. Il valore di $\Delta R2^*$ è stato calcolato con la seguente equazione: $\Delta R2^* = -\ln(S_t/S_0)/TE$, dove S_t è l'intensità di segnale al tempo t , S_0 l'intensità di segnale prima del contrasto (escludendo le prime 1–2 immagini acquisite durante il raggiungimento dello stato stazionario del segnale RM) e TE è il tempo di eco. La linea di base è stata ottenuta calcolando la media dell'intensità di segnale prima dell'inizio e dopo il completamento della variazione transitoria dell'intensità di segnale RM. Le mappe di CBV sono state generate attraverso l'integrale numerico del $\Delta R2^*$ al primo passaggio del bolo, in ogni pixel, sulla base dei principi cinetici dei traccianti non diffusibili [6], e il valore di rCBV è stato calcolato con la formula: $rCBV = CBV[\text{tumore}] / CBV[\text{sostanza bianca normale controlaterale}]$. Le ROI sono state tracciate nelle regioni tumorali necrotiche o cistiche, nella massa tumorale apparentemente non necrotica, nei margini tumorali, nelle regioni apparentemente edematose e in quelle apparentemente sane. Le aree nel contesto della massa neoplastica, circondate da un anello irregolare di impregnazione, sono state considerate necrotiche. I margini dei gliomi di alto grado che si impregnavano sono stati delineati nelle immagini T1-pesate con contrasto. Le aree di alterato segnale che circondavano i margini neoplastici impregnati sono state considerate come apparentemente edematose, mentre quelle che non presentavano alterazioni di segnale o impregnazioni patologiche sono state considerate come apparentemente normali (Fig. 3). I dati sono stati analizzati mediante il programma di statistica SPSS (v 12.01, SPSS Inc., Chicago, Illinois). Le variabili sono state esaminate mediante grafici a

scatole e di probabilità normale alla ricerca di dati anormali e non è stata necessaria alcuna trasformazione matematica. Le differenze tra i gruppi sono state valutate utilizzando l'analisi della varianza e il test t di Student post hoc a due code con un livello di significatività di $p < 0,05$, dopo correzione secondo Bonferroni.

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 un 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.

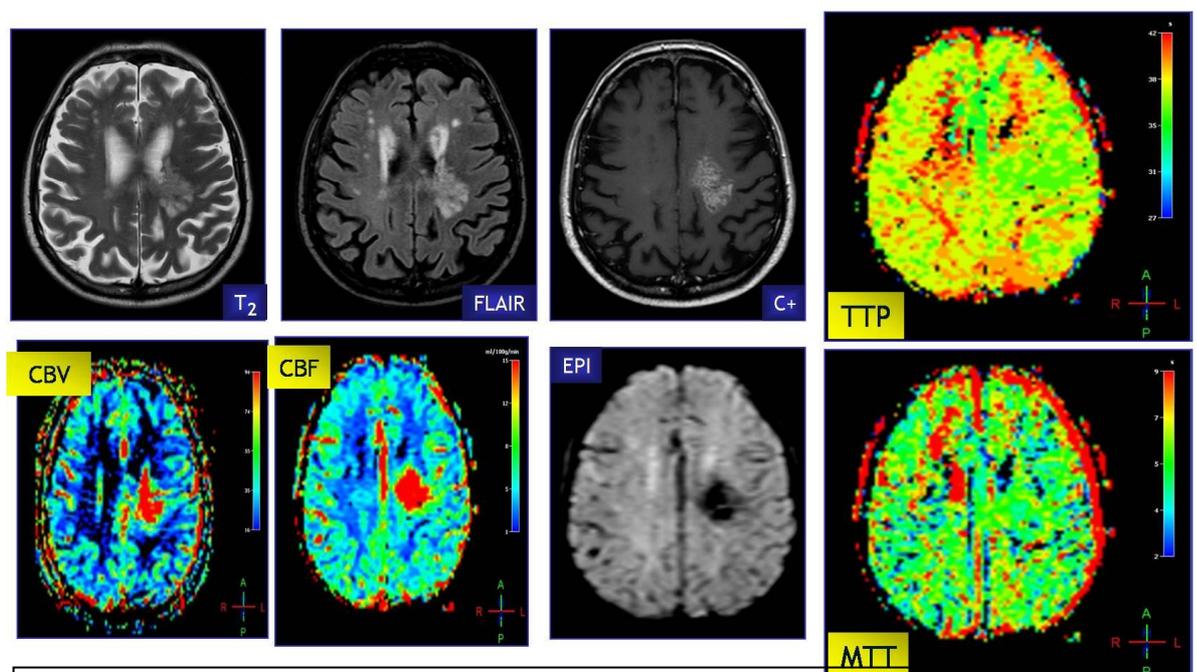


Fig. 3

Immagine assiale. Sequenze T2, FLAIR e T1 dopo post-Gd-DTPA con studio della perfusione e mappe di CBV e CBF, TTP e MTT

Paziente con GBM fronto-parietale sinistro. Il tumore mostra un basso segnale in T2 da elevata cellularità con netta e disomogenea impregnazione dopo gadolinio. Lo studio di perfusione mostra un netto incremento delle mappe di CBV e CBF nella sede della lesione. Non si osservano variazioni del MTT mente risulta lievemente aumentato il TTP.

Esame istopatologico

Tutte le lesioni resecate chirurgicamente o biopsiate 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 immunohistochimiche 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 mm 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 immunohistochimici 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 immunohistochimici.

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 metodiche di Risonanza Magnetica di perfusione. 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 morfologica

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.

Perfusion MR imaging

RISULTATI

Nei gliomi di alto grado, l'rCBV è risultato marcatamente ridotto nelle ROI necrotiche ($\text{media} \pm \text{SD}$, $0,3 \pm 0,3$) e marcatamente aumentato nella massa ($4,3 \pm 1,2$; range, 1,5–6,1) e nei margini ($4,0 \pm 1,1$; range 1,7–6,0) tumorali (fig. 4). Le ROI delineate nelle aree apparentemente edematose sono state suddivise in due gruppi sulla base dell'intensità di segnale nelle immagini T2-pesate: "tumore", con bassa intensità di segnale (approssimativamente isointenso alla sostanza grigia), ed "edema", con una intensità di segnale relativamente alta (quasi isointenso al liquido cerebrospinale). L'rCBV nelle ROI tipo "tumore" è risultato significativamente più alto di quello nelle ROI tipo "edema" ($1,8 \pm 0,5$ vs $0,5 \pm 0,2$; $p < 0,001$); entrambi questi valori medi di rCBV sono risultati significativamente differenti dall'rCBV medio della sostanza bianca normale ($0,1 \pm 0,1$; $p < 0,05$). Nei gliomi di basso grado (Fig. 2), i valori di rCBV di massa ($2,0 \pm 1,5$; 0,5–

4,9) e margini ($2,2 \pm 1,2$; $0,8-4,3$) neoplastici sono risultati significativamente più bassi che nei gliomi di alto grado ($p < 0,001$), mentre l'rCBV nelle aree cistiche ($0,3 \pm 0,2$) è risultato simile a quello nelle aree necrotiche.

Un reperto interessante, non riportato in studi precedenti è l'ulteriore caratterizzazione del tessuto apparentemente edematoso che circonda i gliomi di alto grado. Dal punto di vista istopatologico, le regioni di alterato segnale esterne ai margini impregnati dei gliomi di alto grado rappresentano una combinazione variabile di edema vasogenico e di cellule tumorali infiltranti. In tale studio le aree approssimativamente isointense alla sostanza grigia nelle immagini T2-pesate ("tumore") mostrano alti valori di rCBV, suggerendo un incremento del calibro e/o del numero dei vasi e, quindi, una angiogenesi tumorale. Al contrario, le aree quasi isointense al liquido cerebrospinale ("edema") presentano bassi valori di rCBV, suggerendo una riduzione di densità micro vascolare legata all'aumento di acqua interstiziale. Il rilievo che le aree circostanti le aree di impregnazione delle metastasi, contenenti edema vasogenico puro, presentano valori di rCBV più bassi di quelli delle aree peritumorali dei gliomi di alto grado, caratterizzate oltre che da edema anche da cellule tumorali infiltranti, è di supporto alla nostra ipotesi (fig 4).

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 ($p < 0,001$) (Fig. 5).

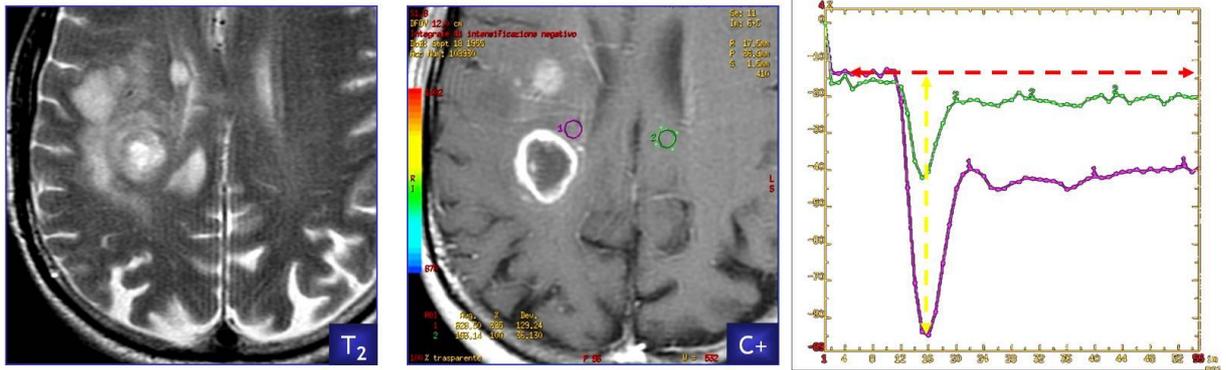


FIG 4
 Paziente con GBM fronto-temporale destro. La mappa mostra anomalità del volume ematico regionale che risulta marcatamente aumentato soprattutto alla periferia della massa tumorale indicante un alto grado di vascolarizzazione periferica e scarsa centrale, per la presenza di necrosi tissutale. Si osserva inoltre un elevato valore di CBV nelle aree periferiche segno di infiltrazione tumorale del tessuto circostante

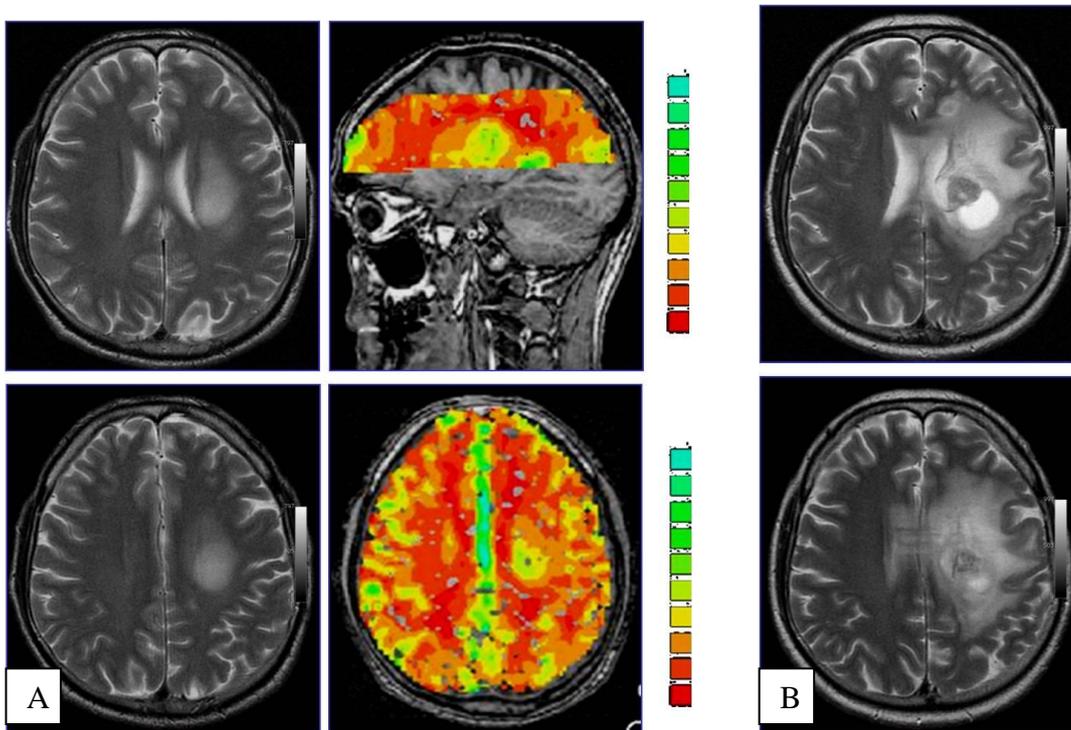


FIG 4 (A-B)
 Paziente con glioma con caratteristiche apparentemente non aggressive nello studio morfologico che presenta tuttavia un elevato valore di CBV (A). Il controllo a distanza di 6 mesi (B) mostra un chiaro viraggio della lesione anche nello studio morfologico con diffusa infiltrazione del corpo calloso ed incremento volumetrico della lesione.

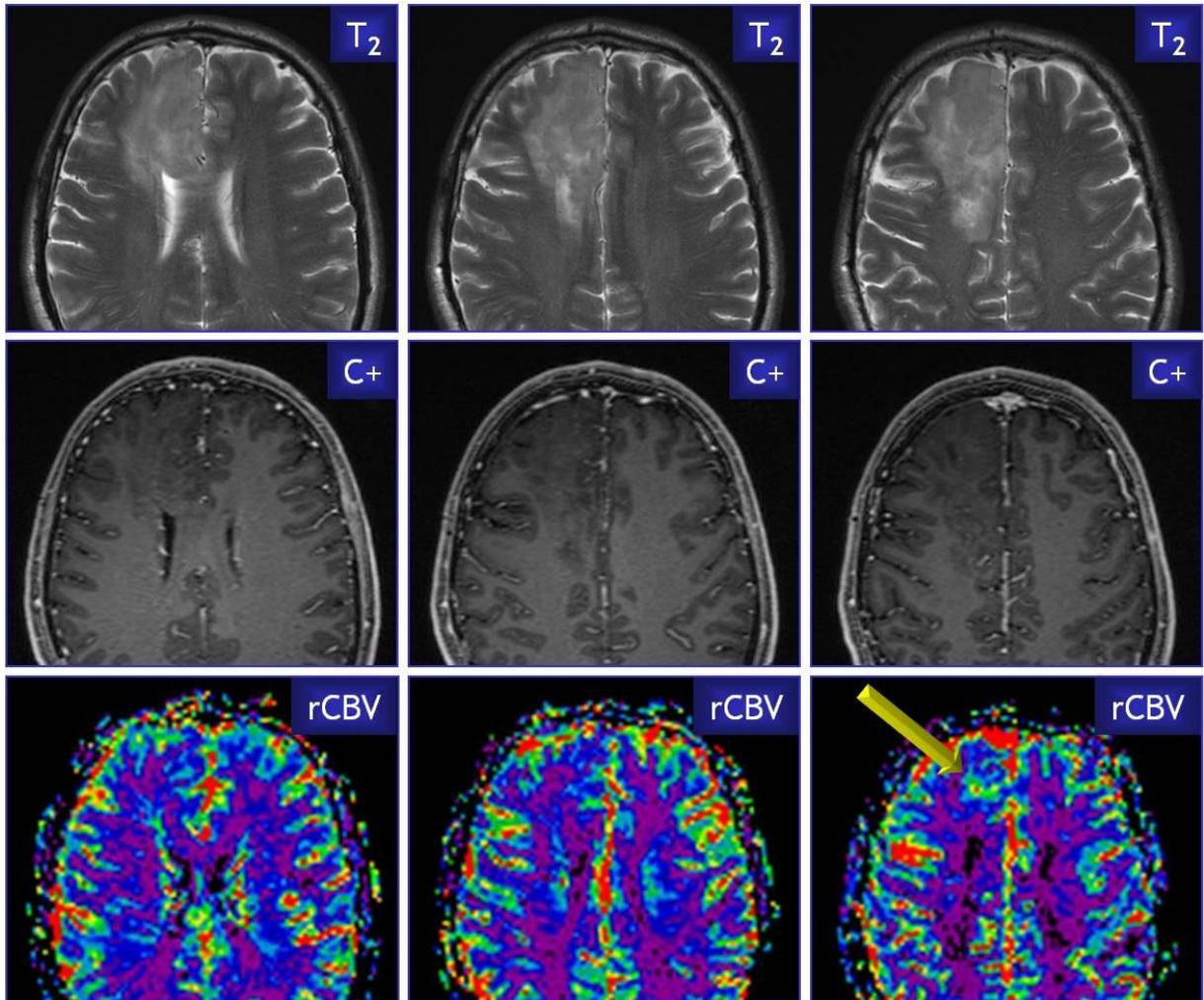


FIG 5

Paziente con glioma di II-III grado frontale destro.

Lo studio morfologico in T2 mostra una diffusa alterazione di segnale estesa dalla corteccia frontale alla sostanza bianca profonda fino al corpo calloso con caratteristiche infiltranti. Dopo la somministrazione di MdC ev non si osservano aree di impregnazione all'interno della lesione. La mappa di perfusione tuttavia documenta un incremento del rCBV e mostra inoltre all'interno della lesione una porzione (freccia) con più elevata CBV segno di viraggio della porzione tumorale interessata.

RADIONECROSI

La terapia radiante può produrre danni acuti o tardivi a carico del tessuto cerebrale irradiato. L'incidenza di tali danni varia in letteratura tra il 5 ed il 24 % in dipendenza della dose, del frazionamento della dose stessa, dell'età del paziente, della durata della sopravvivenza e della eventuale chemioterapia associata. Gli effetti sul cervello possono essere focali o diffusi. La più comune e severa forma di danno indotto dalla terapia radiante è la radionecrosi. Tale entità può essere molto difficilmente differenziata clinicamente e sulla base degli studi morfologici di risonanza magnetica dalla recidiva tumorale. Entrambe tali evenienze possono comparire all'interno dell'area irradiata o nelle sue vicinanze e nella maggior parte dei casi si presentano entro 2 anni dalla terapia. Possono essere difficilmente differenziate allo studio RM morfologico presentandosi entrambe con alterazione della barriera emato-encefalica, effetto massa ed edema; la radionecrosi può inoltre essere irreversibile e progressiva. Tuttavia sebbene la radionecrosi e la recidiva tumorale possono non infrequentemente coesistere, la diagnosi differenziale tra tali entità può cambiare notevolmente l'approccio terapeutico a tali pazienti.

Allo stato attuale l'esame istologico rimane il gold standard e la biopsia o la resezione chirurgica rappresentano la terapia di scelta. Tuttavia la biopsia in particolare può non necessariamente essere rappresentativa dell'intera eterogeneità della lesione ed inoltre le atipie citologiche provocate dalle radiazioni possono creare molte difficoltà interpretative. La PET rappresenta sicuramente la metodica attuale maggiormente utilizzata per differenziare in tali casi i falsi positivi dai falsi negativi.

L'utilizzo delle tecniche di risonanza magnetica funzionale possono offrire informazioni complementari allo studio anatomico-morfologico e proposte come metodiche alternative ad effettuare una diagnosi differenziale tra le due entità. Sebbene la radio necrosi può apparentemente essere indistinguibile dalla recidiva tumorale esse sono due condizioni anatomico-patologiche assolutamente dissimili. Una costante condizione anatomopatologica della radio necrosi è rappresentato dall'esteso danno all'endotelio vascolare e dall'ipossia tissutale in contrasto con il substrato della recidiva tumorale caratterizzata da ipercellularità e neovascolarizzazione. Lo studio di perfusione con risonanza magnetica è una tecnica che riflette l'istologia vascolare e può dimostrare le differenze anatomico-patologiche di tali differenti condizioni (Fig. 6).

I meccanismi postulati che possono contribuire alla neurotossicità indotta dalle radiazioni includono l'insulto vascolare, il danno diretto alla sostanza bianca, effetti di enzimi fibrinolitici, meccanismi immuni così come vasculiti autoimmuni. Studi di fisiopatologia su tessuto cerebrale normale dopo alte dosi di radioterapia mostra che l'insulto agli oligodendrociti ed alle cellule dell'endotelio vascolare contribuisce indipendentemente alla demielinizzazione ed alla necrosi cellulare. Il risultato anatomopatologico del danno vascolare consiste nella necrosi delle pareti vasali, nelle ectasie vascolari e nelle teleangectasie che determinano un incremento della permeabilità con conseguente edema vasogenico. I progressivi cambiamenti vascolari inducono ispessimenti delle pareti vasali con conseguenti trombosi ed infarti che producono necrosi del tessuto irrorato. Gli effetti degli enzimi fibrinolitici possono contribuire all'edema citotossico ed alla necrosi tissutale.

L'estensione e la confluenza di multipli foci periva scolarari in necrosi conduce in larghe "serpiginose" o "geografiche" zone di necrosi tissutale.

Il danno diretto alla sostanza bianca include aree focali o diffuse di demielinizzazione con perdita del oligodendroglio e gliosi astrocitaria associata a ialinizzazione vascolare.

Lo studio morfologico con risonanza magnetica evidenzia un area delimitata da un irregolare impregnazione contrastografica con un minimo effetto massa locale legato alle dimensioni di tale area. Tuttavia, l'edema vasogenico reattivo che spesso accompagna questa condizione, può determinare un improprio effetto massa locale sulle strutture adiacenti. La sostanza bianca è maggiormente sensibile ai fenomeni di radionecrosi con coinvolgimento preferenziale della sostanza bianca periventricolare. Le fibre arcuate sotto corticali sono frequentemente risparmiate, tuttavia occasionalmente tali lesioni possono estendersi alla corteccia adiacente.

In conseguenza di tale atteggiamento di sviluppo la radionecrosi può essere difficilmente differenziata, sulla base del solo studio morfologico dalla recidiva tumorale.

Gli studi di risonanza magnetica di perfusione forniscono in vivo del volume ematico cerebrale relativo (rCBV) che descrive la microvascolarizzazione, consentendo di valutare la neoangiogenesi tumorale, un marker fondamentale della proliferazione neoplastica. Il CBV viene generalmente calcolato posizionando la ROI posizionata rispettivamente sulla sostanza bianca / grigia separatamente. La radionecrosi rivela tipicamente ipoperfusione con diminuzione della rCBV (Fig. (8), mentre le recidive dei tumori ad alto grado presentano alti valori rCBV a livello della sostanza bianca uguali o superiori a quelli della sostanza grigia (Fig. 6) . Come riportato da diversi autori, le

mappe rCBV possono pertanto consentire la corretta differenziazione tra radio necrosi e recidiva del tumore. Tuttavia, in alcuni casi di radio necrosi la porzione di lesione con maggiore impregnazione può associarsi ad un valore superiore di perfusione rispetto della sostanza bianca. Così come una maggiore densità capillare può portare lesioni benigne ad avere un alto rCBV. Valori relativamente elevati di CBV possono essere presenti nel caso siano campionate aree in cui siano presenti dilatazioni aneurismatiche o teleangectasie secondarie alla terapia radiante stessa. Per tali motivazioni lo studio di perfusione va sempre accompagnato da un approfondito studio morfologico che consente una valutazione critica dei valori ottenuti di CBV. Inoltre a causa della bassa risoluzione spaziale, la differenziazione può essere difficoltosa nel caso, non infrequente, siano presenti entrambi i fenomeni con una prevalente componente di radionecrosi il cui basso valore di CBV possa mascherare gli elevati valori della recidiva tumorale.

Gli studi di perfusione 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 ($p < 0.001$).

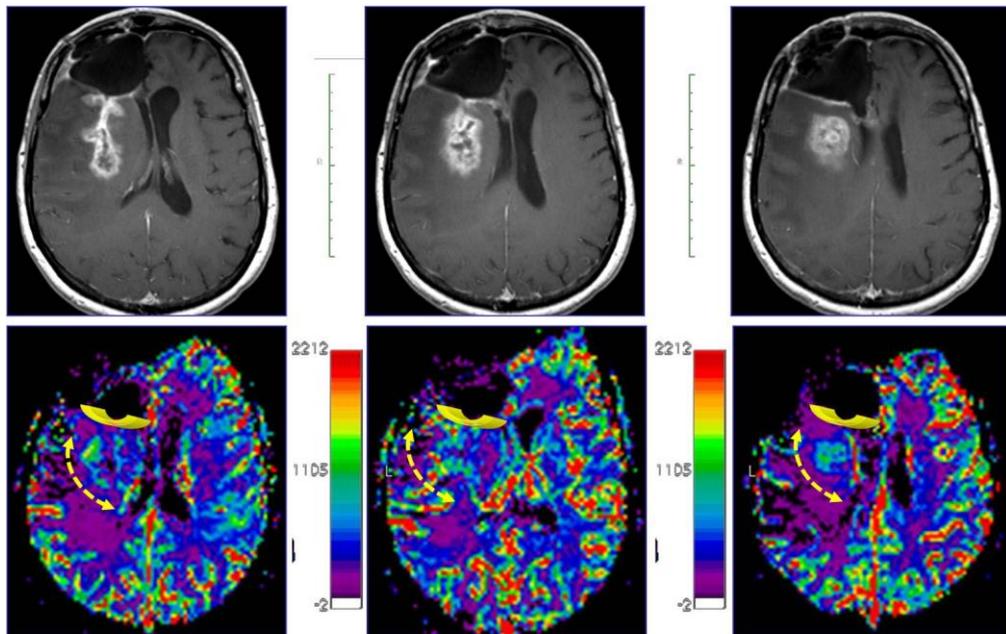


FIG 6

Paziente con glioblastoma frontale precedentemente operato con evidente craniotomia frontale e successivamente irradiato. La mappa di perfusione mostra nell'area di impregnazione posteriormente al vallo chirurgico un'area di elevato valore di rCBV che coincide con l'area di netta impregnazione contrasto grafica, confermando il sospetto posto sull'esame morfologico di residuo tumorale.

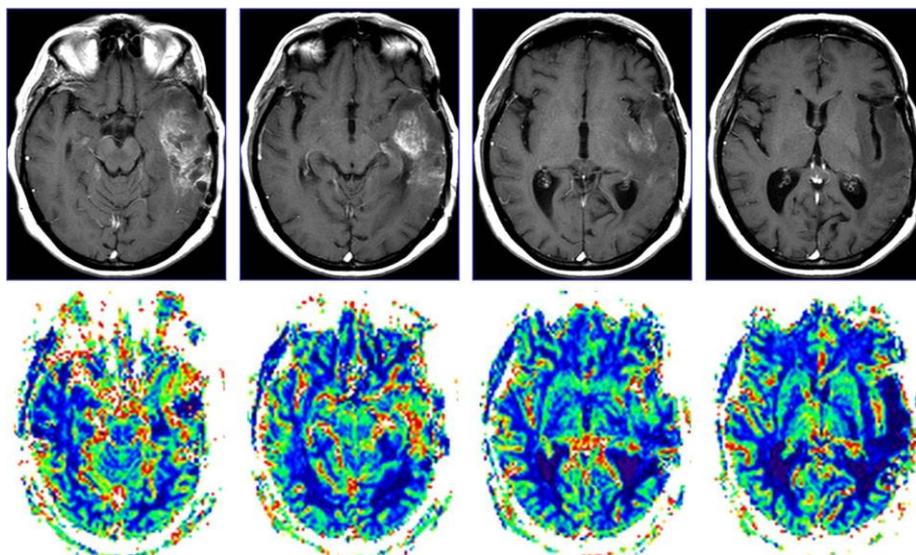


FIG 7

Paziente con glioma anaplastico (III grado) precedentemente trattato chirurgicamente e sottoposto a radioterapia. Lo studio morfologico mostra una intensa e disomogenea impregnazione a sede temporale profonda con piccole aree necrotiche a tale livello ed una sfumata impregnazione a sede temporale posteriore ed insulare sinistra. In tale paziente la mappa di perfusione mostra valori differenti nelle differenti sedi mostrando un valore ridotto o normale a sede temporale profonda e paraippocampale ed un valore decisamente elevato a sede temporale posteriore ed insulare. Tali valori permettono di differenziare una porzione di radio necrosi (basso CBV) dalla recidiva tumorale (elevato CBV) nel contesto della medesima lesione.

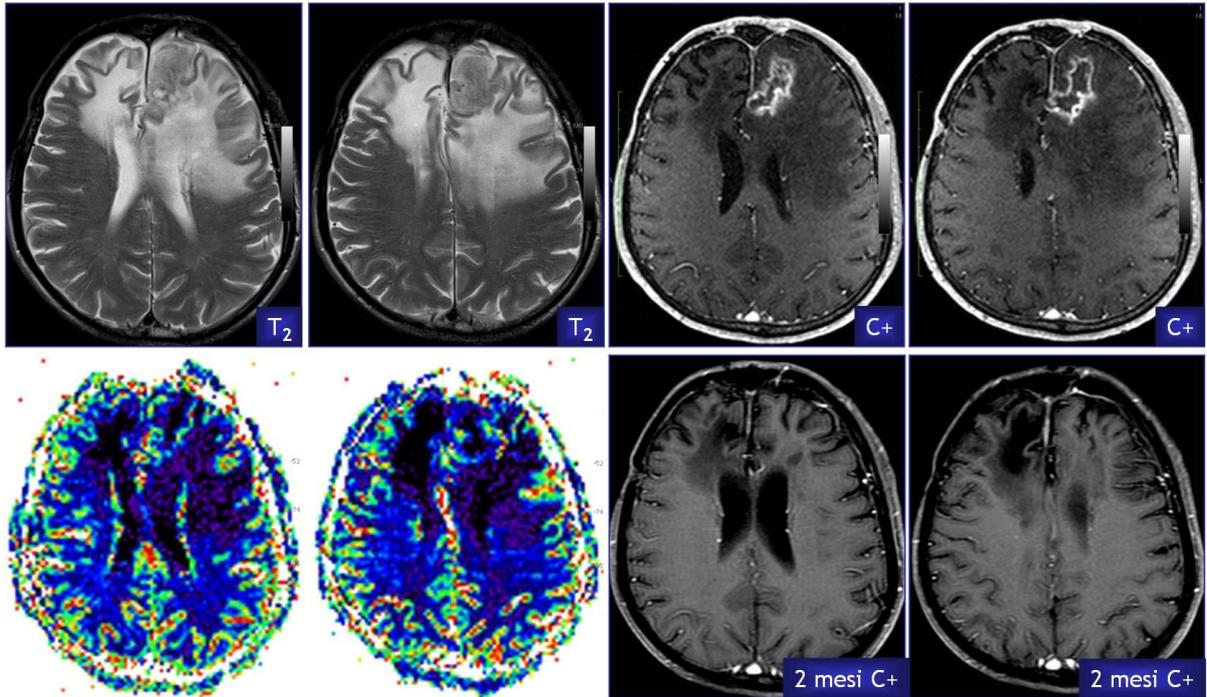


FIG 8

Paziente precedentemente trattato chirurgicamente ed irradiato che mostra nel controllo un'area di basso segnale in T2 in regione frontale parasagittale destra associata a diffusa alterazione della sostanza bianca. Nelle acquisizioni dopo la somministrazione di MdC ev si osserva tale area mostra una impregnazione periferica con riduzione della rCBV nelle mappe di perfusione. Tale alterazione compatibile con radionecrosi viene confermata nel controllo a distanza di 2 mesi dove si osserva la scomparsa di tale cerchia di impregnazione ed una evoluzione malacica di tale area.

Tabella 2 – Risultati.

Diagnosi finale	Perfusion MRI
GBM	15/15
HGG grado III	3/3
Oligo grado III	2/2
LGG	1/1

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

CONCLUSIONI

Gli studi di RM di perfusione 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 ovviare alle procedure neurochirurgiche nei pazienti non candidabili all'intervento, anche al solo scopo biotico con il 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. 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, Sciot 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. Pružincová L, et al. MR imaging of late radiation therapy- and chemotherapy-induced injury: a pictorial essay. **Eur Radiol** 2009
 20. Sorensen AG, Tievsky AL, Ostergaard L, Weisskoff RM, Rosen BR: Contrast agents in functional MR imaging. **J Magn Reson Imaging** 7:47-55, 1997.

21. 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.
22. 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	7
<i>Caratteristiche dei pazienti</i>	7
Metodologia di Studio	8
<i>Risonanza Magnetica morfologica</i>	8
<i>Perfusion MR Imaging</i>	10
<i>Tecnica di studio di perfusione</i>	14
<i>Esame istopatologico</i>	17
<i>Analisi statistica</i>	19
Risultati	19
<i>Studi di Risonanza Magnetica morfologica</i>	20
<i>Perfusion MR imaging</i>	20
<i>Radionecrosi</i>	24
Conclusioni	31
Bibliografia	32
Indice	36