



UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie
in Medicina e Chirurgia

VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA
ALLA TERAPIA CON BEVACIZUMAB
IN PAZIENTI CON RECIDIVA DI GLIOBLASTOMA
MEDIANTE BIOMARKER RADIOLOGICI

Elaborato di Laurea Specialistica

1343
Andrea Sechi



UNIVERSITÀ DI PISA

Corso di Laurea Specialistica in
MEDICINA e CHIRURGIA

VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA
ALLA TERAPIA CON BEVACIZUMAB
IN PAZIENTI CON RECIDIVA DI GLIOBLASTOMA
MEDIANTE BIOMARKER RADIOLOGICI

Candidato:

Andrea Sechi

Relatore:

Dr. Mirco Cosottini

Candidato:

Andrea Sechi

Sessione di Laurea 23 settembre 2014

Anno Accademico 2013-2014

*A mia nonna Minni
che vorrei tanto abbracciare
in un momento
così importante*

Indice

Riassunto della Tesi	3
1 Introduzione	5
1.1 Il glioblastoma	5
1.1.1 Manifestazioni cliniche	5
1.1.2 Classificazione	8
1.1.3 Anatomia patologica	10
1.1.4 Fattori di rischio	11
2 Trattamento	13
2.1 Trattamento di prima linea	13
2.2 Trattamento della recidiva	15
2.3 Nuove frontiere terapeutiche	16
2.3.1 Antiangiogenesi	16
2.3.2 Inibizione delle integrine	18
2.3.3 Inibizione dei recettori di fattori di crescita e della tra- sduzione del segnale	18
2.3.4 Epigenetica	20
2.3.5 Immunoterapia	20
2.3.6 Campi elettrici alternati	21
2.4 Impiego del Bevacizumab nel glioblastoma	22
2.4.1 Effetti avversi	23
3 Diagnostica	24
3.1 Diagnostica convenzionale: risonanza magnetica	24
3.1.1 Riconoscimento della lesione	26
3.1.2 Identificazione della sede	26
3.1.3 Valutazione dei segni di massa	26
3.1.4 Caratterizzazione macroscopica della lesione	26
3.1.5 Caratterizzazione microscopica della lesione	27
3.1.6 Valutazione dell' impregnazione contrastografica	28

3.1.7	Modificazioni peritumorali o reattive	29
3.2	Diagnostica non convenzionale	29
3.2.1	Tecnica DWI	29
3.2.2	Tecnica PWI	33
3.3	Potenzialità dell'imaging nella valutazione della risposta alla terapia	41
4	Parte sperimentale	43
4.1	Scopo	43
4.2	Materiali e metodi	43
4.2.1	Criteri di selezione dei pazienti	43
4.2.2	Protocollo di acquisizione RM	44
4.2.3	Elaborazione ed analisi delle immagini: analisi radiolo- gica quantitativa	48
4.2.4	Analisi Statistica	50
4.3	Risultati	51
4.3.1	Analisi Qualitativa	51
4.3.2	Risultativi Quantitativi	56
4.4	Discussione	66
4.4.1	Valutazione quantitativa dei risultati delle tecniche di imaging non convenzionali	67
4.5	Conclusioni	71
5	Elenco delle abbreviazioni	72
	Bibliografia	74

Riassunto della Tesi

Introduzione: il bevacizumab, un anticorpo monoclonale che riconosce il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), si sta affermando come nuovo farmaco nella cura delle recidive di glioblastoma multiforme (GBM). A fronte dell'insorgenza di numerosi effetti collaterali e di una importante spesa economica, solo parte dei pazienti trattati sembra trarne beneficio, soprattutto in termini di qualità di vita e di sopravvivenza libera da malattia. È dunque di estrema importanza riuscire a poter discriminare i pazienti che potranno giovare maggiormente di questa terapia, sviluppando i minori effetti collaterali.

Scopo: l'obiettivo di questo studio è quello di studiare, utilizzando tecniche di Risonanza Magnetica (RM) convenzionale e non convenzionale dei criteri di predicibilità della risposta che possano orientare il clinico nella scelta del trattamento con bevacizumab.

Metodi: Sono stati selezionati retrospettivamente 24 pazienti con diagnosi istologica di glioblastoma e con recidiva di malattia dopo un trattamento combinato radiochemioterapico con temozolomide. Tutti i pazienti valutati sono stati sottoposti a esame RM convenzionale e non convenzionale al momento della recidiva e successivamente dopo l'inizio di terapia con bevacizumab. Sulla base della RM convenzionale, è stato espresso un giudizio neuroradiologico relativo alla lesione neoplastica, unitamente a una valutazione del quadro radiologico generale. Le tecniche non convenzionali utilizzate sono state la Diffusion Weighted Imaging (DWI) e la Perfusion Weighted Imaging (PWI), quest'ultima eseguita solo in 14 Pazienti. Il relative Cerebral Blood Volume (rCBV) e i valori di Apparent Diffusion Coefficient (ADC) sono stati misurati a livello delle regioni rispettivamente di massima perfusione e diffusività delle lesioni al tempo della recidiva; le misurazioni effettuate nelle RM successive sono state effettuate nella stessa regione esaminata in precedenza. Risultati: L'ADC misurato all'esame RM antecedente l'inizio della terapia di seconda linea (Tempo 0, T_0), e la variazione percentuale dell'ADC nell'intervallo intercorso tra il T_0 e il primo esame di follow-up dopo l'inizio della terapia con bevacizumab (Tempo 1, T_1), sono risultati utili biomarker in grado di stratificare i pazienti sulla base della sopravvivenza globale (Overall

Survival, OS), calcolata dal momento della recidiva. Allo stesso modo anche il rCBV al T1e la sua variazione percentuale tra T_0 e T1 si sono rivelati parametri predittivi di OS. La maggiore accuratezza diagnostica si è riscontrata combinando le variazioni percentuali dell'ADC e rCBV che, se concordi, consentono di predire la risposta alla terapia con bevacizumab nel 100% dei casi in esame.

Conclusioni: Le tecniche di RM non convenzionale PWI e DWI si sono dimostrate efficaci nel formulare un giudizio prognostico e nel predire la risposta in pazienti con recidiva di GBM trattati con bevacizumab.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Il glioblastoma

Il glioblastoma è il tumore maligno più comune tra le neoplasie della glia e risulta essere uno tra i più temuti tipi di neoplasia, non solo per la sua prognosi invariabilmente infausta ma anche per le ripercussioni dirette sulla qualità della vita e funzioni cognitive. Studi di prevalenza dimostrano come ben 138.054 pazienti negli Stati Uniti abbiano avuto diagnosi di tumore cerebrale maligno primitivo nel 2010, di cui i gliomi di alto grado rappresentano il sottotipo più comune (80%), con incidenza annuale pari a 5,26 per 100.000 abitanti[1]. Dal punto di vista prognostico i pazienti con una diagnosi di glioblastoma possono essere divisi in due gruppi: il glioblastoma primario, che insorge ex novo senza alcuna evidenza di precedente neoplasia, e il glioblastoma secondario, che si sviluppa dall'evoluzione di un glioma di basso grado quale ad esempio l'astrocitoma diffuso.

1.1.1 Manifestazioni cliniche

Prima dell'introduzione delle moderne tecniche di imaging, i gliomi presentavano grandi difficoltà di diagnosi in quanto i loro sintomi iniziali sono alquanto aspecifici e di non univoca interpretazione. I deficit neurologici focali compaiono tardivamente nella storia di questa neoplasia, spesso senza permettere una valutazione accurata della localizzazione. Le principali manifestazioni cliniche dei gliomi sono:

- Modificazioni del comportamento e delle funzioni mentali
- Cefalea
- Vomito e vertigini

- Crisi epilettiche
- Sintomi e segni neurologici focali

Modificazioni del comportamento e delle funzioni mentali: i sintomi iniziali possono essere estremamente sfumati e caratterizzati da quella che MacCabe[2] definisce “astenia mentale” e Adams[3] rinomina “astenia psicomotoria”: eccessiva irritabilità, labilità emotiva, minor propensione a svolgere le attività quotidiane, tendenza a dimenticare, riduzione dell’attività mentale, indifferenza verso la vita sociale e mancanza di iniziativa. In alcuni pazienti possono essere evidenti anche sonnolenza e apatia, rallentamento di pensiero e del tempo di reazione. Tutti questi sintomi spesso sono attribuiti erroneamente ad uno stato ansioso o ad una sindrome depressiva, soprattutto nel paziente anziano. L’esordio del corteo sintomatologico può essere rapido o più spesso graduale, nell’arco di poche settimane o mesi, questi sintomi divengono più evidenti e, se non viene instaurato alcun trattamento, l’apatia e la sonnolenza aumentano progressivamente fino a quando si può verificare un aumento della pressione intracranica che porta il paziente in uno stato di stupor o coma. I tumori che determinano questo tipo di sintomi interessano frequentemente strutture centrali, alterando per esempio i meccanismi talamo-corticali alla base di attenzione e allerta oppure interessano le lunghe fibre di associazione della sostanza bianca provenienti dai lobi frontali o temporali.

Cefalea: rappresenta un sintomo precoce ed è presente nel 50% dei pazienti alla diagnosi. In alcuni pazienti si tratta di un dolore lieve con cadenze episodiche, in altri invece di un dolore severo e acuto. Gli elementi che caratterizzano questa cefalea sono la presentazione tipicamente notturna, la comparsa al risveglio e la qualità del dolore non pulsante e profondo insieme con la monolateralità e l’evoluzione verso il progressivo peggioramento. In realtà questi non sono caratteri patognomonici, in quanto anche l’emicrania o la cefalea ipertensiva possono presentarsi al risveglio o nelle prime ore del mattino, con la differenza che se all’acme del dolore cefalalgico compare il vomito, ciò è fortemente indicativo di tumore cerebrale. Il meccanismo fisiopatologico di questa cefalea non è ancora stato completamente spiegato. Nella maggior parte dei casi, durante le prime settimane dalla presentazione della cefalea, la pressione intracranica è normale e il dolore può essere attribuito al locale rigonfiamento dei tessuti e alla dislocazione dei vasi sanguigni all’interno o attorno al tumore. Successivamente, invece, il dolore appare correlato all’incremento della pressione endocranica. Solitamente tumori con sede sopratentoriale provocano cefalea localizzata al lato della lesione in regione orbito frontale, temporale o parietale, mentre i tumori della fossa posteriore provocano cefalea ipsilaterale in sede retro auricolare o occipitale.

Caratteristiche della cefalea da tumore cerebrale rispetto a una cefalea benigna	
Cefalea da eteroplasia cerebrale	Cefalea benigna
<ul style="list-style-type: none"> • Insorgenza acuta o recente con esordio dopo i 50 anni • Intensità e frequenza crescenti • Iniziale risposta ad analgesici, successiva progressione a cefalea intrattabile • Risveglio dal sonno anche se intensità moderata • Dolore unilaterale, concordante con la localizzazione del tumore • Sintomi neurologici focali di accompagnamento (emiparesi, perdita del sensorio) • Sintomi cognitivi e comportamentali di accompagnamento, spesso scambiati per demenza • Nausea e vomito, indistinguibili dall'emicrania • Papilledema suggestivo di ipertensione endocranica 	<ul style="list-style-type: none"> • Insorgenza cronica riscontrabile all'anamnesi da molteplici anni • Intensità e frequenza variabili; stimoli trigger. • Risposta alla terapia medica • Risveglio dal sonno quando di severa intensità • Dolore unilaterale, non sempre localizzato nello stesso emilato degli episodi precedenti • Sintomi neurologici presenti nell'emicrania, che insorgono nell'arco di pochi minuti per regredire completamente in meno di un'ora • Nausea e vomito

Tabella 1 Caratteristiche della cefalea che entrano in diagnosi differenziale nella determinazione eziologica da tumore cerebrale o da altre cause di natura benigna[4].

Vomito e vertigini: il vomito compare in un numero relativamente esiguo di pazienti con glioblastoma e solitamente accompagna la cefalea quando questa si manifesta con particolare intensità. Si tratta di un vomito non correlato all'ingestione di cibo che in genere si manifesta improvvisamente e non preceduto da nausea (vomito a getto), anche se in alcuni pazienti la nausea può essere presente accompagnata da un forte senso di malessere. Ricordiamo che il vomito si riscontra più frequentemente nei tumori della fossa posteriore. Non infrequentemente, i pazienti riferiscono inoltre senso di vertigine. Si tratta di un sintomo che il paziente solitamente non riesce a descrivere con accuratezza ma che viene definito come una sensazione innaturale e strana associata a instabilità al momento del cambiamento posizionale della testa. Una vera vertigine posizionale può invece essere sintomo di un tumore localizzato in fossa posteriore.

Crisi epilettiche: la comparsa di crisi epilettiche più spesso focali o generalizzate costituisce una delle più frequenti manifestazioni del glioblastoma, dopo le alterazioni mentali e i segni focali di danno cerebrale. Le convulsioni sono state osservate, infatti, dal 20% al 40% dei pazienti con tumori cerebrali e la prima manifestazione di crisi epilettica presentatasi in età adulta è sempre suggestiva di tumore cerebrale. Le crisi possono essere indotte dalla stimolazione di circuiti eccitatori o dall'interferenza del tessuto patologico con i meccanismi inibitori. Solitamente si tratta di crisi parziali che possono

successivamente generalizzare; ci può essere un singolo episodio o numerose crisi che possono seguire gli altri sintomi o precederli di settimane o mesi o addirittura di alcuni anni[4]. Lo stato di male epilettico come evento precoce è estremamente raro.

Sintomi e segni focali: I segni focali riflettono la localizzazione del tumore e derivano dalla compressione della sostanza grigia e dei fasci di sostanza bianca da parte del tumore in espansione e dell'eventuale edema associato. Alcuni pazienti possono presentare tali segni all'esordio della malattia ma nella maggior parte dei casi rappresentano una manifestazione della fase più avanzata[4].

1.1.2 Classificazione

Il sistema di classificazione dei tumori del Sistema Nervoso Centrale più utilizzato è sicuramente quello proposto dalla WHO (World Health Organization), che offre il vantaggio di raggruppare le multiple neoplasie sulla base del profilo istologico e di differenziarne la malignità attraverso un sistema di grading che tiene conto delle seguenti caratteristiche:

1. Atipia nucleare e citoplasmatica
2. Presenza di mitosi
3. Proliferazione endoteliale (neoangiogenesi tumorale)
4. Necrosi

La proliferazione endoteliale e la necrosi sono solitamente considerate come indicatori importanti del potenziale di crescita rapida e di invasione del tessuto sano circostante, mentre l'attività mitotica fornisce importanti indicazioni sul decorso e sull'evoluzione. Questa caratteristica viene valutata quantitativamente attraverso due metodiche: una è l'assorbimento della bromodesossitridina, sostanza che, dopo essere stata somministrata per via endovenosa prima dell'intervento chirurgico, viene assorbita dai nuclei delle cellule tumorali e dà una stima della sintesi di DNA; l'altra tecnica è la marcatura immunohistochimica mediante un anticorpo monoclonale detto Ki-67 che riconosce una proteina istonica espressa dalle cellule proliferanti ma non da quelle in stato quiescente[5]. Quindi si distinguono:

Grado I lesioni caratterizzate da basso potenziale proliferativo e dalla possibilità di completa guarigione solo in seguito a resezione chirurgica.

Grado II lesioni caratterizzate da natura di tipo infiltrativo e che, nonostante la bassa attività proliferativa, tendono a recidivare. Alcuni tipi di tumori di grado II, come l'astrocitoma diffuso e l'oligodendroglioma, tendono

a progredire verso più alti gradi di malignità, rispettivamente nell'astrocitoma anaplastico e nell'oligodendroglioma anaplastico.

Grado III lesioni caratterizzate da evidenza istologica di malignità, quale atipia nucleare ed elevata attività mitotica.

Grado IV lesioni con notevole malignità istologica tipicamente associate a una forte componente di neoangiogenesi tumorale che esitano in una rapida evoluzione di malattia sia pre che postoperatoria[2].

In letteratura, inoltre, si usa la dicitura “glioma di basso grado” (low-grade glioma), ad indicare i tumori gliali di grado WHO I e II, mentre si usa “glioma di alto grado” (high-grade glioma) ad indicare tumori di grado III e IV.

Astrocitomi	
Astrocitoma subependimale a cellule giganti	(WHO grade I)
Astrocitoma pilocitico	(WHO grade I)
Astrocitoma pilomixoide	(WHO grade II)
Xantoastrocitoma pleomorfo	(WHO grade II)
Astrocitoma diffuso	(WHO grade II)
Oligodendroglioma	(WHO grade II)
Oligoastrocitoma	(WHO grade II)
Ependimomi	
Subependimoma	(WHO grade I)
Ependimoma mixopapillare	(WHO grade I)
Ependimoma	(WHO grade II)

Tabella 2 Classificazione WHO dei Gliomi di basso grado[6].

Astrocitomi	
Astrocitoma anaplastico	(WHO grade III)
Gliomatosis cerebri	(WHO grade III)
Glioblastoma	(WHO grade IV)
Oligodendroglioma	(WHO grade II)
Oligodendroglioma anaplastico	(WHO grade III)
Ependimoma anaplastico	(WHO grade III)

Tabella 3 Classificazione WHO dei Gliomi di alto grado[6].

La classificazione in base al grado di malignità è uno strumento ampiamente utilizzato che ci consente di predire, almeno in parte, il comportamento biologico della neoplasia. Il grado WHO, infatti, fa parte dei fattori prognostici per i tumori cerebrali. Altri fattori prognostici sono l'età del paziente, la disabilità neurologica, la sede del tumore, caratteri radiologici come il contrast enhancement, l'estensione della resezione chirurgica, l'indice di proliferazione, le alterazioni genetiche ed epigenetiche. Per ogni tumore l'entità e la combinazione di questi parametri contribuisce a stimare la prognosi[7].

1.1.3 Anatomia patologica

Glioblastoma multiforme (WHO grade IV): Il Glioblastoma è certamente la forma più frequente di tumore maligno del sistema nervoso centrale, rappresenta circa il 20-25% di tutte le neoplasie primitive e raggruppa in sé l'82% dei casi di gliomi maligni. La prima definizione di questa neoplasia risale a Cushing e Bailey[8] nel 1926, per rimarcare da un lato l'ipotesi di derivazione da un ipotetico elemento primitivo (glioblasto) e dall'altro l'aspetto macroscopico pleomorfo ed eterogeneo del tumore, che si esplicitava nel termine "multiforme", ormai caduto in disuso nella pratica clinica. Possiamo distinguere due tipi di glioblastoma con morfologia identica ma con differente modalità di comparsa: il glioblastoma primario è quello che compare prevalentemente nella fascia di età compresa tra la quinta e la settima decade; il glioblastoma secondario invece rappresenta l'evoluzione di un astrocitoma a minor grado di malignità e interessa pazienti intorno ai 40 anni. Il glioblastoma dell'adulto si localizza prevalentemente a livello degli emisferi cerebrali; le regioni più frequentemente interessate in ordine decrescente sono il lobo temporale, parietale, frontale e occipitale. I glioblastomi dell'età pediatrica hanno un'incidenza minore e si riscontrano prevalentemente a livello sottotentoriale. Spesso vengono riscontrati nel contesto di una neurofibromatosi o dopo trattamenti radio-chemioterapici. Il glioblastoma tende a infiltrare rapidamente il parenchima e le strutture circostanti: invade frequentemente l'emisfero controlaterale attraverso il corpo calloso e può invadere anche lo spazio subaracnoideo. Sono rare le localizzazioni al di fuori del sistema nervoso centrale. Macroscopicamente si presenta come una lesione di grosse dimensioni, scarsamente definita, che alla sezione di taglio appare caratterizzata da aree grigiastre di necrosi, soprattutto centrale, che si accompagnano ad aree emorragiche brunastre o rossastre; le strutture vascolari intra e paratumorali sono usualmente abbondanti ed ectasiche ed il rigonfiamento cerebrale è notevole per l'edema. Istologicamente l'aspetto è quello di un grado IV con ipercellularità spiccata, atipie cellulari e nucleari molto marcate, presenza di cellule neoplastiche giganti plurinucleate, mitosi numerose, vistosa neoangiogenesi, aree di necrosi intorno alle quali le cellule si dispongono a formare uno strato

in cui sono orientate più o meno parallelamente fra loro (pseudopalizzata). La WHO distingue due varianti istologiche del glioblastoma:

- Il *glioblastoma a cellule giganti* così denominato per la predominanza di cellule bizzarre, gigantesche (fino a $400\mu m$ di diametro) e multinucleate (anche più di 20 nuclei). Esso rappresenta oltre il 95% dei glioblastomi
- Il *gliosarcoma* caratterizzato da una struttura tessutale bifasica, con aree che mostrano alternativamente differenziazione gliale e mesenchimale. Esso rappresenta il 2% di tutti i glioblastomi[9].

Prognosi: la prognosi del glioblastoma è pessima; la sopravvivenza a un anno è pari al 35%, a 5 anni è del 4,7%[9].

1.1.4 Fattori di rischio

I gliomi maligni originano da un processo a più stadi che si sviluppa a partire da alterazioni genetiche sequenziali e cumulative dovute a una sinergia tra fattori di rischio intrinseci e ambientali. Numerose ricerche mirate allo studio della predisposizione genetica nello sviluppo delle neoplasie cerebrali sono state condotte negli ultimi anni e hanno contribuito a una conoscenza molecolare dei geni mutageni dettagliata ma che rimane ad oggi estremamente complessa data l'eterogeneità genotipica del glioblastoma. Un discreto numero di sindromi quali la sclerosi tuberosa, la Neurofibromatosi tipo 1 e tipo 2 e non in ultimo la sindrome di Cowden, Turcot e Li-Fraumeni sembrano associate con un aumentato rischio di sviluppare un glioma di alto grado[10]. Una storia familiare di glioblastoma si riscontra molto raramente, ma quando presente si associa a un incremento raddoppiato del rischio relativo di sviluppare la neoplasia. Da studi epidemiologici e statistici è emerso che l'incidenza di glioblastoma è significativamente maggiore negli uomini rispetto alle donne, nell'etnia caucasica rispetto alla razza nera, ed è inversamente correlata alla presenza di patologie atopiche quali l'eczema, l'asma e la rinite allergica[11]. Anche nei casi in cui è stata accertata la familiarità non si sono riscontrati vantaggi da programmi di screening in termini di sopravvivenza. La diagnosi precoce non si associa con un miglioramento dell'aspettativa di vita come accade in altre neoplasie. Un fattore di rischio ambientale del glioblastoma è costituito dalle radiazioni ionizzanti, sebbene i risultati di questi studi siano tuttora incerti e di non univoca interpretazione. Tra le poche associazioni dimostrate vi sono quelle riguardanti bambini esposti a irradiazione cranica per Tinea Capitis o per terapia anti-neoplastica. Studi sugli individui esposti agli effetti nucleari di bombe atomiche o a test di sperimentazione di armi nucleari[12]. Studi sull'esposizione a radiazioni in ambito medico utilizzate a fini diagnostici quali la TC (Tomografia Computerizzata) non hanno avuto

un correlazione positiva, tranne in un sottogruppo di pazienti di età infantile sottoposti a TC cranio, dove si è riscontrato un eccesso di rischio pari a 1/10.000 ad un follow-up di 10 anni[13]. A differenza da quanto postulato in passato l'associazione tra tumori cerebrali e l'uso di cellulari, fattori di rischio occupazionali, traumi cranici, pesticidi, cibi contenenti N-nitroso composti non è risultata essere consistente. Una ulteriore riprova è data dall'evidenza che l'incidenza dei gliomi non ha subito alcuna modificazione dall'introduzione sul mercato di dispositivi di telefonia elettronica, che pur esercitando un effetto biologico ben noto a livello cerebrale, con aumento del flusso ematico[14] e incremento del metabolismo del glucosio[15] non esita in lesioni neoplastiche[16]. Da un punto di vista molecolare sono state individuate quattro sottoclassi sulla base di caratteristiche derivanti da diversi tipi cellulari che sembrano ripercorrere i diversi stadi della neurogenesi: classico, mesenchimale, proneurale, neurale[17].

- La sottoclasse classica presenta amplificazioni del cromosoma 7, delezioni del cromosoma 10, amplificazioni e mutazioni di EGFR e delezioni del locus Ink4a/ARF;
- La sottoclasse mesenchimale mostra frequentemente mutazioni/delezioni del gene NF1 e una iperespressione di CHI3L1 e MET e di geni coinvolti nella cascata di trasduzione del segnale del TNF e di NFκB;
- La sottoclasse pro-neurale è caratterizzata da un pattern di alterazioni coinvolgenti il PDGFRA, con mutazioni in IDH1 e TP53, che si riscontra ugualmente nei gliomi di basso grado, suggerendone una possibile evoluzione in glioblastomi secondari;
- La sottoclasse neurale è contraddistinta per l'espressione di marker neurali.

Un'ulteriore riprova dell'eterogeneità molecolare e della complessità del sistema è stata la scoperta di un pattern molecolare misto, dove sono presenti mutazioni che caratterizzano più classi, ed un pattern più raro caratterizzato da mutazioni anomale di geni insolitamente coinvolti. L'importanza di questa distinzione molecolare risiede nella diversa potenzialità evolutiva in termini di anaplasia, progressione e prognosi associate a ciascuna sottoclasse[18].

Capitolo 2

Trattamento

Il trattamento standard del glioblastoma si basa su un approccio multidisciplinare costituito in prima istanza da una chirurgia a cui fa seguito un trattamento combinato di radioterapia (RT) e chemioterapia. L'exeresi della massa neoplastica non solo garantisce la conferma istologica del tumore, ma consente la rimozione dell'effetto massa dal tumore stesso. L'imaging guida il neurochirurgo nella sua opera di resezione, ma molteplici ostacoli possono impedire un'escissione completa: è infatti difficile delineare alla RM quali siano i reali margini del tumore, che spesso si estendono ben oltre l'area captante il mezzo di contrasto; inoltre la vicinanza o la contiguità con aree eloquenti encefaliche potrebbe prevenire la rimozione del tessuto eteroplastico circostante e quindi la radicalità chirurgica. Un importante studio condotto in campo neurochirurgico suggerisce che un volume residuo di neoplasia $< 5mm^3$ unitamente a una percentuale di resezione tumorale $> 70\%$ si associno a un incremento della sopravvivenza globale e a una dilazione del momento di ricorrenza[19].

2.1 Trattamento di prima linea

Dal 2005 il trattamento post-operatorio standard prevede l'utilizzo della radioterapia e della chemioterapia concomitante con temozolomide (TMZ), un agente alchilante citotossico somministrato oralmente su base giornaliera alla dose di $75 mg/m^2$ per 42-49giorni continuativi, 1 ora prima della seduta di radioterapia. Un mese dopo il termine del trattamento combinato si effettua una RM di controllo e, se non vi è evidenza di ripresa di malattia, si riprendono successivi cicli di mantenimento con temozolomide alla dose di $150/200 mg/m^2$ quotidianamente per 5 giorni ogni 28 eseguendo una RM ogni 3 cicli per il controllo (figura 2.1). Il contributo della chemioterapia con temozolomide rispetto alla sola radioterapia ha incrementato l'Overall Survi-

val medio da 12,1 a 14,6 mesi[20] , seppure nel sottogruppo di pazienti con metilazione del promoter del gene 06-Metil-Guanina-DNA-Metil-Transferasi (MGMT) il vantaggio in termini di risposta e sopravvivenza sia ben maggiore della media dei casi[21]. MGMT codifica infatti per una proteina coinvolta nella riparazione del danno indotto da agenti alchilanti, con conseguente diminuzione dell'effetto citotossico del chemioterapico. La metilazione del promoter riduce l'espressione del gene e dunque esita in una limitata attività riparativa della proteina, con maggiore risposta all'effetto del farmaco.

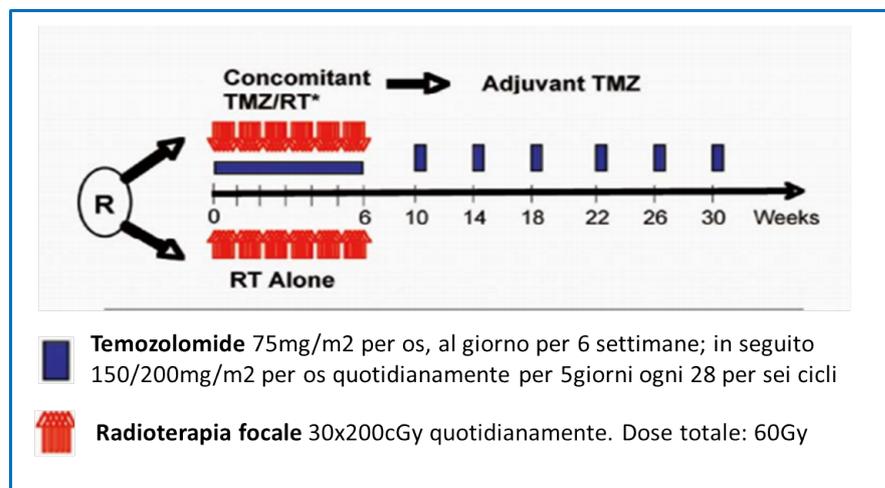


Figura 2.1: Regime di trattamento standard per glioblastoma, che prevede una combinazione di radioterapia (RT) con temozolomide (TMZ). * È richiesta la profilassi contro *Pneumocystis Jirovecii* nella fase di trattamento concomitante[22].

Nel caso di pazienti anziani la prognosi è ancora più severa e ciò ha comportato non solo la loro esclusione da numerosi trial sperimentali di nuovi farmaci, ma anche la necessità di delineare un regime terapeutico che fosse maggiormente adatto a questo sottogruppo di pazienti, spesso troppo fragili per poter sopportare il trattamento radio-chemioterapico standard. Il beneficio della radioterapia rispetto alle cure palliative è stato comunque confermato da un importante studio prospettico, che ha evidenziato un incremento dell'OS da 3,9 a 6,9 mesi unitamente a un miglioramento della qualità di vita[23]. Con l'intento di evitare per quanto possibile la tossicità indotta dalle radiazioni e aumentare la compliance di pazienti più vulnerabili, non candidabili al regime terapeutico standard, sono stati condotti studi di fase III che dimostrano come la TMZ isolata sia fortemente indicata in pazienti con metilazione del gene MGMT[24], viceversa un trattamento radioterapico ipofrazionato della durata di tre settimane è oggetto di indagine di uno studio prospettico

che è attualmente in corso (clinicaltrials.gov: NCT00482677). D'altra parte ci sono evidenze di come in pazienti con scarsa prognosi e MGMT non metilato, nessun trattamento chemioterapico, radioterapico, radioterapico con ipofrazionamento garantisca una maggiore efficacia in termini di sopravvivenza rispetto all'altro[25]. In aggiunta alla temozolomide la FDA (Food and Drug Administration) ha approvato come trattamento di prima linea un composto costituito da polimeri biodegradabili contenenti carmustina, impiantabile nel sito di lesione subito dopo l'escissione chirurgica. Uno studio di fase III ha confermato un modesto incremento della sopravvivenza[26], ma le frequenti tossicità e effetti avversi quali l'edema cerebrale, le crisi epilettiche e non in ultimo le infezioni hanno precluso l'adozione in larga scala di questo trattamento. Inoltre manca ad oggi una diretta comparazione rispetto chemioterapia standard condotta con temozolomide.

2.2 Trattamento della recidiva

Dopo il trattamento di prima linea la maggior parte dei pazienti vanno incontro alla progressione della malattia dopo un periodo libero da malattia (Progression Free Survival, PFS) che oscilla di norma tra i 7-10mesi. La mancanza di trattamenti di salvataggio in grado di migliorare significativamente l'aspettativa e la qualità della vita di questi pazienti si prospetta come una sfida della medicina moderna, che continua a ricercare nuovi farmaci e nuove strategie terapeutiche. La chirurgia trova indicazione quando vi sia un importante effetto massa o quando sia richiesta una citoriduzione della lesione e eventualmente un aggiornamento della caratteristiche istologiche della stessa. Controindicazioni all'approccio chirurgico sono costituite dal rischio di disseminazione del tumore all'interno dell'encefalo, dalla sua localizzazione e da uno scadente status neurologico . La chemioterapia di salvataggio include diverse opzioni tra le quali bevacizumab, spesso associato a temozolomide, agenti alchilanti quali le nitrosouree (carmustina e lomustina) e carboplatino. Bevacizumab, come verrà discusso in seguito, pur accompagnandosi a un incremento del PFS a 6 mesi e a maggiori tassi di risposta obiettiva, non impatta sulla sopravvivenza globale dei pazienti[27][28]; d'altra parte attraverso l'inibizione della via della neo-angiogenesi, bevacizumab è capace di ridurre l'edema peritumorale e ridurre così le dosi di desametasone somministrate ai pazienti: è dunque un'opzione principalmente per pazienti fortemente sintomatici, che possono trarre notevole beneficio dalla riduzione dell'edema cerebrale e dalla contrazione del volume tumorale indotto dalla somministrazione farmaco, sia come trattamento iniziale che al momento della recidiva[29] [30]. La chemioterapia metronomica con temozolomide costituisce un trattamento di salvataggio nei casi in cui la progressione si sia verificata dopo la radiote-

rapia e al completamento dei cicli di TMZ adiuvante, mentre il paziente non riceveva terapia[31]. La carmustina e la lomustina hanno da sempre costituito il paradigma del trattamento della recidiva di GB, tuttavia vanno segnalate la modesta efficacia[32][33][34][35] e tassi di emato-tossicità estremamente alti[36]. La combinazione di fotemustina e bevacizumab dopo essere stata sperimentata con esiti promettenti nell'approccio a pazienti con melanoma metastatico[37], si è dimostrata incapace di apportare il beneficio sperato in recidiva di glioblastoma[38]. Oggi una nuova possibilità terapeutica potrebbe essere rappresentata dalla stimolazione con campi elettrici alternati, come verrà discusso in seguito.

2.3 Nuove frontiere terapeutiche

2.3.1 Antiangiogenesi

Il Vascolar endotelial growth factor A (VEGF-A) può essere rilevato in alte quantità nel glioblastoma[26] e legandosi al VEGFR-2 (VEGF Receptor 2), anch'esso iperespresso in quantità da 3 a 5 volte maggiore rispetto ai controlli[39], trasduce importanti segnali di proliferazione delle cellule endoteliali; ciò spiegherebbe in parte la disfunzione della barriera emato-encefalica e i numerosi foci edematosi e emorragici riscontrabili nel glioblastoma. La conseguenza di queste scoperte sono stati gli innumerevoli studi molecolari e trial clinici con farmaci sperimentali messi a punto per inibire in modo specifico il segnale proliferativo mediato da VEGF. Le basi molecolari che determinano un incremento dell'espressione del gene VEGF sono rappresentate principalmente dall'ipossia che agisce tramite il fattore inducibile dall'ipossia (Hypoxia Inducible Factor, HIF), dalla cascata del segnale innescata dall'attivazione del recettore per il fattore di crescita epidermico (Epidermal Growth Factor, EGF) e non in ultimo dal fattore di trascrizione Forkhead box M1B che stimolerebbe la produzione di VEGF mediante una via HIF-indipendente[40]. Per quanto riguarda le sperimentazioni cliniche sono stati studiati numerosi anticorpi monoclonali, quali:

- **Cediranib (Recentin)**, inibitore tirosinchinasico del VEGFR. In uno studio di fase III randomizzato a tre bracci di recidiva di glioblastoma, la sola lomustina ha mostrato un PFS comparabile sia al trattamento con cediranib (Hazard ratio=1,05; 95% intervallo di confidenza) che al trattamento combinato con lomustina+cediranib (HR=0,76; 95%IC). Inoltre cediranib è stato associato a un'aumentata diffusione del tumore per via infiltrativa in un trial di fase II di recidiva di GBM[36].
- **Aflibercept** è una proteina di fusione ricombinante, capace di legare e sequestrare il VEGF-A, VEGF-B e il Placental Growth Factor (PGF).

In uno studio di fase II il tasso di risposta obiettiva rilevato è stato del 24% nonostante il tasso di PFS a 6 mesi pari a solo 7,7% suggerisca una minima attività oncologica del farmaco[41].

- **Bevacizumab (Bev; Avastin)** è un anticorpo monoclonale diretto contro il VEGF. Tra i numerosi trial condotti per saggiare l'attività del Bevacizumab da solo o in combinazione ad altri agenti chemioterapici due studi hanno portato all'approvazione del farmaco dalla FDA:
 - In uno studio di fase II su una coorte di 35 pazienti il bevacizumab in combinazione con l'irinotecano, inibitore della topoisomerasi I, ha mostrato un tasso di PFS a 6 mesi pari al 46% e un OS medio di 42settimane[42][43];
 - In un trial randomizzato di fase II su un campione di 167 pazienti con recidiva di GBM, il braccio irinotecan-bevacizumab ha mostrato un tasso di PFS a 6 mesi pari al 50,3% e una sopravvivenza mediana di 8,9 mesi; viceversa il braccio con solo bevacizumab ha presentato risultati comparabili, con un tasso di PFS a 6mesi del 42,6% e un OS di 9,3mesi.

L'iniziale ondata di entusiasmo portata dai primi studi condotti con bevacizumab è stata in seguito mitigata dagli esiti dei trial Avaglio e RTOG (Radiation Therapy Oncology Group), esitando nella mancata approvazione del farmaco da parte dell'EMA (European Medicines Agency). Entrambi questi due studi, l'Avaglio e il RTOG trial, hanno valutato l'utilizzo del farmaco in prima linea, la combinazione di bevacizumab con il regime di radio-chemioterapia standard (60Gray+75mg/m² di TMZ) rispetto alla sola chemioterapia in una coorte rispettivamente di 921 e 637 pazienti con diagnosi recente di GBM; i risultati, presentati nel 2013 al "Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology" hanno dimostrato un lieve incremento nel PFS da 6,2 a 10,6 mesi nello studio Avaglio e da 7,3 a 10,7 nel RTOG trial, ma nessuna modificazione è osservabile in termini di OS (rispettivamente pari a 16,8 vs 16,7 mesi nel primo studio, 15,7 vs 16,1 nel secondo). L'aumento del PFS è stato considerato non significativo in quanto non ha raggiunto la differenza pronosticata. Come ultima analisi si è valutato il parametro della qualità della vita che assume un andamento opposto nei due studi: il trial Avaglio suggerisce un incremento della qualità della vita, mentre lo studio RTOG evidenzia come pazienti randomizzati nel braccio con bevacizumab sviluppano un maggior decadimento neuro-cognitivo.

Il fronte della terapia anti-angiogenica è stato oggetto di forti rivisitazioni negli ultimi tempi; oltretutto la discrepanza tra l'incremento nel tasso di

PFS e il mancato aumento della sopravvivenza globale (OS) ha posto importanti interrogativi agli scienziati ed oncologi. È stato ipotizzato che i farmaci anti-angiogenici possano regolarizzare in modo transitorio l'anomala vascolarizzazione indotta dal tumore: ciò determinerebbe un più efficiente apporto di sangue e di ossigeno, contribuendo a ridurre l'edema peritumorale e la pressione di fluidi intratumorale (Intratumoral Fluid Pressure, IFP), e una migliore farmacocinetica del farmaco, che raggiungerebbe con maggior efficacia il proprio sito d'azione. D'altra parte ci sono evidenze che il Bevacizumab influenzi positivamente l'invasione delle cellule tumorali in un modello di grafting animale[44] e inoltre non ci sono studi che ad oggi dimostrino un vantaggio della terapia combinata bevacizumab+chemioterapia rispetto al trattamento con un singolo agente antiangiogenico[27][39][45][46].

2.3.2 Inibizione delle integrine

Le integrine sono una classe di recettori transmembrana a struttura eterodimerica che giocano un ruolo fondamentale nell'interazione tra la cellula e lo stroma circostante. Tra le molteplici funzioni che sono mediate dalle integrine è bene ricordare l'adesione, la differenziazione, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, il controllo dell'infiammazione e la modulazione della trasduzione del segnale attivata dal PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), dall'EGF e dal VEGF.

Cilengitide è il principale farmaco che agisce inibendo selettivamente i membri della famiglia delle integrine $\alpha V\beta 3$ e $\alpha V\beta 5$, ed è stato oggetto di numerosi trial clinici in pazienti con GBM. Sebbene diversi studi di fase II[47][48][49] abbiano dimostrato un migliore outcome in pazienti con metilazione del gene MGMT, sia di nuova diagnosi che con recidiva di GM trattati con alte dosi di Cilengitide, un grosso studio di fase III condotto da Merck in collaborazione con l'EORCT (European Organization Research Treatment) su pazienti di nuova diagnosi e con MGMT metilato, non ha dimostrato alcuna attività rilevabile da parte del farmaco. È pertanto auspicabile che vengano condotti ulteriori studi in questo ambito, al fine di porre chiarezza sulla potenziale utilità del cilengitide.

2.3.3 Inibizione dei recettori di fattori di crescita e della trasduzione del segnale

Altrettante strategie terapeutiche hanno avuto origine a seguito dello studio dell'alterazione dell'espressione genica e del signaling intracellulare di molteplici proteine che è stato analizzato nelle linee cellulari di GBM; nel 50% dei casi di GBM, ad esempio, è stata rilevata l'amplificazione e l'iperespressione del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR). A questa scoperta

hanno fatto seguito numerosi trial con inibitori molecolari di EGFR come gefitinib, una piccola molecola capace di inibire la tirosinchinasi presente sul lato intracellulare del recettore, che in uno studio di fase II si è dimostrata in grado di indurre una risposta parziale nel 12,7% dei casi di recidiva di GBM [50]; ciononostante il tasso di PFS a 6 mesi si assesta drasticamente intorno al 13% e l'OS a 10 mesi, senza alcun differenza in termini di outcome rispetto a quello di pazienti sottoposti a terapie non efficaci. Anche erlotinib, analogo di gefitinib, si è dimostrato incapace di impattare sulla OS e PFS se combinato con radioterapia, TMZ o altri chemioterapici[51]. Anche lapatinib, che pur vantando una adeguata distribuzione all'interno del tessuto tumorale, e inibendo non solo l'EGFR ma anche HER2, non ha presentato alcuna efficacia in un trial di fase II[52]. In ultimo anche la sperimentazione con cetuximab si è rivelata fallimentare, nonostante la combinazione con irinotecan e bevacizumab e la stratificazione dei pazienti in accordo con l'amplificazione dell'EGFR[53].

La sottoclasse proneurale del GBM si caratterizza per la costante iper-espressione del recettore del fattore di crescita piastrinico (platelet derived growth factor receptor, PDGFR)[17], che media segnali di crescita e angiogenesi[54] e che risulta essere efficacemente inibito nella sua porzione tirosinchinasica da imatinib. Anche questa evidenza biochimica non è stata supportata da un risvolto clinico, dato che nessun trial ha avuto successo nel dimostrare un potenziale effetto benefico di imatinib nel trattamento del GBM e, come evidenziabile da uno studio di fase II, il tasso di PFS a sei mesi è pari al 3%, nonostante la stratificazione dei pazienti sulla base dell'espressione del PDGFR[55].

È d'obbligo sottolineare come ad oggi nessun farmaco biologico che inibisca specificamente un bersaglio molecolare è capace di impattare significativamente sull'outcome o sulla sopravvivenza globale di pazienti con nuova diagnosi o con ricorrenza di glioblastoma. Ci sono diverse spiegazioni che rendono ragione di questa evidenza: i farmaci selettivi potrebbero essere insufficienti a indurre una inibizione significativa del proprio target o essere incapaci di raggiungerlo a concentrazioni adeguate, venendo ostacolati da molteplici fattori quali la forte pressione intratumorale o la barriera emato-encefalica, che impedisce il passaggio di anticorpi monoclonali sulla base della dimensione molecolare. Inoltre l'inibizione ottenuta mediante l'effetto del farmaco potrebbe essere controbilanciata dall'attivazione di vie parallele che mediano simili segnali, o che riescano ad attivare i trasduttori della stessa via a valle, bypassando l'effetto inibitorio esercitato a monte dal farmaco[56]. Per questo motivo è stato valutato l'uso di farmaci che abbiano come bersaglio un effetto della trasduzione del segnale che agisca a valle della cascata molecolare, quale ad esempio mTor (mammalian target of rapamycin), una protein-chinasi

che trasduce segnali mediati dalla fosfatidil-inositolo-3-chinasi/protein-chinasi B (PI3K/AKT) e dalla via di Ras. La scoperta che la rapamicina inibisce la crescita del glioblastoma in vitro[57] ha dato il via alle sperimentazioni in vivo su modelli animali e alla messa in atto di trial clinici, i quali ancora una volta non sono stati all'altezza delle aspettative e non hanno dimostrato una chiara efficacia. In uno studio di fase II si è testata l'attività di temsirolimus, un inibitore selettivo di mTor, sia come singolo farmaco[58], sia in combinazione con erlotinib[59], ma i risultati del trial hanno mostrato una scarsa attività del composto in entrambi i casi; anche l'associazione con bevacizumab in un secondo studio non ha denotato alcun effetto significativo alla RM effettuata in 10 pazienti presi in esame, determinando una interruzione prematura della sperimentazione[60]. Ugualmente deludente è stato il tentativo di combinare temsirolimus con sorafenib in pazienti con recidiva di glioblastoma e gliosarcoma[61].

2.3.4 Epigenetica

Un importante ruolo nella trasformazione neoplastica delle cellule gliali è ricoperto dall'epigenetica, che agisce principalmente attraverso l'acetilazione e la deacetilazione degli istoni (histones acetylation and deacetylation, HDACs). Ci sono prove fortemente suggestive dell'influenza dell'acido valproico nella regolazione dell'espressione genica, e più specificamente nell'inibizione del HDACs ad alte concentrazioni che potrebbe associarsi ad un incremento della sopravvivenza nei pazienti con glioblastoma. Uno studio retrospettivo di un sottogruppo di pazienti arruolati nel trial EORTC/NCIC 26981-22981 e sottoposti sin dall'inizio a trattamento antiepilettico con valproato di sodio, ha segnalato un incremento dell'outcome di questi pazienti, in comparazione ai gruppi non trattati o trattati con antiepilettici induttori enzimatici, seppure la profilassi con acido valproico si associ a frequenti effetti collaterali di natura dermatologica[62].

2.3.5 Immunoterapia

La modulazione del sistema immunitario è stata considerata un'avvincente avanguardia terapeutica in campo oncologico; le sue applicazioni spaziano dal cancro prostatico al melanoma[63], in cui il trattamento con l'anticorpo monoclonale ipilimumab è capace di ripristinare la risposta immune contro le cellule neoplastiche attraverso la modulazione dei linfociti T. Nell'ambito neuro-oncologico si stanno tentando svariati approcci sperimentali, alcuni dei quali includono l'utilizzo di linfociti autologhi attivati, l'immunoterapia con citochine e cellule dendritiche e diversi vaccini; uno di questi è il rindopepimut, un vaccino peptidico contro una sequenza di 13 aminoacidi specifica della

variante neoplastica dell'EGFRvIII. È stato dimostrato infatti che ben nel 30% dei casi di GBM vi sia un'attivazione costitutiva di questa variante. Il protocollo terapeutico che è stato elaborato in uno studio di fase II prevede il trattamento standard di radio-chemioterapia in pazienti con nuova diagnosi, e il mantenimento con TMZ con aggiunta della vaccinazione con rindopepimut. I risultati sono incoraggianti con un tasso di PFS di 14,2 mesi (IC 95%: 9,9 a 17,6 mesi) e un OS di 23,6 mesi[64]. Uno studio multicentrico a doppio cieco è attualmente in corso per confermare la validità di questo approccio (NCT01480479).

2.3.6 Campi elettrici alternati

Lo studio dei campi elettrici alternati (alternating electric fields, AEF) ha svelato un'ampia gamma di effetti nei tessuti vitali. A frequenze molto basse ($< 1kHz$) esso può indurre una depolarizzazione di membrana e stimolare tessuti eccitabili, mentre a frequenze nell'ordine dei $100 - 300kHz$ l'effetto descrivibile è l'arresto della proliferazione cellulare, sia in vitro che in modelli animali[65]. Dall'osservazione microscopica delle cellule sottoposte a AEF sono state descritte configurazioni mitotiche anomale, che ricordano strettamente le anomalie morfologiche indotte dai taxani, farmaci chemioterapici che interferiscono con la polimerizzazione della tubulina[66]. È stato dunque ipotizzato che l'applicazione di campi elettrici non omogenei generi una forza unidirezionale capace di distruggere la normale polimerizzazione/depolverizzazione della tubulina durante il processo mitotico. L'utilizzo di questa tecnologia in pazienti con GBM è stata possibile grazie alla realizzazione di un apparecchio portatile applicabile alla cute chiamato NovoTTF-100A, il quale genera all'interno dell'encefalo AEF con una frequenza pari a 200kHz e intensità pari a 1-2V/cm. Un primo trial ha coinvolto 10 pazienti, che sono stati istruiti a indossare l'apparecchio per un minimo di 18 ore al giorno fino alla progressione di malattia o per un periodo massimo di 18 mesi. La tolleranza del dispositivo è stata buona, nonostante siano stati frequentemente documentati minimi effetti collaterali, quali la dermatite in corrispondenza degli elettrodi. I risultati dello studio indicano un Time-to-Progression (TTP) di 6.1 mesi nel braccio dei trattati rispetto alle 9.5 settimane dei non trattati, un tasso di PFS pari al 50% nei primi e 15.3% nei secondi e infine un OS di 62.2 settimane nei pazienti con dispositivo impiantato in confronto alle sole 29.3 settimane dell'altro gruppo[67]. Sulla base di questo risultato è stato messo a punto un trial multicentrico di fase III, con la finalità di paragonare in termini di sicurezza e efficacia l'utilizzo dei AEF rispetto al miglior regime chemioterapico scelto sulla base del singolo paziente, in pazienti con recidiva di GBM. Lo studio ha coinvolto una maggioranza di pazienti pesantemente trattati, in quanto molti di essi avevano già ricevuto in precedenza un tratta-

mento per arrestare la progressione del tumore dal momento in cui era stata diagnostica la recidiva. I risultati non dimostrano una differenza significativa tra i due gruppi (OS di 6.0 nei pazienti sottoposti a AEF vs 6.6 nei pazienti ricevuti chemioterapici), evidenziando la non inferiorità dell'AEF rispetto alla chemioterapia e il suo migliore profilo di tossicità, sebbene nessuno di questi presidi abbia sortito un effetto oncologico degno di nota. Al momento un più ampio studio di fase III che ha reclutato oltre 800 pazienti con nuova diagnosi di GBM e li ha randomizzati in due bracci: il primo sottoposto a radio-chemioterapia standard concomitanti, l'altro trattato con radioterapia standard, TMZ adiuvante e con in aggiunta l'apparecchio generante AEF. L'idea di fondo da testare in questo trial è che i campi elettrici alternati possano agire sinergicamente incrementando l'effetto del chemioterapico, come è stato recentemente dimostrato mediante uno studio in vitro e in un studio pilota che ha reclutato solo 10 pazienti[67].

2.4 Impiego del Bevacizumab nel glioblastoma

Indicazione nella recidiva di GBM: l'uso del Bevacizumab come trattamento di salvataggio del GBM rientra nelle linee guida del National Comprehensive Cancer Network, ed è stato approvato in più di 40 paesi[68]. La posologia adottata nella maggior parte dei trial clinici e specificata nelle linee guida è pari a 10mg/kg ogni due settimane, anche se è concessa una certa variabilità nella schema terapeutico, in quanto la risposta al farmaco si osserva già a dosi inferiori, pari a 5mg/kg [69]. In letteratura è stata descritta ugualmente l'infusione intra-arteriosa superselettiva di bevacizumab, che risulta essere molto efficace, ma non priva di rischi oltre che di difficile esecuzione[70].

Modificazioni dell'Imaging: la RM eseguita dopo l'inizio del trattamento con Bevacizumab presenta delle caratteristiche peculiari, dovute al duplice effetto del farmaco, che meritano di essere descritte. Nella maggior parte dei casi si osserva infatti una marcata riduzione dell'edema cerebrale, con conseguente riduzione dell'effetto massa e rientro in asse delle strutture della linea mediana. Nel 70% dei pazienti si documenta inoltre un netto decremento della lesione captante il contrasto, rilevabile già a 6 settimane dall'inizio del trattamento[71] e imputabile all'iniziale effetto anti-angiogenetico del farmaco, che regolarizzerebbe la struttura permeabile e danneggiata della barriera emato-encefalica[72]. In accordo con quanto esposto, le modificazioni strutturali si accompagnano, nella maggior parte dei pazienti, con un iniziale miglioramento della sintomatologia che permetterebbe una riduzione delle dosi di steroidi, attuabile in circa il 30-70% dei pazienti, motivo per cui il bevacizumab è stato definito come un "costoso super-steroidi" [73].

La progressione della malattia si verifica sostanzialmente in tutti i pazienti e si presenta spesso sotto forma di lesioni di natura infiltrativa non captanti il contrasto, evidenziabili alle sequenze T2 pesate. Un altro fenomeno degno di nota e ampiamente descritto in letteratura consta in una rapida ripresa della malattia dopo sospensione del bevacizumab, definibile come un incremento pari almeno al 50% del diametro massimo della parte captante il contrasto confrontata con quella della RM precedente. Secondo alcuni autori questo pone evidenza per la continuazione della terapia con bevacizumab nel caso che si verifichi una progressione del tumore[74].

2.4.1 Effetti avversi

I principali effetti avversi che sono stati descritti nei pazienti sottoposti a terapia sperimentale con bevacizumab includono l'ipertensione arteriosa (IA), l'emorragia intracranica, il tromboembolismo venoso, la proteinuria, complicanze nella guarigione delle ferite e la perforazione gastro-intestinale. È stato ipotizzato che l'ipertensione possa costituire un fattore predittivo di risposta al farmaco in pazienti affetti da carcinoma colon-rettale e tumore polmonare non a piccole cellule[75][76], ma i due studi osservazionali sono stati successivamente smentiti da un terzo trial che ha evidenziato la mancanza di correlazione prognostica[77]. Il meccanismo patogenetico che rende ragione dello sviluppo di IA nel 23,6% dei trattati (di cui il 7,9% ha sviluppato IA di grado 3-4) è attribuibile alla ridotta produzione di ossido nitrico da parte delle cellule endoteliali e dal conseguente incremento delle resistenze vascolari sistemiche[78].

Studio	BRAIN, 2009	JO22506, 2012	Kreisl, 2009	Kreisl, 2010	Chamberlain, 2010
Numero di pazienti	85	31	48	31	50
Ipertensione	35,7/8,3	32,3/9,7	12,6/6,42	32,0/16,0	14,0/6,0
Emorragia intracranica	2,4/0	3,2/0	0/0	0/0	4,0/0
Eventi tromboembolici	3,6/3,6	3,2/3,2	12,6/12,6	6,4/6,4	8,0/2,0
Proteinuria	4,8/0	41,9/0	2,1/0	28,8/3,2	10,0/2,0
Complicazioni delle ferite	6,0/2,4	0/0	0/0	3,2/0	4,0/2,0
Perforazione gastrointestinale	0/0	0/0	2,1/2,1	0/0	0/0

Tabella 4 Principali effetti avversi rilevati in monoterapia con Bevacizumab in glioblastoma (percentuale di tutti i casi / percentuale dei casi con grado ≥ 3) [79].

Capitolo 3

Diagnostica

La descrizione degli strumenti di imaging diagnostico prenderà in analisi dapprima le tecniche convenzionali e successivamente le tecniche non convenzionali.

3.1 Diagnostica convenzionale: risonanza magnetica

La risonanza magnetica è considerata il gold standard sia per la diagnosi di GBM che per il follow up della lesione, a differenza della TC che riveste un ruolo marginale, spesso limitato ai casi di presentazione acuta della malattia, o eventualmente nell'immediato controllo post-chirurgico. Nel sospetto clinico di un tumore endocranico lo studio RM è essenzialmente di tipo "morfologico" e, nonostante l'aumento delle sequenze disponibili, il miglioramento della risoluzione spaziale e di contrasto e la riduzione dei tempi di esecuzione, questo approccio non è sostanzialmente cambiato negli ultimi 10 anni.

La base di partenza di uno studio RM del cranio per la ricerca di un tumore intra-assiale è costituita da sequenze Spin-Echo (SE) T1-dipendenti di spessore non superiore a 5 mm, secondo piani sagittali. Successivamente sono indispensabili acquisizioni con sequenze T2-dipendenti, in quanto in queste soprattutto risiede la capacità di distinguere il tessuto nervoso normale da quello patologico. Tradizionalmente si usano sequenze SE a TR lungo con due echi, il primo dei quali destinato a ottenere immagini dipendenti dalla densità protonica, il secondo quelle propriamente T2-dipendenti; con questa sequenza si programmano acquisizioni secondo il piano assiale e coronale con strati di spessore di 5 mm.

Più recentemente sono state introdotte sequenze con più rapidi tempi di acquisizione, quali le Turbo(Fast)SE(TSE o FSE) e le sequenze FLAIR. Queste ultime sono caratterizzate da TR, TE e TI tali da ottenere immagini

T2-dipendenti con annullamento del segnale liquorale e, nel caso della patologia tumorale intracerebrale, il vantaggio delle FLAIR consiste nella enorme sensibilità al rilievo dei tessuti patologici caratterizzati da allungamento del tempo di rilassamento T2 e quindi nella possibile individuazione di lesioni anche molto piccole anche adiacenti a spazi liquorali.

Di fronte ad una lesione espansiva endocranica di sospetta natura neoplastica, inoltre, si rende obbligatoria la somministrazione per via venosa di mdc paramagnetico. Le acquisizioni dopo contrasto devono essere T_1 pesate ed ottenute almeno secondo due piani dello spazio, scegliendo l'orientamento sulla base della sede del tumore e quindi della necessità di definire i suoi rapporti e aree critiche/eloquenti adiacenti.

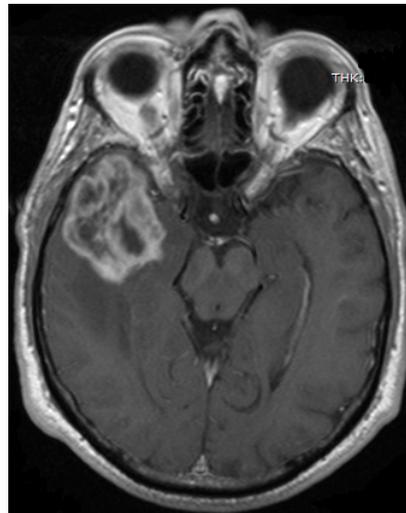


Figura 3.1: Immagine RM SE T_1 pesata di un glioblastoma dopo somministrazione di mdc endovena

Nello studio morfologico RM di un glioblastoma e di un glioma in generale, i principali passaggi attraverso i quali valutare i reperti ed arrivare ad una conclusione diagnostica, sono i seguenti:

1. Riconoscimento della lesione
2. Identificazione della sede
3. Valutazione dei segni di massa
4. Caratterizzazione macroscopica della lesione
5. Caratterizzazione microscopica della lesione

6. Valutazione dell'impregnazione contrastografica
7. Valutazione di modificazioni peritumorali o reattive

3.1.1 Riconoscimento della lesione

Per lesione o per tessuto patologico, in senso lato, si intende una zona/area in cui si rileva un segnale RM diverso da quello “normale”. All’esame diretto, la discriminazione tra tessuto normale e tessuto patologico generalmente è basata soprattutto sulle sequenze SE o TSE DP e T2-dipendenti o FLAIR, tutte molto più sensibili delle sequenze T1-dipendenti.

3.1.2 Identificazione della sede

Questo aspetto deve essere descritto in modo particolarmente accurato, in particolare i rapporti con aree o strutture critiche o eloquenti, il cui grado di preservazione è spesso influenzato dalle modalità di crescita del GBM, spesso infiltrativa. Quando la definizione di sede è difficile o complessa, è opportuno includere nella procedura diagnostica sequenze 3D T1-dipendenti (“volumetriche”) sulle quali si possono “riportare” successivamente le informazioni ottenute con le sequenze T2-DP dipendenti, più sensibili[80]. Le sequenze T1 pesate acquisite prima e dopo il contrasto forniscono informazioni precise e essenziali per la chirurgia escissionale del GBM o per l’ablazione radiochirurgica[81].

3.1.3 Valutazione dei segni di massa

Come descritto sopra, l’effetto massa di un glioblastoma è solitamente cospicuo, non solo in rapporto alle sue dimensioni ma anche alle sue caratteristiche biologiche intrinseche, che condizionano la sua tendenza a infiltrare o a sostituire il tessuto cerebrale adiacente.

3.1.4 Caratterizzazione macroscopica della lesione

Il glioblastoma si caratterizza per una marcata neoangiogenesi con infiltrazione dei tessuti circostanti e potenzialità di disseminazione in altre sedi del sistema nervoso centrale, oltre che per la presenza di aree di necrosi e di emorragia. Alla RM questo si traduce in una lesione dalla forma irregolare, che induce una estesa reazione edematosa. La lesione centrale mostra tipicamente un segnale ipointenso nelle sequenze pesate in T1 e iperintenso in T2, dovuto all’incremento della popolazione cellulare all’interno del tessuto neoplastico.

Nelle aree cistiche, il segnale del contenuto fluido/semifluido è in rapporto al tipo di liquido e in particolare alla concentrazione proteica; in generale al

crescere della concentrazione proteica cresce il segnale in SE T2-dipendenti, ma quando la concentrazione proteica molto elevata si può arrivare a reperti di iperintensità nelle sequenze SE T1-dipendenti e di ipointensità in quelle T2-dipendenti.

La necrosi intratumorale, spesso presente quando c'è progressione del GBM, è considerata infatti un segno affidabile di anaplasia tumorale e indica in genere la natura rapidamente evolutiva e maligna della lesione. Purtroppo, con RM l'identificazione della necrosi non sempre è possibile e non sempre la metodica consente la differenziazione sulla base del segnale tra aree necrotiche e aree cistiche. Infatti, sia i focolai necrotici che le componenti cistiche intra-lesionali, hanno in genere un basso segnale nelle sequenze SE T1-dipendenti ed elevato in quelle SE-TSE T2-dipendenti. Tuttavia, le aree necrotiche hanno margini irregolari mentre le cisti tumorali hanno di solito margini regolari e parete sottile.

Per quanto riguarda la componente emorragica, le caratteristiche di segnale dell'ematoma intratumorale sono sovrapponibili in linea di massima a quelle dell'emorragia a genesi vascolare e dipendono dai fenomeni di catabolismo cui va incontro l'emoglobina una volta fuoriuscita dai vasi. Tuttavia, nelle emorragie intratumorali le varie fasi cataboliche sono di solito rallentate, quindi è importante un criterio evolutivo mediante controlli ripetuti a distanza di tempo.

Le calcificazioni sono abbastanza comuni nei casi di glioblastoma secondario evolutosi da un oligodendroglioma; a tal proposito si deve ricordare che nonostante la messa a punto di tante nuove sequenze, permane il limite storico della RM nella loro identificazione. Infatti le calcificazioni possono non dare alcun segnale particolare, oppure essere ipointense in SE T2-dipendenti ma anche, paradossalmente, essere iperintense nelle sequenze T1-dipendenti. In linea di massima, ogni volta che si documentano alla RM focolai di ipointensità nelle sequenze SE T2-dipendenti, bisogna ricorrere ancora oggi alla TC per essere sicuri della presenza di calcificazioni intratumorali.

3.1.5 Caratterizzazione microscopica della lesione

Il tentativo di ottenere con RM informazioni microscopiche e quindi di analizzare le caratteristiche del tessuto neoplastico è uno dei momenti più importanti nel processo di caratterizzazione tissutale. L'affermazione che quasi tutti i tessuti patologici, sia neoplastici che non, mostrano un allungamento dei tempi di rilassamento T2 con conseguente iperintensità nelle sequenze T2-dipendenti, è vera ma troppo generica. Di fronte ad un tumore cerebrale di alto grado, infatti, occorre considerare l'entità della iperintensità di segnale nelle sequenze T2-dipendenti e la sua omogeneità/disomogeneità: con un'attenta valutazione delle sequenze T2-dipendenti, si vede che in una parte dei

glioblastomi il segnale è meno intenso che in altre patologie “non neoplastiche” e che vi sono aree tumorali in cui il segnale è ancora più basso, cioè addirittura isointenso o ipointenso rispetto alla corteccia cerebrale. Il rilievo di questa iso-ipointensità nelle sequenze T2-dipendenti costituisce il miglior esempio della possibilità con RM di una caratterizzazione di tipo microscopico: infatti i tumori con questo tipo di segnale sono caratterizzati da una elevata cellularità e/o da un elevato rapporto nucleo-citoplasmatico.

3.1.6 Valutazione dell' impregnazione contrastografica

In RM i vasi con flusso rapido di tipo arterioso hanno una bassa intensità di segnale in tutte le sequenze per il fenomeno del “vuoto di segnale” (flow void): questo reperto non si modifica dopo somministrazione di mdc per vena a causa della rapidità del flusso. Invece i vasi venosi a basso flusso hanno intensità di segnale variabile e di solito manifestano impregnazione dopo contrasto per vena. Per questi motivi una ricca vascolarizzazione tumorale non comporta, di per sé, un'impregnazione tissutale che è invece dipendente dalla soluzione di integrità della barriera emato-encefalica (BEE), che riveste l'endotelio dei vasi neoformati. In passato il rilevamento di questo reperto era considerato non solo suggestivo di un potenziale di malignità, ma patognomonico di lesioni di alto grado; tuttavia alcuni glioblastomi secondari mostrano impregnazione scarsa o assente (figura 3.2).

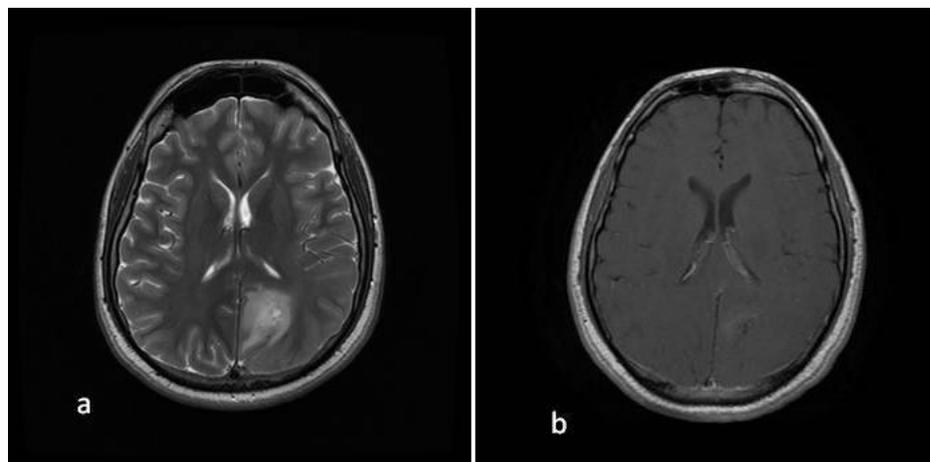


Figura 3.2: Imaging RM di Glioblastoma: a) T2 b) T_1 post contrasto.

3.1.7 Modificazioni peritumorali o reattive

L'analisi RM del focolaio tumorale cerebrale deve includere anche le possibili modificazioni peritumorali, reattive e/o secondarie. Queste infatti rivestono notevole importanza semeiologica e clinica, giustificando spesso la sintomatologia neurologica e condizionando le scelte terapeutiche. In molti casi sorgono difficoltà nel precisare dove cominciano le alterazioni reattive e dove finisce l'infiltrazione neoplastica in quanto quello che viene semplicisticamente considerato "edema reattivo" include spesso aree di infiltrazione neoplastica, microscopica ma anche macroscopica e ciò è stato confermato anche attraverso confronti con biopsie stereotassiche.

Tra le modificazioni marginali vi è l'edema perilesionale che, nei casi di glioblastoma, è tipicamente esteso e può sconfinare da un lobo all'altro attraverso i tratti di sostanza bianca; esso rappresenta l'alterazione più comune e la sua valutazione si fonda su segni diretti e indiretti.

Con sequenze convenzionali, l'acqua che si accumula negli spazi interstiziali circostanti il tumore determina un allungamento dei tempi di rilassamento T1 e T2. Per cui si manifesta, nelle sequenze SE T1 e T2-dipendenti, sotto forma di aloni di relativa maggiore ipointensità e iperintensità, rispetto al tessuto tumorale e normale. Tuttavia non sempre si riesce a differenziare completamente l'alterazione di segnale legata all'edema da quella del tessuto neoplastico, per cui assumono un ruolo importante i segni indiretti, ovvero l'effetto massa, il rigonfiamento cerebrale, focale o diffuso, nonché il riconoscimento di eventuali ernie cerebrali interne.

Tra le modificazioni secondarie ricordiamo anche eventuali alterazioni meninge e ossee adiacenti il tumore[82].

3.2 Diagnostica non convenzionale

3.2.1 Tecnica DWI

La tecnica della diffusione in RM si basa sul concetto che le molecole di acqua presenti all'interno delle strutture biologiche diffondono e compiono traiettorie del tutto casuali per la presenza di moti termici (moti browniani). La distanza (L) percorsa da una molecola in un determinato tempo (T), è espressa dalla seguente relazione: $L = \sqrt{2DT}$, dove $D(\frac{mm^2}{s})$ rappresenta il coefficiente di diffusione, un parametro che dipende dalle caratteristiche di diffusibilità della molecola, viscosità del solvente e dalla temperatura. Nel caso dell'acqua pura alla temperatura di $40^{\circ}C$ D è $2,3 \times 10^{-3} \frac{mm^2}{s}$. Nei tessuti biologici tuttavia, il coefficiente di diffusione dell'acqua risulta due-tre volte inferiore rispetto a quello dell'acqua pura e viene più propriamente indicato con il termine di "coefficiente di diffusione apparente". La riduzione di D nei tessuti biologici è

dovuta alla presenza di ostacoli (macromolecole, membrane cellulari, organuli intracellulari) ed alle caratteristiche biochimiche ed ultrastrutturali dei tessuti biologici.

La diffusione dei protoni delle molecole di acqua, dunque, è un fenomeno dipendente dalle caratteristiche tissutali e, a questo proposito, si distinguono:

1. **Diffusione isotropica** quando la diffusione è uguale in tutte le direzioni dello spazio;
2. **Diffusione anisotropica** quando la diffusione è diversa nelle differenti direzioni dello spazio, come succede nella sostanza bianca del sistema nervoso e nel tessuto muscolare. A livello della sostanza bianca, ad esempio, la diffusione risente dell'orientamento dei fasci di fibre nervose e risulta facilitata nella direzione parallela a questi (per l'assenza di ostacoli e la presenza di strutture assoplasmatiche che facilitano il trasporto dell'acqua), ed ostacolata in direzione perpendicolare.

Per studiare il fenomeno della diffusione sono state create apposite sequenze caratterizzate dall'impiego di una coppia addizionale di gradienti di campo magnetico (gradienti di Stejskal e Tanner), applicati simmetricamente prima e dopo l'impulso a 180 gradi di una sequenza ad echo di spin (SE) (fig. 3.3)[83].

Il principio sul quale si basa la misurazione della diffusione in RM, è quello per cui uno spin sottoposto ad un gradiente di campo magnetico va incontro al fenomeno del defasamento. L'applicazione di un secondo gradiente di analoga intensità, ma direzione opposta, causa un rifasamento dello spin con ritorno allo stato originale. Tale ripristino si ha nel caso lo spin sia stazionario. Nel caso, invece, che lo spin si sposti nel periodo che intercorre tra lo spegnimento del primo gradiente e l'accensione del secondo, lo spin che ha perso coerenza di fase non sarà in grado di recuperarla. In un voxel, quindi, la molecola che diffonde avrà una perdita di fase netta. La perdita di coerenza di fase causa una diminuzione dell'ampiezza dell'echo e quindi una riduzione del segnale secondo la seguente relazione:

$$I = I_0 e^{-[\gamma^2 \cdot G^2 \cdot B^2 \cdot (\Delta - \delta/3) ADC]}$$

ADC: coefficiente di diffusione apparente

I: intensità del segnale dopo l'applicazione dei gradienti sensibilizzanti alla diffusione

*I*₀ : intensità del segnale senza l'applicazione dei gradienti sensibilizzanti alla diffusione

γ costante giromagnetica

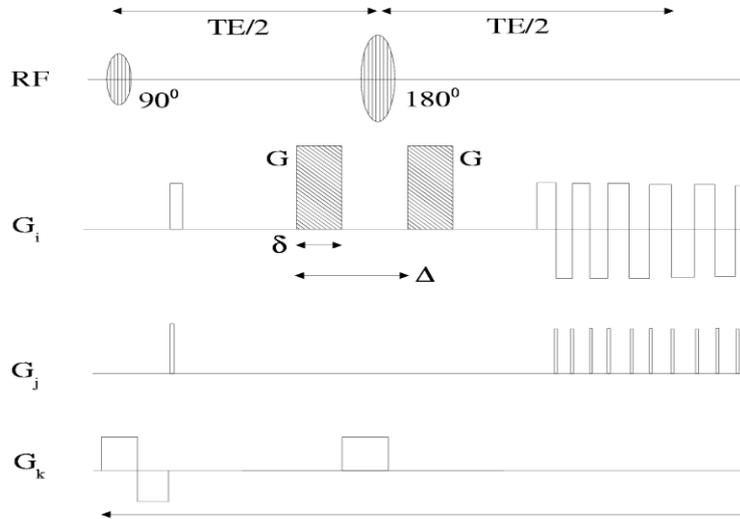


Figura 3.3: Rappresentazione schematica della sequenza SE EPI in cui sono stati applicati i gradienti di diffusione (G) di Stejskal e Tanner lungo uno dei tre assi di codifica.

G : ampiezza del gradiente sensibilizzante

B : durata del gradiente sensibilizzante Δ : intervallo di tempo che intercorre tra i due gradienti sensibilizzanti

Poiché $-\gamma^2 \cdot G^2 \cdot B^2 \cdot (\Delta - \delta/3)$ dipende dalla conformazione fisica del gradiente sensibilizzante alla diffusione e viene espressa con b , la relazione precedente può essere riassunta in:

$$I = I_0 \cdot e^{-b \cdot x \cdot ADC} \quad (3.1)$$

Ove b value esprime la tipologia del gradiente. Tanto maggiore è il valore di b tanto maggiore sarà la pesatura in diffusione della nostra immagine. Il sistema nervoso centrale è una struttura biologica complessa nella quale la diffusione delle molecole di acqua è anisotropa. La riduzione del segnale nelle immagini pesate in diffusione dipende, infatti, dall'orientamento delle fibre nervose che influenzano la diffusività dell'acqua rispetto alla direzione di applicazione del gradiente di diffusione. Ad esempio il fascio corticospinale, studiato sul piano assiale, varia di intensità in funzione della direzione di applicazione del gradiente di diffusione. Se il gradiente è applicato in direzione parallela a quella del fascio di fibre, avremo una bassa intensità del fascio, se applicato ortogonalmente, il segnale sarà più elevato. In realtà la

diffusione dell'acqua lungo il fascio di fibre è sempre la stessa. Per ovviare a tale problema, nell'applicazione clinica dell'imaging in diffusione è stata creata l'immagine cosiddetta "isotropa" che è la sommatoria delle immagini ottenute applicando il gradiente di diffusione nelle tre direzioni di codifica di strato, frequenza e fase.

$$\begin{aligned} \text{Immagine isotropa} &= \sqrt[3]{I_x \cdot I_y \cdot I_z} \\ I_x &= I_0 \cdot e^{-b \cdot ADC_x} \\ I_y &= I_0 \cdot e^{-b \cdot ADC_y} \\ I_z &= I_0 \cdot e^{-b \cdot ADC_z} \end{aligned}$$

In base alla relazione (3.1), il calcolo del coefficiente di diffusione apparente può essere fatto come $ADC = \frac{1}{b} \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$ ottenendo due immagini di cui una pesata in diffusione (I) applicando il gradiente di diffusione ed un pesata in T2 (I_0) non applicando il gradiente di diffusione. La mappa di ADC ottenuta consente una misurazione quantitativa in mm^2 al secondo della diffusività protonica in vivo in quanto, diversamente dall'immagine pesata in diffusione, non risente né della direzione del gradiente né degli effetti del T2 presenti nel tessuto in quanto dipendente dal logaritmo del rapporto $\frac{I_0}{I}$ [84][85][86][87][88].)

La mappa di diffusione offre inoltre il grande pregio di valutare la cellularità: il razionale è basato sulla premessa che la diffusività dell'acqua attraverso il compartimento extracellulare è inversamente proporzionale al contenuto e ai costituenti intracellulari. Maggiore è la cellularità del tumore (e quindi più grande è il volume dello spazio intracellulare), più basso sarà il coefficiente di diffusione apparente, in quanto si riduce la diffusività dell'acqua in conseguenza della riduzione relativa dello spazio extracellulare a disposizione per il movimento dei protoni. Quindi, più alto è il grado del glioma, più basso è l' ADC. A dimostrazione di ciò si rileva che la stessa area lesionale, che all'imaging convenzionale capta il contrasto, e le regioni necrotiche a basso segnale nelle sequenze SE T1-dipendenti, corrispondono rispettivamente ad aree a basso e alto segnale nelle mappa di diffusione[89].

In definitiva l'ADC correla negativamente con la cellularità[90] e con il grado di anaplasia[91] per cui può essere utilizzato per identificare la porzione tumorale più maligna su cui eseguire la biopsia stereotassica ma anche per valutare le modificazioni della cellularità (fraction killed cells) indotte dalla chemio o radioterapia[92].



Figura 3.4: Mappa di ADC di un cervello sano.

3.2.2 Tecnica PWI

Nella sua accezione più generale, la perfusione indica il rilascio di sostanze nutrienti che sono necessarie alle cellule per lo svolgimento delle loro funzioni vitali. In realtà, le tecniche convenzionali di misura della perfusione forniscono informazioni soltanto riguardo alla micro-circolazione capillare, senza coinvolgere i meccanismi di compartimentalizzazione delle sostanze.

La perfusione di un tessuto è quindi il costante apporto di sangue al parenchima attraverso i capillari. Ne segue che, da un punto di vista operativo, la perfusione è definita come la quantità di sangue rilasciata al tessuto cerebrale in un certo intervallo temporale, ed è misurata $\text{mlsangue}/\text{min}/\text{gtessuto}$. Dato che la perfusione avviene a livello capillare, essa possiede proprietà fisiche che sono notevolmente differenti da quelle del flusso (coerente) dei grandi vasi. Il moto perfusivo è assimilabile ad un flusso microscopico incoerente, inteso come somma di molti flussi coerenti distribuiti in maniera casuale. In altre parole, quindi, la perfusione è un moto pseudo-diffusivo.

Lo studio della perfusione cerebrale è stata tradizionalmente una prerogativa della medicina nucleare. Negli ultimi 25 anni, diverse tecniche sono state messe a punto per la misura della perfusione cerebrale, come le metodiche nucleari (PET - tomografia ad emissione di positroni - SPECT - tomografia ad emissione di singoli fotoni). Da alcuni anni sono state introdotte tecniche RM per la misura della perfusione cerebrale. In generale esse offrono il vantaggio di essere non invasive e di possedere una più alta risoluzione spaziale e temporale rispetto alle metodiche nucleari; tuttavia, mostrano diversi aspetti

problematici qualora si vogliano avere informazioni quantitative assolute del CBF e del CBV.

Le tecniche di perfusione a RM possono essere suddivise in funzione del tipo di tracciante utilizzato in tecniche con tracciante esogeno non diffusibile, come la tecnica DSC (Dynamic Susceptibility Contrast-enhanced), e tecniche a tracciante endogeno diffusibile come le Arterial Spin Labeling (ASL).

Le ASL rivestono enorme importanza per la quantificazione della perfusione cerebrale. Possiamo brevemente dire che nelle strategie ASL, i protoni dell'acqua del sangue sono "marcati" da impulsi di saturazione o di inversione prima del modulo di acquisizione delle immagini. I protoni "marcati" possono essere usati come un agente di contrasto endogeno per contrastare le immagini RM con il grado di perfusione locale. Infatti, visto che l'acqua del sangue si scambia continuamente con quella del tessuto (l'acqua viene considerata come se fosse completamente libera di diffondere), ne consegue che un'alterazione della magnetizzazione arteriosa si riflette in una concomitante alterazione della magnetizzazione tissutale, in funzione di quanto il tessuto è perfuso.

Nella tecnica DSC, invece, lo studio della perfusione si basa sull'induzione di disomogeneità del campo magnetico locale dovuta al passaggio di un bolo di mezzo di contrasto attraverso la rete capillare cerebrale. I parametri nello studio dell'emodinamica cerebrale sono: il flusso ematico cerebrale (CBF), il volume ematico cerebrale (CBV), che corrisponde alla quantità di sangue presente in una data quantità di tessuto in un dato momento, e il tempo medio di transito (Mean Transit Time, MTT) del mezzo di contrasto attraverso il tessuto. L'MTT è in base al teorema del volume centrale definito come il rapporto CBV/CBF .

Oltre i tre parametri principali -correlati tra loro dalla relazione $\text{flusso} \times \text{tempo di circolo (tempo medio di transito)} = \text{volume}$ - esistono altri parametri che vengono impiegati come indicatori di emodinamica principale: il tempo al picco della variazione del segnale dopo l'iniezione del mezzo di contrasto (tempo di picco), il tempo d'arrivo del mezzo di contrasto (mdc) in un voxel (tempo di arrivo), e l'ampiezza a metà del picco della curva che descrive la caduta di segnale nel tempo (Full width at half maximum, FWHM). Ognuno di questi parametri rappresenta un tentativo di stabilire cosa sta accadendo al tracciante e quindi al letto vascolare.

Come abbiamo detto i principi fisici di base sfruttati nell'esame sono le disomogeneità del campo magnetico prodotte da un mdc. Con i mezzi di contrasto attualmente in uso, i chelati di gadolinio, la base fisica risiede nell'imaging dinamico durante il primo passaggio del bolo dell'mdc. In condizioni normali il mezzo di contrasto non riesce a passare la barriera ematoencefalica (BEE), ma rimane confinato nel compartimento vascolare, dove cambia il T1

e il T2 del sangue. I suoi effetti si estendono anche allo spazio extravascolare circostante, a causa della suscettibilità magnetica e dello scambio di acqua tra sangue e tessuto.

Piuttosto che per i suoi effetti sul T1, comunque, i mezzi di contrasto vengono impiegati in virtù dei loro effetti sui tempi T2 e T2*. Il range ristretto di azione e gli effetti dipolo-dipolo convenzionalmente utilizzati per influenzare il contrasto in T1 dipendono da un accesso diretto del mezzo di contrasto alle molecole dell'acqua per alterare il segnale di RM. Nell'encefalo, in condizioni di barriera ematoencefalica intatta, questo accesso è limitato allo spazio intravascolare. Perciò, nel tessuto cerebrale normale, si riscontra un enhancement scarso o assente.

Per quanto riguarda invece i tempi di rilassamento T2 e T2*, il semplice scambio tra sangue e tessuto non comporta nessuna variazione. I cambiamenti di questi due tempi nei tessuti si hanno in seguito all'iniezione del mezzo di contrasto e sono dovuti al defasamento degli spin extravascolari nel campo non uniforme creato dalla differenza di suscettibilità magnetica tra i compartimenti vascolare ed extravascolare. Il campo magnetico B dipende sia dalla forza del magnete sia dai materiali che costituiscono il campione, come descritto dalla formula

$$B = B_0(1 + \chi)$$

dove χ è la suscettibilità magnetica del campione e B_0 è il campo magnetico in assenza del campione. Nei tessuti, χ ha un valore piccolo e negativo e B è minore di B_0 ; queste sostanze, con una suscettibilità magnetica negativa, sono dette diamagnetiche. Invece le sostanze con χ positivo sono dette paramagnetiche, con un valore di χ compreso tra 10^{-3} e 10^{-5} , o superparamagnetiche, con χ che dipende dalla forza del campo magnetico. Così i mezzi di contrasto utilizzati nello studio di perfusione cerebrale, per portare a variazioni del campo magnetico, devono essere paramagnetici o superparamagnetici.

Come detto, la presenza di un mezzo di contrasto nel letto vascolare induce una differenza di suscettibilità magnetica tra i compartimenti vascolare ed extravascolare che, in certe condizioni, è proporzionale alla concentrazione del mdc. A causa di questa differenza di suscettibilità il campo magnetico intorno ai vasi è disomogeneo e questo per una distanza quasi pari al raggio dei vasi. In questo modo la frequenza di risonanza, proporzionale al campo magnetico, varia all'interno di ciascun voxel.

Il segnale di risonanza $S(t)$ creato dall'impulso di radiofrequenza decresce con un tempo costante T2*, in accordo con la formula

$$S(t) = S_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{T2^*}\right)$$

dove S_0 è il segnale di intensità immediatamente dopo l'impulso di radiofrequenza.

Due fenomeni sono correlati con la variazione dei tempi di rilassamento T_2 e T_2^* in presenza di un campo statico disomogeneo associato alla presenza del mezzo di contrasto nei vasi sanguigni: in primo luogo le perturbazioni del campo magnetico accrescono l'eterogeneità della distribuzione di fase all'interno di ciascun voxel portando a un decadimento del segnale; in secondo luogo anche lo spostamento delle molecole d'acqua introduce un'attenuazione del segnale.

L'effetto di suscettibilità magnetica può in realtà essere determinato anche senza l'impiego di mezzi di contrasto: si tratta di quelle tecniche che si basano sui livelli ematici dell'ossigeno (Blood Oxygenation level dependent, BOLD) e quindi sfruttano come m.d.c l'emoglobina.

Il problema è che la modificazione dello stato di ossigenazione porta a variazioni della suscettibilità magnetica sia trascurabili, dell'ordine del 1% a 1,5T, sia non uniformi in tutto l'encefalo. Invece l'iniezione di un mezzo di contrasto paramagnetico o superparamagnetico può portare a una variazione del segnale del 20% o più in funzione della concentrazione del mdc.

Importante è anche la tecnica di iniezione del mezzo di contrasto. Esistono due motivi per cui è fondamentale per l'imaging di perfusione cerebrale che l'iniezione sia a bolo e rapida rispetto a un'infusione lenta. Prima di tutto, solo la forma concentrata di agenti a base di gadolinio possiede effetti sul T_2 significativi (a basse concentrazioni prevarrebbero effetti sul T_1 , che, come abbiamo già detto, portano a un enhancement scarso o assente avendo un range d'azione ristretto).

Il secondo motivo è correlato alla misurazione del flusso ematico cerebrale. Il volume ematico cerebrale può essere misurato anche in maniera soddisfacente utilizzando tecniche statiche; non si può dire lo stesso per la valutazione del CBF. Per la sua misurazione è infatti richiesta l'iniezione di un bolo di mezzo di contrasto e tanto più rapida è l'iniezione tanto migliore sarà il risultato. Idealmente sarebbe preferibile un bolo di contrasto infinitamente rapido: tuttavia l'ideale non è mai realizzabile. Per esempio, il bolo potrebbe essere più rapido se venisse eseguita un'iniezione intra-arteriosa; tuttavia ciò non è possibile nella pratica routinaria e per questo motivo si preferisce una precisione inferiore ma ottenuta con un approccio meno invasivo e più attuabile a livello clinico.

Di vitale importanza per una corretta valutazione è infine lo stato della barriera ematoencefalica. La BEE deve infatti essere intatta o solo minimamente alterata in modo tale che i mezzi di contrasto diventino a tutti gli effetti agenti intravascolari a livello del SNC. In caso contrario, i chelati di gadolinio raggiungerebbero l'equilibrio attraverso la BEE, entrando oltre che

nel compartimento vascolare anche in quello extravascolare.

Ciò determinerebbe due effetti contrapposti al meccanismo della suscettibilità magnetica da mezzo di contrasto: innanzitutto, si osserverebbe una riduzione della compartimentalizzazione, componente cruciale per l'imaging di perfusione; in secondo luogo, la presenza di molecole di gadolinio, anche in quantità minime, in ambiente extravascolare provocherebbe l'accorciamento del T1 e quindi un incremento del segnale del tessuto che non si trova dentro i vasi. Tutto ciò può indurre il medico a diagnosi cliniche errate. Poiché nelle neoplasie cerebrali la neoangiogenesi è una delle caratteristiche istologiche che sono alla base dell'alterazione della BEE, la tecnica utilizzata in PWI prevede di utilizzare un prebolo, cioè l'iniezione di una piccola quantità di mdc paramagnetico (2ml) al fine di 'saturare' il tessuto prima dell'iniezione del bolo in modo da misurarne le variazioni di suscettibilità a meno della alterazione di BEE.

La RM di perfusione offre alcuni particolari vantaggi rispetto alle altre metodiche di studio della perfusione, quali PET, SPECT e tecniche di tomografia computerizzata a raggi X. Innanzi tutto il rapporto segnale/rumore, superiore alle altre metodiche; poi la risoluzione spaziale, la disponibilità, la non esposizione dei soggetti ad alcuna forma di radiazione ionizzante e la rapidità di esecuzione dell'esame. Infine, e si tratta probabilmente di una caratteristica unica per lo studio di perfusione a RM, garantisce sensibilità per i piccoli vasi, assolutamente necessaria nel SNC, visto che la maggior parte delle patologie neurologiche possiede alcune correlazioni microvascolari.

Per quanto riguarda l'esecuzione della tecnica, dopo l'iniezione endovenosa di mdc, le immagini vengono acquisite con sequenze eco-planari (EPI) spin-eco (SE) o gradient-eco(GRE). La tecnica ecoplanare è basata sul riempimento del k-spazio in un unico TR facendo variare rapidamente il gradiente di codifica di fase. In tal modo è possibile acquisire una singola immagine in tempi rapidissimi dell'ordine dei millisecondi (100msec). Con tale tipo di sequenza è possibile ottenere acquisizioni multistrato con molte fasi per ciascun strato. Dopo questa prima acquisizione, si può iniziare la fase di elaborazione delle immagini, il post-processing.

Per determinare i parametri di perfusione cerebrale, quali il CBF, il CBV e l'MTT e le relative mappe, è necessario convertire le modificazioni dell'intensità del segnale di RM nel tempo in curve di concentrazione tissutale del mezzo di contrasto rispetto al tempo (fig. 3.5): infatti studi teorici ed empirici hanno dimostrato che il grado della caduta di segnale in un voxel dipende dalla quantità di mezzo di contrasto presente in tale voxel secondo la relazione:

$$\Delta R_2(t) \propto C_t(t)$$

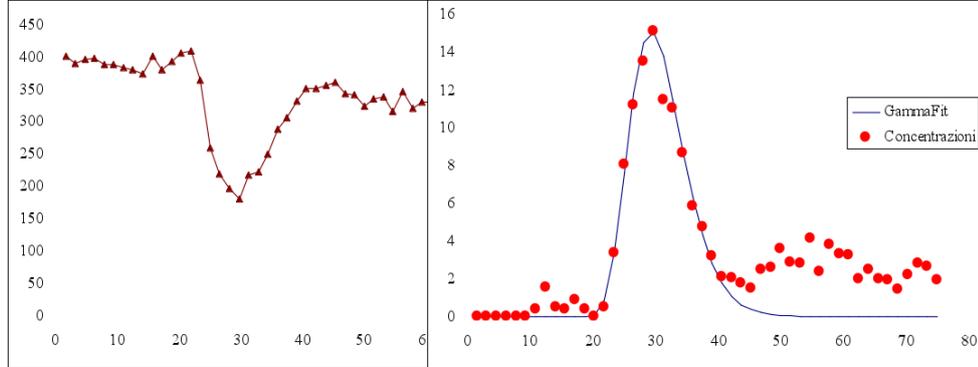


Figura 3.5: A sinistra è riportata la curva intensità di segnale in funzione del tempo. A destra è stata eseguita la conversione in curva concentrazione tempo (punti). La linea continua rappresenta la curva gamma derivata dai valori misurati per eliminare il ricircolo.

La conversione dei valori di intensità del segnale in valori di concentrazione, $C(t)$, avviene attraverso la relazione logaritmica:

$$C_{VOI}(t) = -\frac{K_{VOI}}{TE} \ln\left(\frac{S_{VOI}(t)}{S_0}\right)$$

dove $S(t_0)$ è l'intensità di segnale prima dell'arrivo del contrasto. Il volume ematico cerebrale CBV sarà la quantità di sangue distribuita nel letto capillare ad un determinato momento e sarà funzione della quantità di sangue che giunge al voxel come funzione di input arterioso secondo la relazione:

Ove C_a è la funzione di input arterioso detta AIF o arterial input function.

L'AIF viene calcolata ponendo una ROI (Region of Interest) in prossimità di una delle grandi arterie cerebrali che irrorano il tessuto interessato e fornisce informazioni sui tempi di passaggio del mezzo di contrasto in tali arterie.

L'AIF è molto importante per la misurazione del flusso cerebrale (CBF): infatti l'equazione sottostante descrive la relazione tra la concentrazione del mezzo di contrasto e l'input arterioso del tracciante:

$$CBS = \frac{CBV}{MTT}$$

Dove ρ è la densità del tessuto cerebrale, kh rende conto della differenza dell'ematocrito tra i capillari e i grandi vasi e $R(t)$ è la funzione residua di tessuto, cioè la frazione di tracciante ancora presente nel letto vascolare al tempo t dopo l'iniezione di tracciante nel vaso che lo alimenta.

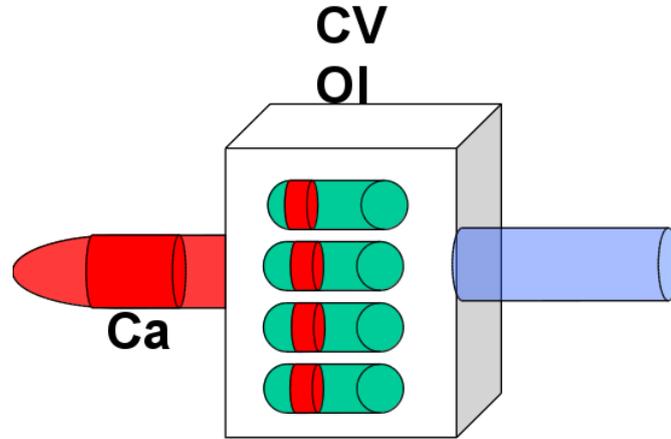


Figura 3.6: La quantità di sangue contenuta nel voxel distribuita nei capillari in esso contenuti è il CBV. Tale quantità dipende da Ca cioè dalla funzione di input arterioso.

Quindi per la creazione di mappe del CBF basta solo aggiungere due informazioni all'algoritmo del computer: in primo luogo, la definizione della ROI contenente l'AIF; in secondo luogo, la conoscenza del momento in cui termina il primo passaggio del mdc attraverso il tessuto, per evitare i disturbi legati al picco di ricircolo. Ma quale AIF scegliere? Teoricamente occorrerebbe misurare la funzione di input arterioso per ogni voxel. Essendo questo fisicamente impossibile ci accontentiamo di posizionare una ROI in corrispondenza di un vaso cerebroafferente come l'arteria cerebrale media. Solitamente si sceglie l'AIF per la regione di interesse clinico.

Per quanto riguarda l'MTT, la sua mappa è la più semplice da creare una volta realizzate le altre due, in base al teorema del volume centrale, cioè

$$CBF = \frac{CBV}{MTT}$$

Spesso capita di ritenere erroneamente che l'MTT coincida con l'ampiezza della curva di variazione del segnale a metà della sua variazione massima, o FWHM. Un modo molto semplice per comprendere perché l'FWHM non coincide con il tempo medio di transito consiste nel considerare cosa succederebbe se fossero presenti flusso e volume identici e se fosse somministrata la stessa quantità di mezzo di contrasto, ma venisse impiegata una diversa funzione di input arterioso, come nel caso di una minore velocità di iniezione o di una stenosi carotidea: in questo caso l'FWHM varierebbe anche se non variassero il CBV e il CBF.

La misurazione e la valutazione delle mappe dei parametri di perfusione cerebrale può essere effettuata in più regioni dell'encefalo e tali misurazioni possono essere comparate tra loro: ciò è possibile posizionando due o più diverse ROI, per esempio, nell'emisfero destro e in quello sinistro, in una sede di lesione e nella controlaterale[93][94][95][96][97][98][99].

La perfusione è piuttosto utile nello studio del GBM; infatti un'aumentata perfusione è evidente sia all'interno della lesione, a causa dell'ipermetabolismo tipico della neoplasia, che a livello delle regioni cerebrali dove la crescita tumorale abbia danneggiato la barriera emato-encefalica. Spesso è possibile rivelare un'incremento della perfusione che si estende anche al di fuori dell'alone iperintenso in T2 che circonda la lesione, un dato estremamente importante che delinea la reale estensione del tumore con maggior accuratezza rispetto alle sequenze pesate in T1 e T2. La perfusione contribuisce inoltre a caratterizzare l'aggressività e la malignità della neoplasia che risulta essere correlata alla neovascolarizzazione e all'iperplasia endoteliale[100]; il glioblastoma infatti presenta un maggior grado di perfusione essendo caratterizzati da una più spiccata neoangiogenesi.

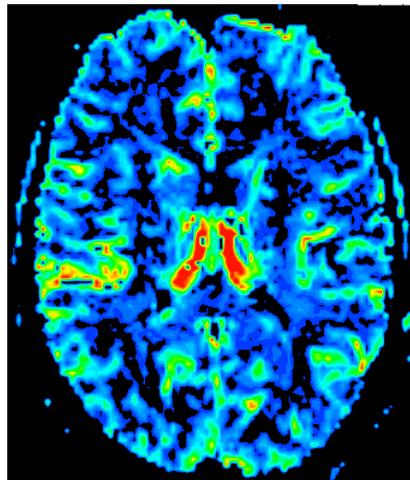


Figura 3.7: La quantità di sangue contenuta nel voxel distribuita nei capillari in esso contenuti è il CBV. Tale quantità dipende da Ca cioè dalla funzione di input arterioso.

3.3 Potenzialità dell'imaging nella valutazione della risposta alla terapia

La valutazione della risposta in materia neuro-oncologica è ancora oggi una questione estremamente dibattuta e irrisolta. I primissimi tentativi sono addirittura antecedenti agli anni '90, ovvero i criteri di Levin, che includevano nella valutazione della risposta mediante tecniche di imaging, una serie di parametri quali l'edema e l'effetto massa. A questi sono seguiti rapidamente i criteri di risposta definiti dalla WHO, che si basavano sull'esecuzione di una TAC con contrasto e sulla misurazione dell'area tumorale captante. La prima classificazione sistematica della risposta dei gliomi è stata operata da MacDonald che, negli omonimi criteri, ha introdotto la misurazione bidimensionale della lesione captante il contrasto all'imaging convenzionale, unitamente a due parametri clinici quali la dose di corticosteroidi e la disabilità neurologica. La valutazione quantitativa dell'area captante attraverso il metodo del prodotto dei diametri perpendicolari, presenta delle importanti limitazioni, prima fra tutte l'aspecificità della captazione del contrasto, che oltre a essere influenzata dalla terapia corticosteroidica e antiangiogenica, riflette anche uno svariato numero di condizioni non neoplastiche. Le aree cerebrali che sono soggette a ischemia, modificazioni post-chirurgiche, radionecrosi, o infiammazione conseguente al trattamento si accompagnano infatti a un aumento della captazione di gadolinio[101][102][103][104]. Negli ultimi anni l'avanzamento tecnologico e la recente affermazione della terapia molecolare, con la necessità di monitorare radiologicamente gli effetti dell'inibizione della vasculogenesi, ha reso necessaria l'ideazione dei criteri RANO (Response Assessment in Neuro-Oncology)[72]. La novità è stata introdurre nella valutazione le sequenze T2 pesate, che permettono di evidenziare la presenza di componenti lesionali non captanti, un reperto di frequente riscontro quando la componente infiltrativa del tumore prevale su quella vascolare[106]. È noto che la terapia anti-angiogenica sbilanci il rapporto tra queste due componenti favorendo il pattern infiltrativo ed è stato ipotizzato che questa modalità di crescita avvenga attraverso il reclutamento di una rete microvascolare persistente, senza essere influenzata dalla riduzione della permeabilità vascolare determinata dal bevacizumab[107][108]. Nei criteri RANO inoltre si è cercato di discriminare la ripresa della malattia dalla pseudo-progressione, che si manifesta come un aumento precoce e transitorio della captazione tumorale, rilevabile in oltre il 20% dei pazienti sottoposti a regime radio-chemioterapico standard[72].

Un'altra importante applicazione dell'imaging è stata il tentativo di predire l'andamento della neoplasia e di definirlo per mezzo di appositi end-point quali l'OS e il suo surrogato PFS[109][110]. La finalità è quella di ricercare

nell'imaging convenzionale e non, dei biomarker in grado di discriminare specifiche caratteristiche associate alla prognosi. Data la limitata sopravvivenza dei pazienti con diagnosi di GBM è cruciale identificare, tra i trattati, coloro che possano giovare a lungo termine di una determinata terapia dai restanti pazienti che, divenendo non responsivi, beneficerebbero invece di un aggiustamento o della sostituzione della terapia inadeguata. Per quanto riguarda l'imaging convenzionale la misurazione dell'area tumorale captante il contrasto risulta essere più accurata della misurazione delle lesioni non captanti: i tentativi di incorporare le sequenze FLAIR nei criteri di predicibilità correlano peggio con i tassi di PFS e di risposta obiettiva rispetto agli studi che prendono in considerazione le sole aree captanti, in pazienti con recidiva di GBM[105]. D'altra parte uno studio che ha analizzato una coorte di pazienti in procinto di ricevere Bevacizumab per progressione di GBM, ha dimostrato come, all'esame pre-trattamento, il rapporto tra la lesione documentata alla FLAIR e l'area captante il contrasto nella sequenze T1 sia invece predittivo sia di sopravvivenza globale che di progressione libera da malattia[111].

L'avvento dell'imaging non convenzionale ha costituito un punto di svolta e innovazione sia nel campo della diagnostica che nell'analisi della risposta alla terapia. Lo scopo di questa tesi è appunto l'utilizzo delle diverse tecniche di imaging non convenzionale al fine di valutare e predire la risposta alla terapia in pazienti con recidiva di glioblastoma.

In ultimo bisogna ricordare che un elemento imprescindibile nella valutazione della risposta alla terapia, in accordo ai parametri non solo di OS ma anche di qualità della vita, è costituito dalla clinica, che riflette in modo oggettivo il beneficio della terapia percepito dal paziente.

Capitolo 4

Parte sperimentale

4.1 Scopo

Come abbiamo appena visto, i dati presenti in letteratura suggeriscono la potenzialità delle tecniche non convenzionali di RM di caratterizzare e predire il comportamento del GBM.

Sulla base di questi presupposti, lo scopo del nostro lavoro è stato quello di stabilire se le tecniche di imaging a RM non convenzionali, ovvero la perfusione e la diffusione, possano costituire un marker radiologico predittivo di risposta alla terapia di seconda linea (Bevacizumab) in pazienti con recidiva di GBM.

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 Criteri di selezione dei pazienti

Da una popolazione di 44 pazienti con diagnosi di recidiva di glioblastoma sottoposti ad esami RM nel periodo da luglio 2008 a febbraio 2014, è stata selezionata retrospettivamente una coorte di 24 pazienti (8 donne e 16 uomini; età media 58 anni, range di età 37-73 anni) che avessero i seguenti requisiti:

- Diagnosi istologica di glioblastoma ottenuta su pezzo operatorio o su biopsia stereotassica eseguita presso il nostro centro
- Esame RM completo di sequenze convenzionali senza e con mdc ev attestante la recidiva di malattia ed esame di DWI o PWI immediatamente antecedenti l'inizio della terapia con bevacizumab
- Trattamento chemioterapico di seconda linea con Bevacizumab (7,5 o 10mg/kg) in combinazione con TMZ metronomica o Fotemustina

- Almeno un esame RM completo di sequenze convenzionali senza e con mdc ev ed esame di DWI o PWI successivo all'inizio della terapia della recidiva

Per quanto riguarda l'imaging non convenzionale di questi pazienti selezionati 9 possedevano solo il DWI, 1 paziente solo il PWI e 14 pazienti presentavano entrambi gli esami PWI e DWI pesati.

Tutti i pazienti hanno eseguito nel nostro istituto il primo esame diagnostico di Risonanza Magnetica con l'ausilio delle tecniche non convenzionali, prima di essere sottoposti a chemioterapia di salvataggio.

Dopo un arco temporale in media pari a 3.5 mesi con deviazione standard di 1.6, la coorte in studio ha eseguito una seconda RM per valutare l'andamento della malattia e la risposta al protocollo terapeutico. I pazienti sono stati sottoposti a follow-up con esami di RM periodici, fino all'uscita dallo studio per exitus, trasferimento in altri centri terapeutici o scadimento delle condizioni generali tali da non permettere l'esecuzione dell'esame.

Si segnala che due pazienti inclusi nello studio hanno effettuato controlli RM durante un periodo di sospensione della terapia farmacologica rispettivamente di 4 e 11 mesi per l'insorgenza di ipertensione arteriosa, quale effetto collaterale; la somministrazione del chemioterapico è stata quindi ripristinata alla normalizzazione del quadro clinico.

La coorte in studio è stata suddivisa in due gruppi, rispettivamente di Responder e Not Responder in funzione della sopravvivenza globale (OS) dal momento della recidiva, stabilendo come cut off un valore di sopravvivenza pari a 9.1 mesi, in accordo con i dati della letteratura[38].

4.2.2 Protocollo di acquisizione RM

Tutti i pazienti hanno eseguito un protocollo RM con apparecchio a 1.5 T (Signa HDX General Electric Health Care) con bobina dedicata phased array 8 canali. Dopo una scansione scout di centraggio triplanare sono state acquisite:

Sequenze convenzionali

Sono state acquisite le sequenze volumetriche mostrate in tabella:

	TR (ms)	TE (ms)	TI (ms)	FOV (cm)	T_k (mm)	spacing	NEX	matrix
FLAIR CUBE	8000	132	2231	25	1.2	0	1	224x224
assiali FSE T2 pesate	3750	122		22	4	1	2	256x512
assiale SE T1	383	12		22	4	1	2	192x325
3D SWAN	78.30	47.89		22	3		0.69	224x288
SPGR T1 pesate	7.56	3.44	22	25.6	1.2		1	256x256

Tabella 5 Inventarsi una didascalia ☺

Dopo somministrazione di mdc ev sono state ottenute immagini volumetriche ad elevata risoluzione con sequenze SPGR T1 pesate e in fase tardiva sono state ripetute le scansioni assiali SE T1 pesate suddescritte.

DWI

Prima della somministrazione di mdc ev sono state acquisite scansioni SE/EPI sequence (TR 8000, TE 100, FOV 22 cm, thickness 4 mm, spacing 1.0 mm, NEX 2, matrix 96 x 96) implementate con gradienti sensibilizzati alla diffusione ($b = 0.1000$ s/mm²) lungo i tre assi principali x, y e z.

PWI

Sequenza assiale EPI GRE (TR 1500 msec, TE 50 msec, FA 90, FOV 22 cm, tk 4mm, spacing 1.0 mm, matrix 96 x 96, 40 fasi per fetta, 18 fette e tempo di acquisizione di 1.14 min) lungo l'asse bicommissurale. L'iniezione del bolo di mdc (chelato di gadolinio alla dose fissa 14 mL) è cominciata dopo il completamento della decima acquisizione alla velocità di 5 mL/s per un totale di 14 mL usando un accesso endovenoso da 18 Gauge connesso ad un iniettore automatico Spectris Medrad. Prima dell'acquisizione PWI si è somministrato un prebolo di 2 mL di chelato di gadolinio endovena e si sono attesi circa 3 minuti prima della somministrazione del bolo per la PWI al fine di compensare l'alterazione di barriera emato-encefalica presente in alcune neoplasie.

Elaborazione ed analisi delle immagini: analisi radiologica qualitativa Imaging convenzionale: Le immagini convenzionali sono state valutate da un unico operatore che ignorava i risultati delle tecniche non convenzionali e la suddivisione dei pazienti nei gruppi responder e Not Responder.

Per ciascun paziente sono state valutate le seguenti caratteristiche della neoplasia:

- Captazione contrastografica
- Margini della neoplasia

- Effetto massa
- Presenza di componenti non captanti il contrasto
- Necrosi
- Emorragia
- Caratteristiche del segnale
- Edema perifocale

Mediante il confronto tra immagini di RM acquisite in tempi successivi, tenendo conto dei suddetti parametri, l'operatore ha espresso un giudizio soggettivo inerente l'andamento temporale della neoplasia. Sono stati espressi un 'giudizio radiologico locale' ed una 'giudizio radiologico generale'. Il giudizio radiologico locale formulava l'andamento nel tempo, dopo la terapia con bevacizumab, della recidiva di neoplasia, il giudizio radiologico generale formulava invece l'andamento nel tempo, dopo la terapia con bevacizumab, del quadro encefalico, indipendentemente dalla risposta della neoformazione recidivata. La scala del punteggio è stata creata arbitrariamente in multipli di 1 e l'attribuzione del punteggio, sulla base dei parametri indicati in tabella, è stata la seguente:

- Il punteggio di +1 è stato attribuito quando il confronto tra due esami consecutivi dimostrasse un tangibile miglioramento del quadro
- Il punteggio 0 è stato assegnato a un quadro radiologico che nel complesso è rimasto stabile
- Il punteggio di -1 è stato attribuito a un quadro radiologico che dimostrasse un netto peggioramento rispetto all'esame precedente. Ogni giudizio espresso in termini numerici va poi a sommarsi allo score ottenuto dalle precedenti osservazioni

Giudizio Radiologico Locale

Score	<i>quadro peggiorato</i> -1	<i>quadro stazionario</i> 0	<i>quadro migliorato</i> +1
Captazione contrastografica	Aumentata	Stabile	Ridotta
Necrosi	Aumentata, frammista a lesione carnosa	Stabile	Ridotta/Assente
Emorragia	Aumentata	Stabile	Ridotta/Assente
Edema	Aumentato	Stabile	Ridotto/Assente

Tabella 6 Scala di valutazione del quadro radiologico locale utilizzata per RM convenzionale

Giudizio Radiologico Generale

Score	<i>quadro peggiorato</i> -1	<i>quadro stazionario</i> 0	<i>quadro migliorato</i> +1
Effetto massa	Aumentato, dislocazione strutture della linea mediana	Stabile	Ridotto, rientro in asse delle strutture della linea mediana
Lesioni non captanti	Insorte ex novo o gliomatosis cerebri	Stabile	Ridotte/Assenti
Lesioni captanti	Aumentate in numero o in dimensione	Stabile	Ridotte/Assenti

Tabella 7 Scala di valutazione del quadro radiologico generale utilizzata per RM convenzionale

Analisi clinica qualitativa Al fine di dare una valutazione clinica della evoluzione e della storia naturale della eteroplasia, è stato chiesto al clinico incaricato del follow up dei pazienti di formulare un proprio giudizio soggettivo circa il loro status. Il procedimento adottato è stato quello di elaborare una scala di valutazione semi-quantitativa che tenesse conto principalmente del Performance Status, espresso con l'indice del KPS (*Karnofsky performance status*) e dell'adeguamento della dose di corticosteroidi somministrata, come indicato in letteratura dai criteri RANO[72]. Il clinico è stato invitato ad esprimere un giudizio con una prospettiva temporale, operando un confronto relativo tra le condizioni cliniche del paziente riscontrate in una determinata visita e quelle riscontrate nella visita precedente, con le stesse modalità illustrate per la valutazione radiologica.

Giudizio Clinico

Score	<i>quadro peggiorato</i> -1	<i>quadro stazionario</i> 0	<i>quadro migliorato</i> +1
Dose di corticosteroidi	Notevolmente aumentata	Immodificata o lievemente ridotta / aumentata	Notevolmente ridotta o nulla
KPS	Riduzione $\geq 10\%$ rispetto al precedente	Stabile	Aumento $\geq 10\%$ rispetto al precedente
Sintomatologia e status neurocognitivo	Peggioramento o insorgenza di sintomi non attribuibili ad altre cause	Stabile	Miglioramento

Tabella 8 Scala di valutazione clinica.

4.2.3 Elaborazione ed analisi delle immagini: analisi radiologica quantitativa

DWI: Le immagini ottenute con gradienti di diffusione sono state ricostruite e rappresentate in forma isotropa. Successivamente, mediante l'utilizzo di una

workstation (ADW 4.4) e di un software (Functool) dedicati è stato eseguito il calcolo delle mappe di ADC mediante l'applicazione della seguente formula:

$$ADC = \frac{1}{b} \ln \left(\frac{S(T_2)}{S(b)} \right)$$

Un singolo operatore, all'oscuro dei risultati delle immagini convenzionali, dei risultati delle restanti tecniche non convenzionali e della distinzione dei pazienti nei rispettivi gruppi, ha posizionato sulla mappa di diffusione ottenuta dall'esame RM antecedente l'inizio della terapia (T_0 o esame al momento della recidiva), una regione di interesse (ROI) in corrispondenza della componente neoplastica con più basso valore di ADC. La ROI di forma circolare è stata disegnata avendo attenzione di mantenere la sua superficie tra 26 e 32 mm^2 e di non comprendere nella selezione aree necrotiche o altre componenti tissutali non neoplastiche; per ogni ROI sono stati misurati i valori di ADC e la relativa deviazione standard (DS). In caso di GBM multicentrico è stata apposta una ROI nella componente a più basso ADC di ogni area tumorale captante il mdc ev e, successivamente, calcolata la media del valore lesionale per poterla utilizzare come appartenente ad un singolo soggetto nell'analisi statistica. Nelle mappa di ADC ottenuta dall'esame cronologicamente successivo (T_1 o primo esame dopo l'inizio della terapia con bevacizumab) è stato accuratamente ricercato il punto in cui è stata posizionata originariamente la ROI al T_0 . Una volta riconosciuta l'area di interesse è stata posizionata in uguale modo una seconda ROI a livello lesionale. Questo procedimento è stato poi applicato a tutte le mappe di ADC relative a esami RM temporalmente successivi.

PWI: Per la creazione delle mappe è stata utilizzata una workstation dedicata ADW 4.4. Per ogni pixel la curva temporale del segnale è stata trasformata in una curva di concentrazione in funzione del tempo e su queste sono state calcolate le mappe. Per ottenere la funzione residua, e da questa il CBF, si deve deconvolvere la AIF dalla curva tissutale. L'AIF è stata generata in modo manuale posizionando una ROI nel parenchima adiacente l'arteria cerebrale media dell'emisfero non affetto dalla neoplasia. Per ottenere le mappe di rCBV è stato eseguito il fitting della curva di concentrazione e di risposta al primo passaggio con gamma variata e si è proceduto all'integrale della curva ottenuta.

$$CBV_{rel} = \int C(t) dt.$$

Un singolo operatore, ignaro dei risultati delle immagini convenzionali, dei risultati delle restanti tecniche non convenzionali e delle ripartizione dei pazienti nei diversi gruppi ha posizionato una regione di interesse (ROI) in corrispondenza della componente neoplastica con più alto valore di rCBV

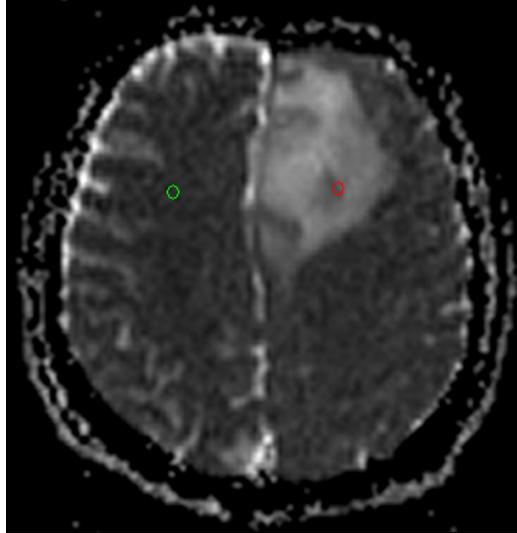


Figura 4.1: In rosso è rappresentata la ROI posizionata nella componente neoplastica con più basso valore di ADC.

orientandosi con la scala colorimetrica, che prevede il colore rosso per i valori di rCBV più elevati ed il blu per i valori di rCBV più bassi; nella ROI sono stati misurati inoltre i valori di rCBV e la relativa deviazione standard. In caso di GBM multicentrico è stata apposta una ROI in ogni area tumorale captante e, successivamente, calcolata la media del valore lesionale per poterla utilizzare nell'analisi statistica. In ugual modo a quanto descritto precedentemente nella rilevazione dell'ADC, la posizione della ROI presa al T_0 è stata attentamente ricercata nelle mappe di perfusione successive.

4.2.4 Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata effettuata con l'ausilio del software Stat-Soft sulle differenti misurazioni delle variabili quantitative continue ADC e rCBV. Di ogni insieme di valori quantitativi è stata calcolata la media e la deviazione standard. I valori di ADC e rCBV sono stati misurati a T_0 ed è stata calcolata la loro variazione a T_1 rispetto a T_0 ; l'analisi di inferenza statistica è stata effettuata tramite test di Mann-Whitney per valori parametrici non accoppiati. I grafici di dispersione delle variabili ADC e rCBV nel gruppo dei Responder e dei Not Responder sono stati rappresentati mediante scatterplot e boxplot e sono stati realizzati tramite il software Statistica. Il Boxplot riporta il valore della mediana, i valori del 25^o e 75^o percentile e gli estremi dei valori minimo e massimo della variabile. L'accuratezza diagnostica nel predire la risposta alla terapia delle variabili ADC e rCBV è stata misurata attraverso l'analisi

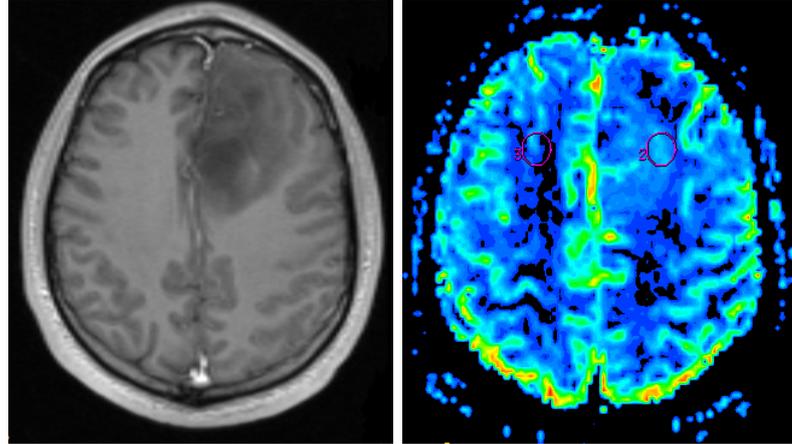


Figura 4.2: A sinistra vediamo l'immagine RM convenzionale di un glioma. A destra la mappa colorimetrica di perfusione con una ROI posizionata sulla lesione.

dell'area sottesa dalla curva ROC (Relative Operating Characteristic), per il calcolo di un valore di cut-off che rappresenta il miglior compromesso associato alla massima sensibilità e specificità del modello. Nella costruzione delle curve ROC sono stati considerati come veri positivi i soggetti Not Responder correttamente identificati (sensibilità del test); viceversa i soggetti adeguatamente classificati come Responder costituiscono i veri negativi (specificità del test).

4.3 Risultati

Come descritto in precedenza i pazienti sono stati suddivisi sulla base della sopravvivenza globale nei gruppi di Responder e Not Responder, in accordo a quanto riportato in letteratura[38]. È stata inoltre condotta un'analisi di inferenza statistica riguardo la differenza dell'intervallo temporale $T_0 - T_1$ nei soggetti appartenenti ai due gruppi, che non è risultata statisticamente significativa ($p = 0.41$).

4.3.1 Analisi Qualitativa

Quadro radiologico generale: Rispetto a T_0 , al T_1 il quadro radiologico generale è peggiorato in 8 su 11 Not Responder, stazionario in 2 e migliorato in 1. Nello stesso periodo, nei Responder il quadro radiologico generale è migliorato in 10 su 12, stazionario in 2 e peggiorato in nessun caso. In figura 4.3 è riportato l'andamento del quadro radiologico generale nei Responder

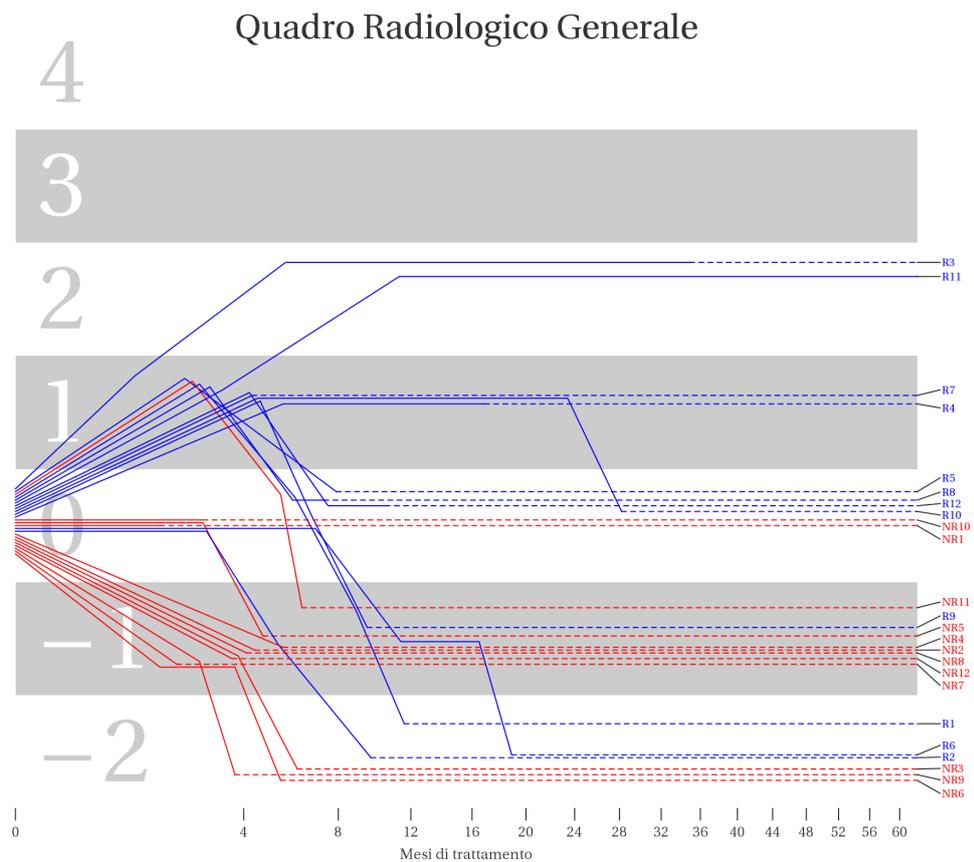


Figura 4.3: Illustrazione del quadro radiologico generale. I colori blu e rosso indicano l'appartenenza al gruppo rispettivamente dei Responder e dei Not Responder. La linea continua indica l'arco temporale a partenza dal T_0 in cui il paziente è stato sottoposto a follow-up; la linea tratteggiata è fatta risalire all'ultimo controllo effettuato prima dell'uscita in studio del paziente. In ascisse sono riportati i mesi, in ordinate il giudizio qualitativo del quadro.

(blu) e nei Not Responder (rosso) durante tutto il periodo di follow-up. Complessivamente il gruppo dei pazienti Responder dimostra avere un'iniziale e protratto miglioramento generale, seguito dopo un periodo variabile di tempo da declino del quadro, mentre i Not Responder si caratterizzano per un immediato peggioramento del quadro generale documentabile all'imaging.

Quadro radiologico locale: Rispetto a T_0 , al T_1 , nel gruppo dei Not Responder il quadro radiologico locale è peggiorato in 12 lesioni su 21, stazionario in 1 e migliorato in 8 lesioni su 21. Nello stesso periodo, nei Responder il quadro radiologico locale è migliorato in 11 lesioni su 12, stazionario in 1 e peggiorato in nessun caso. In figura 4.4 è riportato l'andamento del quadro radiologico locale nei Responder (blu) e nei Not Responder (rosso) durante tutto il periodo di follow-up. Nei 6 casi di GBM multicentrico 1 paziente Responder e 2 Not Responder presentano lesioni con andamento concordante, mentre i restanti 3 pazienti Not Responder presentano lesioni con comportamento dissociato. In questi ultimi si è osservato come la maggioranza numerica delle lesioni peggiori, mentre sono poche le lesioni che presentano un locale miglioramento.

Quadro Clinico: il giudizio clinico nell'intervallo T_0 - T_1 attesta: Nei Responder un miglioramento clinico in 2 casi e un quadro clinico stazionario nei restanti 10. Nei Not Responder un miglioramento clinico è avvenuto in 1 caso, un peggioramento in 4 casi, e un quadro clinico stazionario nei restanti 8.

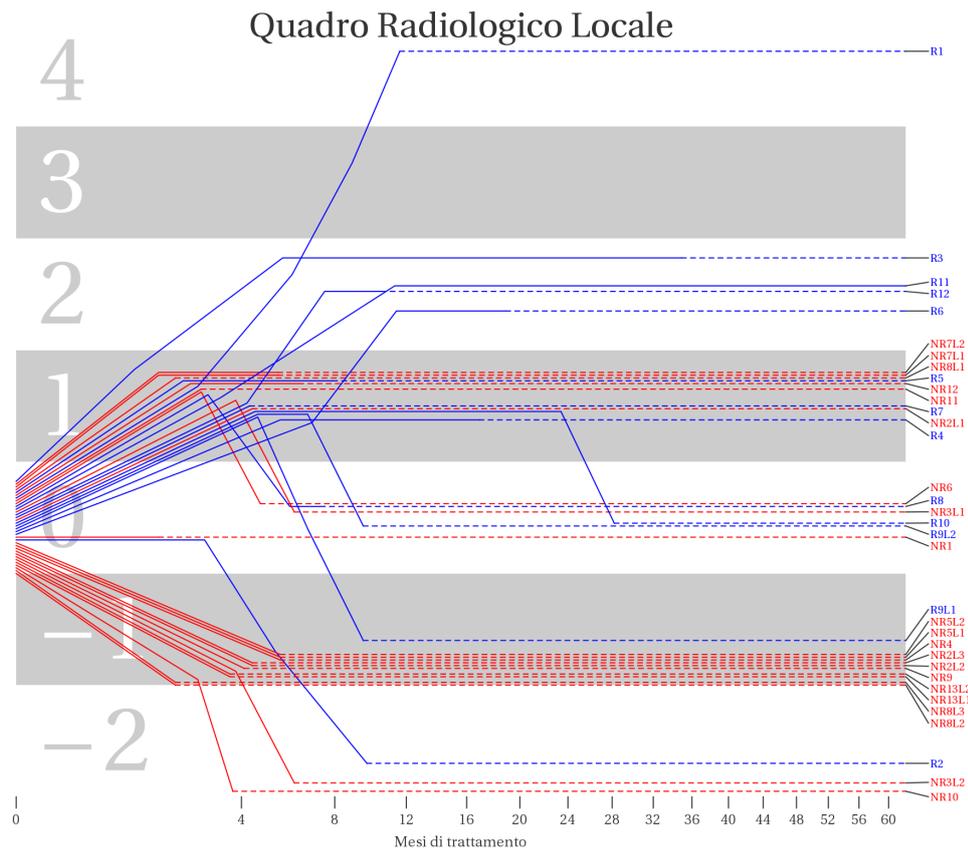


Figura 4.4: Illustrazione del quadro radiologico locale. I colori blu e rosso indicano l'appartenenza al gruppo rispettivamente dei Responder e dei Not Responder. La linea continua indica l'arco temporale a partenza dal T_0 in cui il paziente è stato sottoposto a follow-up; la linea tratteggiata è fatta risalire all'ultimo controllo effettuato prima dell'uscita in studio del paziente. Nei casi di GBM multicentrico è stata rappresentata ciascuna lesione, numerata ordinalmente. In ascisse sono riportati i mesi, in ordinate il giudizio qualitativo del quadro.

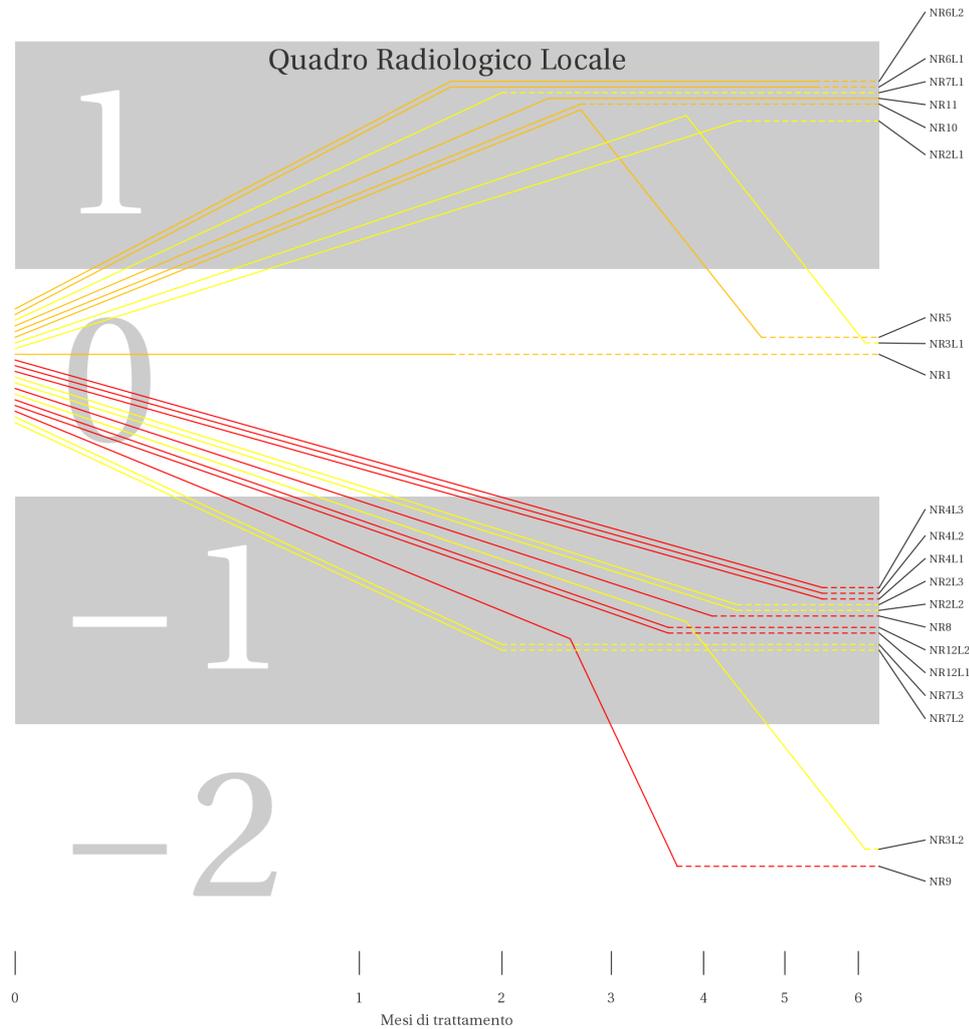


Figura 4.5: Illustrazione del quadro radiologico locale nei pazienti Not Responder. Il colore rosso è stato attribuito a pazienti le cui lesioni omogeneamente peggiorino; il colore ocra a pazienti le cui lesioni concordemente migliorino; il colore giallo a pazienti le cui lesioni mostrino un andamento discorde. La linea continua indica l'arco temporale a partenza dal T_0 in cui il paziente è stato sottoposto a follow-up; la linea tratteggiata è fatta risalire all'ultimo controllo effettuato prima dell'uscita in studio del paziente. Nei casi di GBM multicentrico è stata rappresentata ciascuna lesione, numerata ordinalmente. In ascisse sono riportati i mesi, in ordinate il giudizio qualitativo del quadro.

4.3.2 Risultativi Quantitativi

Imaging DWI-pesato: Lo studio nelle mappe di diffusione è stato realizzato in un totale di 23 pazienti, di cui 12 classificati come Responder e 11 appartenenti ai Not Responder. **L'ADC al T_0 :** prima dell'inizio del trattamento di seconda linea, ha presentato un valore medio superiore nel gruppo dei Not Responder con una differenza tra i due gruppi che è risultata statisticamente significativa ($p = 0.03$). L'ADC dei Responder ha evidenziato, infatti, una media pari a $0.000900 \text{ mm}^2/s$ con DS di 0.00021 mentre nell'altro gruppo il valore medio di ADC è risultato essere di $0.00106 \text{ mm}^2/s$ con DS di 0.00016.

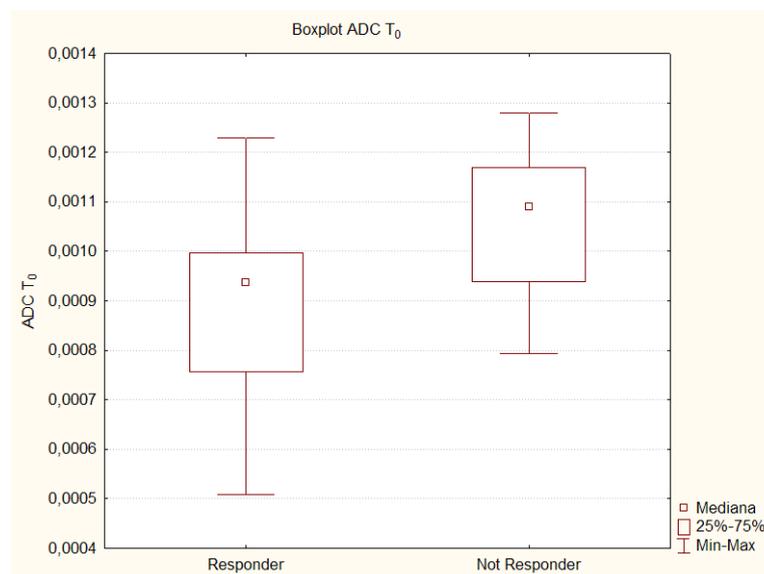


Figura 4.6: Boxplot della variabile ADC calcolata al T_0 . In ordinate è indicato il valore dell'ADC espresso in mm^2/s nei due gruppi, rispettivamente Responder e Not Responder.

È stata inoltre effettuata l'analisi mediante curva ROC della variabile ADC rilevata al T_0 , da cui è stato calcolato il valore soglia capace di classificare correttamente il 78.26% dei soggetti: i pazienti che presentano un valore di ADC è $\geq 0,001022 \text{ mm}^2/s$ secondo il suddetto modello sono da considerarsi Not Responder. La sensibilità e la specificità associate al classificatore risultano rispettivamente pari a 72.73% e 83.33%.

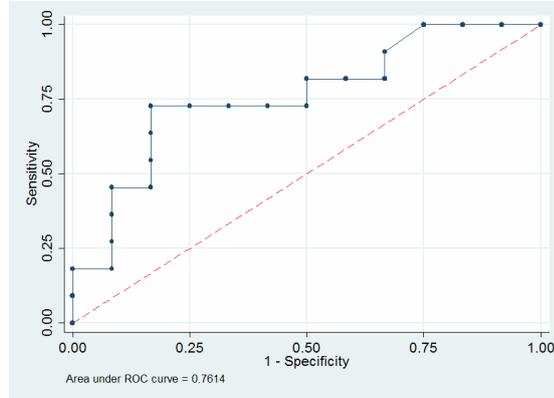


Figura 4.7: Curva ROC della variabile ADC rilevata al T_0 . In ordinate è riportata la sensibilità, mentre l'asse delle ascisse corrisponde al valore (1-specificità). La linea tratteggiata in rosso indica un classificatore per il quale l'area sottesa è pari a 0.50 e la cui performance è pari a quella di un classificatore casuale. La curva blu indica la curva ROC del classificatore. L'area sottesa dalla curva blu indica la probabilità di un dato valore di essere correttamente classificato nel gruppo di appartenenza.

ADC al T_1 : La misurazione dell'ADC relativa al primo esame RM effettuato dall'inizio della terapia ha rilevato che non ci sono differenze statisticamente significative ($p = 0.26$) tra i valori che la variabile assume nei due gruppi di pazienti. Il valore medio dell'ADC nei Responder è risultato pari a $0.00106 \text{ mm}^2/s$ con DS di 0.00032 mentre nel gruppo dei Not Responder la media è stata di $0.00102 \text{ mm}^2/s$ con DS di 0.00019.

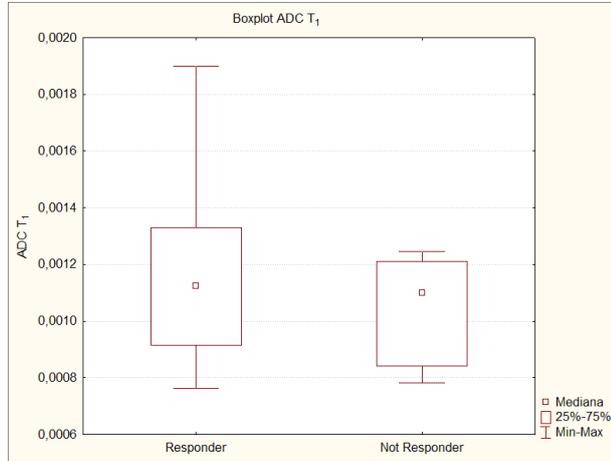


Figura 4.8: Boxplot della variabile ADC calcolata al T_1 . In ordinate è indicato il valore dell'ADC espresso in mm^2/s nei due gruppi, rispettivamente Responder e Not Responder

Variazione percentuale ADC T_1-T_0 : è stata condotta un'ulteriore analisi relativa alla variazione percentuale del valore assunto dall'ADC nell'intervallo T_1-T_0 :

$$\Delta_{\%}ADC = \frac{ADCT_1 - ADCT_0}{ADCT_0} \cdot 100$$

, che ha dimostrato una differenza nei due gruppi statisticamente significativa ($p = 0.0004$). La variazione media percentuale dell'insieme dei Responder è pari a 31.63% con DS di 25.27 mentre il gruppo dei Not Responder riporta una variazione di -4.04% con DS di 10.43.

La curva ROC (figura 4.10) della variazione percentuale dell'ADC ha consentito il rilevamento del valore soglia di 10.05%, che consente di stratificare correttamente il 91.30% dei pazienti nei differenti gruppi con sensibilità pari a 90.91% e specificità di 91.67%.

È stato realizzato uno Scatterplot (figura 4.11) del modello al fine di evidenziare come il classificatore ottenuto consenta di discriminare correttamente i valori tra i due gruppi con alta accuratezza diagnostica, come previsto dal modello.

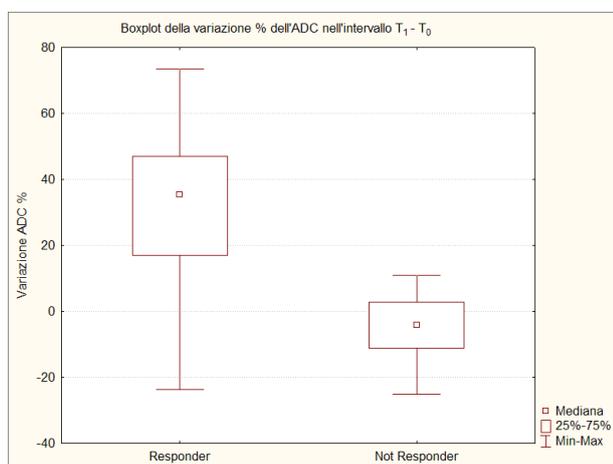


Figura 4.9: Boxplot della variazione percentuale dell'ADC calcolato nell'intervallo $T_1 - T_0$. In ordinate è indicato il valore della variazione percentuale dell'ADC nei due gruppi, rispettivamente Responder e Not Responder.

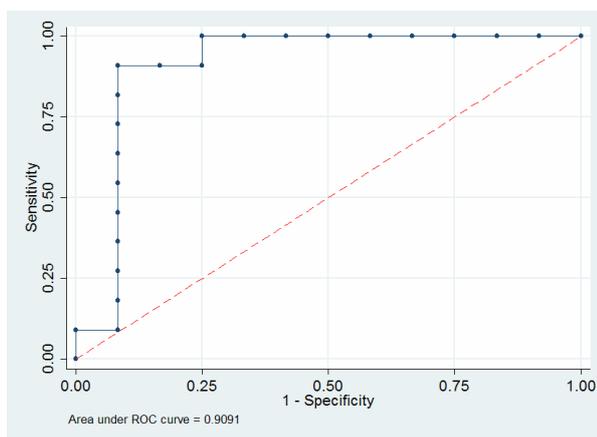


Figura 4.10: Curva ROC della variazione percentuale della variabile ADC nell'intervallo $T_1 - T_0$. In ordinate è riportata la sensibilità, mentre l'asse delle ascisse corrisponde al valore (1-specificità).

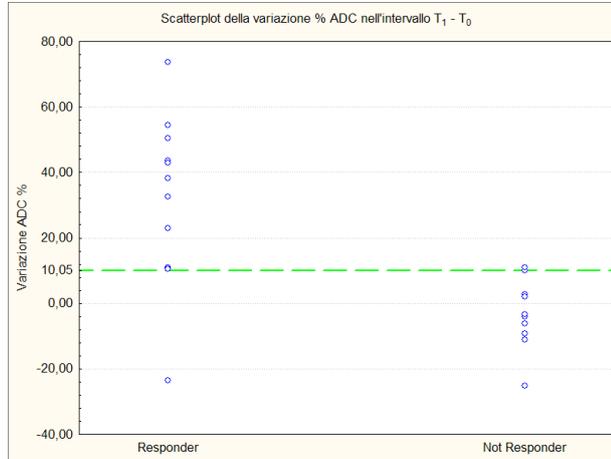


Figura 4.11: Scatterplot della variazione percentuale dell'ADC calcolata nell'intervallo $T_1 - T_0$. In ordinate è indicato il valore della variazione percentuale dell'ADC, mentre in ascisse è riportata la suddivisione nei due gruppi, rispettivamente Responder e Not Responder. La linea tratteggiata in verde corrisponde al cut-off point del classificatore.

Imaging PWI-pesato: lo studio delle mappe di perfusione è stato realizzato in 15 pazienti, dei quali 7 avevano i requisiti per essere considerati Responder e 8 per essere classificati come Not Responder.

rCBV al T_0 : Lo studio della distribuzione dei valori del rCBV nei due gruppi, a differenza di quanto osservato precedentemente con l'ADC, non ha mostrato una differenza statisticamente significativa al T_0 ($p = 0.28$). La media dell'insieme dei Responder è stata di 2085.36 con DS di 1082,64, mentre i Not Responder presentavano media di 2515.35 e DS di 933.16.

In maniera analoga alla variabile ADC, si è provveduto a valutare la capacità discriminativa del rCVB al T_0 effettuando un'analisi mediante curva ROC (figura 4.13) che ha identificato il valore soglia di 2299.75, capace di classificare correttamente il 73.33% dei soggetti. La sensibilità e specificità associate al test sono risultate rispettivamente pari al 75% e 71.43%.

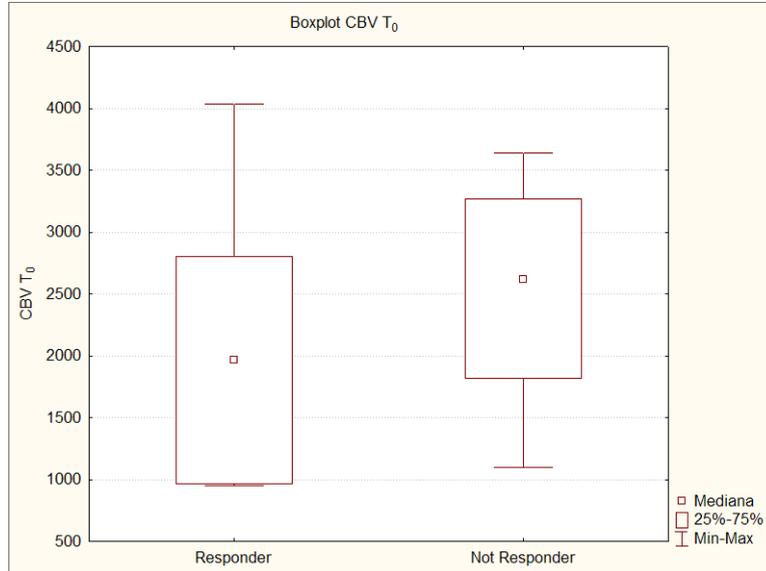


Figura 4.12: Boxplot della variabile rCBV calcolata al T_0 . In ordinate è indicato il valore del rCBV nei due gruppi, rispettivamente Responder e Not Responder.

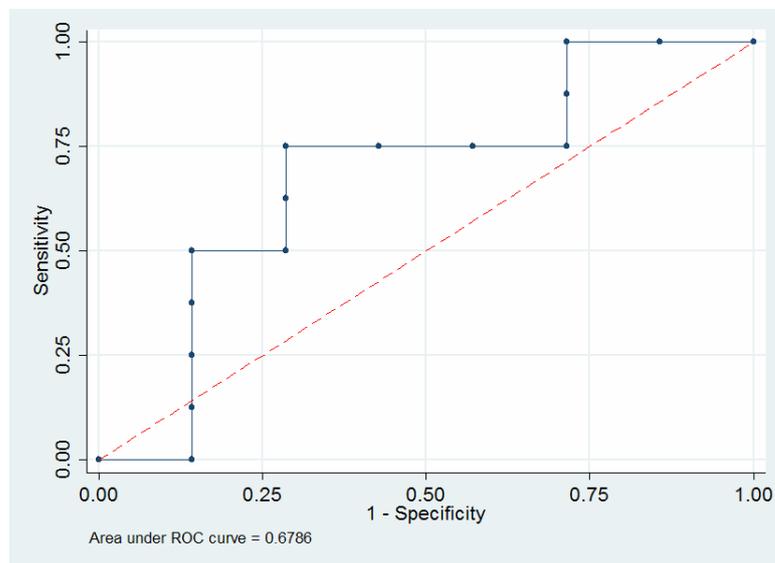


Figura 4.13: Curva ROC della variazione percentuale della variabile rCBV al T_0 . In ordinate è riportata la sensibilità, mentre l'asse delle ascisse corrisponde al valore (1-specificità).

rCBV al T_1 : al tempo T_1 , i valori del rCBV invece assumono una distribuzione nettamente diversa nei due gruppi, con una differenza statisticamente significativa ($p = 0.04$); i valori della media e della deviazione standard sono rispettivamente pari a: 858.9 e 772.1 nei Responder e 2426.56 e 1373.89 nei Not Responder.

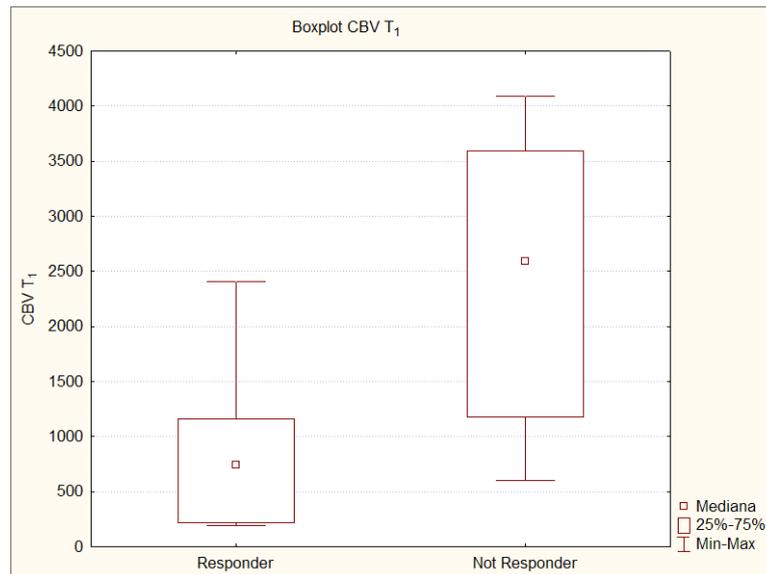


Figura 4.14: Boxplot della variabile rCBV calcolata al T_1 . In ordinate è indicato il valore del rCBV espresso in nei due gruppi, rispettivamente Responder e Not Responder

Variazione percentuale rCBV T_1-T_0 : come per l'ADC si è provveduto all'analisi statistica della variazione percentuale assunta dalla variabile

$$rCBV = \frac{rCBVT_1 - rCBVT_0}{rCBVT_0} \cdot 100$$

nel medesimo arco temporale T_1-T_0 . Anche in questo caso i risultati dei due gruppi differiscono in modo statisticamente significativo ($p = 0.01$). L'insieme dei Responder presenta una media pari a -60.4% e DS di 25.74 mentre i pazienti Not Responder riportano una media della variabile esaminata pari a -8.85% e DS di 36.85.

Mediante analisi con curva ROC (figura 4.16) si è ricercato il cut off in grado di predire la corretta classificazione dei pazienti nell' 86.67% dei casi, con sensibilità pari al 100% e specificità del 71.43%. Il calcolo del valore soglia ha dato come risultato -54.84%.

Lo scatterplot della variazione percentuale del rCBV (figura 4.17) rappresenta graficamente la reale distribuzione dei valori della variabile nei due

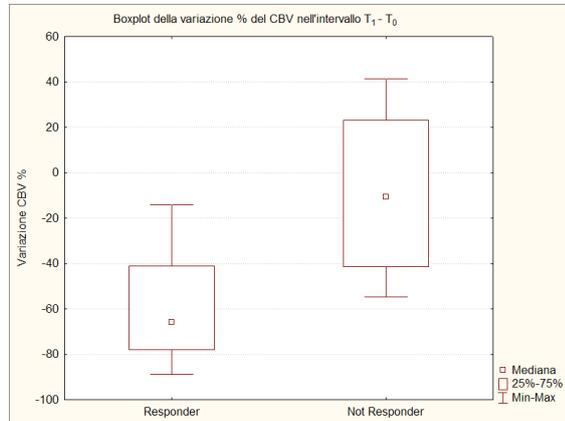


Figura 4.15: Boxplot della variazione percentuale del rCBV calcolato nell'intervallo $T_1 - T_0$. In ordinate è indicato il valore della variazione percentuale del rCBV nei due gruppi, rispettivamente Responder e Not Responder.

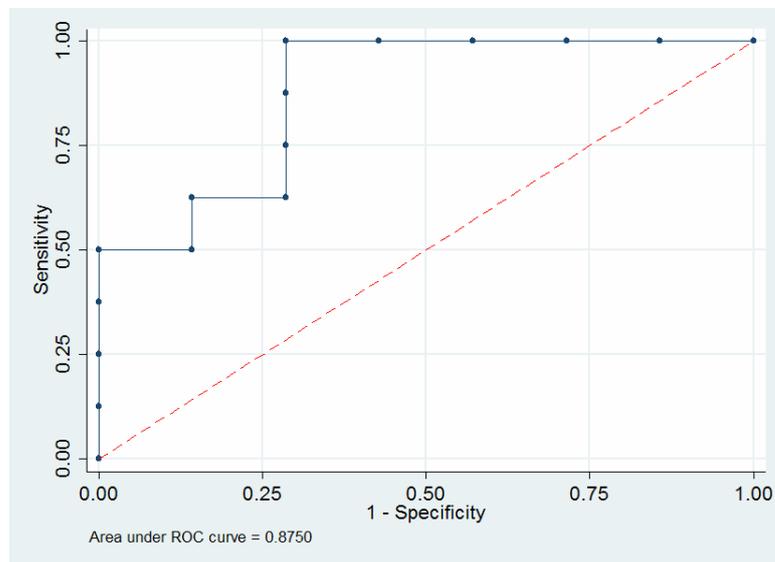


Figura 4.16: Curva ROC della variazione percentuale della variabile rCBV nell'intervallo $T_1 - T_0$. In ordinate è riportata la sensibilità, mentre l'asse delle ascisse corrisponde al valore (1-specificità).

gruppi e consente di osservare la distribuzione ottenuta mediante l'ausilio del classificatore calcolato dall'analisi con curva ROC.

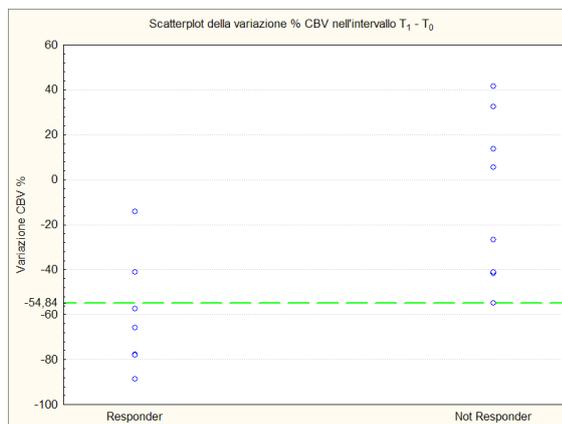


Figura 4.17: Scatterplot della variazione percentuale del rCBV calcolato nell'intervallo $T_1 - T_0$. In ordinate è indicato il valore della variazione percentuale del rCBV, mentre in ascisse è riportata la suddivisione nei due gruppi, rispettivamente Responder e Not Responder. La linea tratteggiata in verde corrisponde al cut-off point del classificatore.

Nel sottoinsieme dei 14 pazienti aventi entrambi gli esami RM non convenzionali, sia di diffusione che di perfusione, si è sperimentata la combinazione dei due modelli di variazione percentuale, rispettivamente della variabile ADC e rCBV, ottenendo un terzo modello caratterizzato da una maggiore accuratezza diagnostica (92.8%). Se come classificatori delle variabili si utilizzano i valori soglia ottenuti nelle precedenti curve ROC un soggetto che presenti una coppia di valori di ADC e rCBV classificati in modo concorde nel gruppo dei Non Responder, sarà un vero Not Responder nel 100% dei casi; lo stesso si può affermare nel caso in cui entrambi i valori della variazione percentuale dell'ADC e rCBV classifichino il soggetto come Responder (figura 4.18).

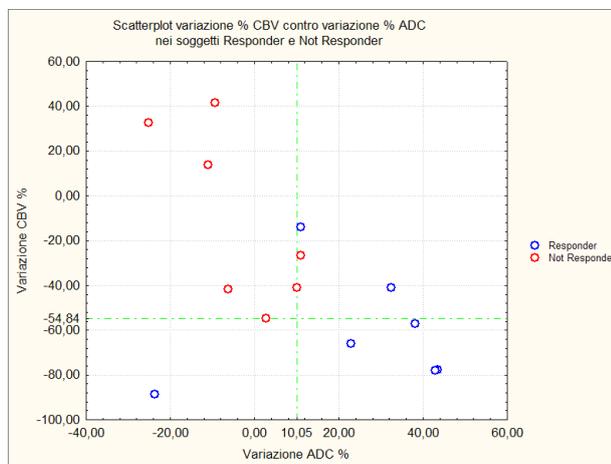


Figura 4.18: Scatterplot della variazione percentuale del rCBV e dell'ADC calcolati nell'intervallo $T_1 - T_0$. In ordinate è indicato il valore della variazione percentuale del rCBV, mentre in ascisse è riportata la variazione percentuale dell'ADC; i colori blu e rossi identificano rispettivamente i Responder e i Not Responder. Le linee tratteggiate in verde corrispondono al cut-off point del classificatore dell'ADC (linea verde verticale) e rCBV (linea verde orizzontale).

4.4 Discussione

Dalla valutazione qualitativa dell'imaging convenzionale si possono trarre importanti considerazioni: il quadro radiologico generale conferma come i pazienti Responder mostrino sin dal primo follow-up delle caratteristiche semiologiche che attestano il miglioramento o quantomeno la stazionarietà del quadro radiologico. Viceversa i Not Responder presentano prevalentemente un peggioramento del quadro già individuabile al primo esame RM di controllo. Utilizzando il quadro radiologico generale a T_1 come predittore di risposta alla terapia si ottiene una accuratezza di 0.75. La stratificazione del rischio prognostico sulla base del quadro radiologico è stata sostenuta a lungo da alcuni autori[112][113], sebbene altrettanti studi abbiano evidenziato una mancata correlazione[74][38].

Sebbene l'accuratezza della risposta alla terapia nel nostro studio sia abbastanza elevata, occorre tenere presente che la valutazione del quadro radiologico generale resta comunque, soggettiva, operatore dipendente e quindi influenzata dall'esperienza del lettore. Nel nostro studio non è stata effettuata una misurazione dell'accordo intra ed inter osservatore, ma si può comunque presumere che la riproducibilità di un metodo di analisi soggettiva sia bassa. Il quadro radiologico generale indipendentemente dall'appartenenza al gruppo dei Responder o dei Not Responder è invariabilmente progredito in tutti i pazienti meno in 4 pazienti. I pattern di progressione descrivibili in entrambi i gruppi sono stati i seguenti:

- Progressione locale captante il contrasto, rilevabile in 6 pazienti, di cui 3 Responder e 3 Not Responder;
- Progressione a distanza captante il contrasto, identificata in un solo Not Responder;
- Progressione multifocale sia distanza che locale, identificata in 4 pazienti Not Responder.
- Diffusione leptomeningea, ritrovabile in un solo paziente Not Responder;
- Progressione diffusa non captante il contrasto, documentata in 5 Responder e 3 Not Responder.

In quest'ultimo pattern si assiste a un decremento della captazione e dell'edema imputabile all'effetto anti-vascolare del farmaco, ed al contemporaneo sviluppo tumorale per via infiltrativa, che si documenta mediante le sequenze FLAIR pesate. Il pattern di progressione non captante il contrasto costituisce il 40% delle osservazioni, e costituisce un dato molto

dibattuto in letteratura, in quanto molti studi concordano con quanto da noi riportato[112][113][114][115][116], mentre altri si trovano in sostanziale disaccordo[38]. Nei casi di pattern di progressione con captazione è verosimile che la lesione neoplastica non risenta adeguatamente dell'azione farmacologica e ciò esita in un drammatico peggioramento del quadro radiologico. In entrambi i casi, sia che la recidiva avvenga a livello locale sia che evolva in un quadro di gliomatosis cerebri la prognosi diviene infausta e la sopravvivenza media si attesta intorno ai 3mesi, in sostanziale accordo a quanto riportato in altri studi[38].

La valutazione del quadro radiologico locale non è di facile interpretazione. Seppur nella nostra casistica non esista un peggioramento del quadro radiologico locale nei pazienti responder, questa possibilità non è da escludersi a priori e richiederebbe in prima istanza la distinzione della componente tumorale dalla pseudo-progressione. La pseudo-progressione infatti si caratterizza per un incremento transitorio dell'area neoplastica dovuto a necrosi tumorale, edema e infiammazione secondaria e si rileva nel 13-32% dei pazienti, in particolare in coloro che presentano la metilazione dell'enzima MGMT[117]. La presenza di pseudoprogressione può quindi abbassare la capacità dell'imaging convenzionale di predire la risposta o la non risposta del paziente alla terapia di secondo livello.

Occorre inoltre tenere presente che la valutazione del quadro radiologico locale in sé non è sufficiente per predire la risposta al farmaco in quanto vi sono pazienti che pur essendo Not Responder presentano una buona risposta locale a T_1 .

L'andamento clinico risulta non predittivo di risposta, così come riportato in uno studio simile[38], in quanto al T_1 soltanto due responder su 12 presentavano un miglioramento clinico, e solo 4 Not Responder su 12 mostravano un peggioramento.

4.4.1 Valutazione quantitativa dei risultati delle tecniche di imaging non convenzionali

ADC al T_0 : La differenza nei valori dell'ADC calcolati nei due gruppi al T_0 è risultata statisticamente significativa e dall'analisi dei dati si rileva che i Responder presentano un valore di partenza dell'ADC più basso dei Not Responder. Un valore più basso di ADC si correla a una maggiore cellularità, e non è possibile escludere che un tumore caratterizzato da un elevato indice mitotico e conseguente alta cellularità sia maggiormente pronò a rispondere drasticamente alla terapia, in analogia ad altre eteroplasie quali ad esempio il mesotelioma. Uno studio recente ha messo a confronto due coorti di pazienti con recidiva di GBM e ha riscontrato che il valore dell'ADC al T_0 era predittivo di OS nel braccio dei pazienti trattati con Bevacizumab, mentre

non costituiva un biomarker di predizione nel gruppo di pazienti non trattati con Bevacizumab[118]. Il danno da irradiazione quali la gliosi, la fibrosi, l'invasione macrofagica e cambiamenti vascolari o demielinizzazione devono essere tenuti in conto nella valutazione, in quanto abbassano significativamente l'ADC[119], ma sembra improbabile che tali fenomeni abbiano assunto una diversa distribuzione nei due gruppi al momento della recidiva.

ADC al T_1 : L'evidenza che i valori della variabile ADC calcolata al T_1 risultino non significativamente diversi nei due gruppi è un dato che risulta in sostanziale accordo con la letteratura, in quanto ad oggi nessuno studio ha messo a punto un biomarker di risposta fondato sull'analisi di questo parametro.

Variazione percentuale dell'ADC nell'intervallo T_1 - T_0 : l'accuratezza diagnostica pari al 91,30% del modello predittivo basato sulla variazione percentuale della variabile ADC rende ragione dell'importanza di questo dato. Dato che il valore di ADC a T_1 non è significativamente diverso nei Responder e nei Not Responder, la variazione percentuale dell'ADC amplifica le differenze di ADC tra Responder e Not Responder che sono già presenti al T_0 . Si potrebbe ipotizzare che la misura di ADC più che misurare l'effetto della terapia sul tumore, esprima una potenzialità alla risposta terapeutica che è tanto maggiore quanto più alto è l'ADC.

Diversi studi in letteratura hanno proposto la variazione percentuale di ADC come biomarker di risposta anche se la tecnica di analisi delle mappe di ADC era differente. Tali studi possono essere divisi in due gruppi a seconda della metodica di analisi utilizzata: l'analisi a istogrammi del volume tumorale[120][121][122][124] e le mappe di ADC a sottrazione volumetrica[124][125]. La prima tecnica offre il vantaggio di una misurazione oggettiva e globale dell'area lesionale, che è selezionata dalle sequenze FLAIR o T_1 pesate al fine di includere l'intera area tumorale non captante e captante il contrasto. Lo svantaggio più rilevante consta nell'eterogeneità del tessuto incluso nella valutazione volumetrica, che offre soltanto la possibilità di rielaborare un valore medio di ADC senza consentire un'analisi dettagliata delle diverse variazioni dell'ADC all'interno dell'area di interesse, che riflettono a loro volta le disuguali modificazioni istologiche all'interno del tessuto neoplastico. Nel volume di indagine entrano quindi componenti neoplastiche tissutali, ma anche cistico necrotiche o emorragiche con conseguente 'inquinamento' dei valori di ADC. La seconda tecnica è stata concepita con l'intento di evitare una media dei valori dell'ADC come avviene nell'analisi a istogrammi, e si basa sulla misurazione, nello stesso paziente, delle differenze della variabile ADC nel tempo. Utilizzando immagini volumetriche convenzionali a T_0 e T_1 si crea una mappa di sottrazione che costituisce la maschera su cui si misureranno le differenze di ADC. Con le DWI ottenute a T_0 e T_1 si crea una mappa di ADC di

differenza che può essere coregistrata alla maschera. Questo permette l'analisi quantitativa della variazione dell'ADC in ogni sezione dell'area lesionale. Il principale difetto che è insito nel procedimento appena descritto consiste nell'impossibilità di controllare le modificazioni morfologiche e quindi le distorsioni dell'anatomia che si verificano dopo l'inizio della terapia. L'effetto massa e il dislocamento delle strutture della linea mediana sono reperti di frequente riscontro nei tumori di alto grado, le cui modalità di crescita sono spesso compressive; il bevacizumab determinerebbe infatti un cambiamento del pattern di crescita del tumore da compressivo a infiltrativo, esitando in un rientro in asse delle strutture della linea mediana e una riespansione di quelle compresse[107][108]. Il nostro approccio definito a ROI ha voluto evitare appositamente le problematiche menzionate (di media di valori di ADC e di distorsione a tempi diversi) ma al tempo stesso presenta delle importanti limitazioni, prima fra tutte l'operatore dipendenza in quanto il posizionamento della ROI è soggetto a una discreta variabilità inter-operatore, così come la ricerca dello stesso punto nelle mappe di diffusione successive. Nel complesso tutte le metodiche si sono rivelate in grado di predire la risposta in termini di OS o PFS e di stratificare la coorte di pazienti in Responder e Not Responder, utilizzando differenti biomarker quali la Skewness negli istogrammi[126] o la media dell'ADC nelle regioni captanti e non captanti[125].

Il comune denominatore di questi sistemi è la valutazione della variazione assunta dall'ADC nel tempo intercorso tra T_0 e T_1 , che a prescindere da ogni tecnicismo, rimane un concetto estremamente valido dal quale non si può prescindere nell'ambito della valutazione prognostica.

rCBV al T_0 : Non è stata trovata una differenza statisticamente significativa del valore del rCBV calcolato nei due gruppi al T_0 , nonostante vi sia uno studio che ha dimostrato che un determinato valore cut off del rCBV consenta di stratificare dal punto di vista prognostico l'OS dei pazienti; in dettaglio un valore superiore al cut-off si assocerebbe a una sopravvivenza inferiore ai 300giorni dal momento della recidiva e viceversa[127]. Tuttavia il procedimento tecnico dello studio consisteva nella misurazione del valore di rCBV medio della regione captante, delineata mediante una mappa di sottrazione delle sequenze T_1 pesate. Sebbene alcuni studi basati sull'analisi con istogrammi riportino che alti livelli di rCBV pre-trattamento si associno a una scarsa risposta alla terapia anti-angiogenica[128], la questione diviene complicata in quanto altrettante evidenze suggeriscono che il valore del rCBV non sia correlabile alla variazione dello stesso parametro nell'intervallo T_1-T_0 [127].

rCBV al T_1 : il valore che il rCBV assume al primo controllo risulta essere inferiore nei gruppo dei Responder rispetto ai Not Responder e costituisce un dato che è in sostanziale accordo con quanto riportato in letteratura[127]. La spiegazione più plausibile di quanto osservato risiede nella maggiore efficacia

dell'azione del farmaco in qualità di antineoangiogenetico nei Responder, che determina un maggior decremento del valore del rCBV, rispetto a quanto non faccia nei Not Responder. La possibilità di stratificare dunque i pazienti sulla base del valore del rCBV riportato al T_1 costituisce un'evidenza non trascurabile nella valutazione prognostica dei pazienti, sia in termini di OS, come da noi dimostrato, sia come PFS, come evidenziato in altri studi[127].

Variazione percentuale del CBV nell'intervallo T_1-T_0 : la valutazione di questo parametro è cruciale nel monitorare la risposta al Bevacizumab. In accordo con altre sperimentazioni[128], la riduzione del valore del rCBV in entrambi i gruppi è infatti imputabile al rapido effetto anti-vascolare del farmaco, che agisce come un potente steroide; d'altra parte il maggior decremento della variabile osservato nel gruppo dei Responder potrebbe riflettere l'azione anti-tumorale del Bevacizumab, che si palesa dopo una più lunga latenza. Diversi studi correlano la variazione del CBV con il rischio di morte[127], e la variazione del volume di iperperfusione (Hyperperfusion volume, HPV), ovvero la frazione del tumore con un CBV maggiore di una determinata soglia, con il Time to Progression (TTP)[129]. Tuttavia il raffronto delle metodiche risulta essere ancora una volta di difficile esecuzione in quanto i procedimenti di acquisizione e analisi dell'immagine differiscono notevolmente gli uni con gli altri, presentando le problematiche già esposte nella discussione inerente la variabile ADC; inoltre la maggioranza degli studi di perfusione esaminano un intervallo temporale T_1-T_0 più ristretto, la cui conseguenza potrebbe essere quella di inficiare la comparazione dei risultati ottenuti in ciascun studio.

Variazione percentuale dell'ADC e CBV nell'intervallo T_1-T_0 : Nel nostro studio dimostriamo come, quando concordi, la combinazione delle variazioni percentuali dell'ADC e rCBV incrementino in modo notevole l'accuratezza diagnostica. Nel caso in cui entrambi i valori di ADC e rCBV mostrino una variazione percentuale concorde per uno dei due gruppi, si giunge al 100% di predicibilità nel formulare un corretto giudizio prognostico del campione in esame.

Limitazioni: Il principale limite dello studio è l'operatore dipendenza che interferisce sia nella scelta della ROI al T_0 che nella ricerca e conseguente posizionamento della ROI negli esami RM successivi; per limitare al massimo la soggettività di analisi un "inter-operative agreement" potrebbe richiedere una seconda interpretazione dei dati da parte di un altro operatore, ugualmente all'oscuro della suddivisione dei pazienti. Inoltre la popolazione campionaria risulta costituita da un numero ristretto di pazienti e dunque il modello presentato in questo studio necessita di essere validato in una coorte più numerosa. La difficoltà riscontrata nel reclutare un maggior numero di pazienti è imputabile a due fattori: in primis lo studio è di singolo centro, inoltre

il trattamento con bevacizumab risulta non autorizzato dall'AIFA (Agenzia italiana del farmaco) e dunque approvato in via sperimentale esclusivamente nei centri di ricerca di Pisa e Torino.

4.5 Conclusioni

Le metodiche di RM convenzionali e non convenzionali risultano essere di strategica importanza nel formulare un corretto giudizio prognostico in pazienti con recidiva di GBM. Mentre le sequenze T1 e T2 pesate orientano il radiologo circa l'andamento e l'evoluzione della neoplasia, i parametri studiati nelle mappe di diffusione e di perfusione consentono di predire la sopravvivenza globale del paziente (OS) con alta accuratezza diagnostica, e dunque di adattare al meglio la terapia medica nel rispetto delle esigenze di ogni singolo paziente.

Capitolo 5

Elenco delle abbreviazioni

GBM: Glioblastoma Multiforme
RM: Risonanza Magnetica
DWI: Diffusion Weighted Imaging
PWI: Perfusion Weighted Imaging
CBV: Cerebral Blood Volume
rCBV: relative Cerebral Blood Volume
ADC: Apparent Diffusion Coefficient
 T_0 : Tempo 0
 T_1 : Tempo 1
OS: Overall Survival
WHO: World Health Organization
TC: Tomografia Computerizzata
RT: Radioterapia
TMZ: Temozolomide
MGMT: 06-Metil-Guanina-DNA-Metil-Transferasi
PFS: Progression-Free Survival
PS: Performance Status
FDA: Food and Durg Administration
VEGF: Vascular Endotelial Growth Factor
VEGFR: Vascular Endotelial Growth Factor Receptor
HIF: Hypoxia Inducible Factor
EGF: Epidermal Growth Factor
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
HR: Hazard Ratio
IC: Intervallo di Confidenza
PGF: Placental Growth Factor
RTOG: Radiation Therapy Oncology Group
EMA: European Medicine Agency

IFP: Intratumoral Fluid Pressure
PDGF: Platelet Derived Growth Factor
PDGFR: Platelet Derived Growth Factor Receptor
EORTC: European Organization Research Treatment
mTor: mammalian Target of rapamycin
AEF: alternating electric field
TTP: Time to Progression
SE: Spin-Echo FSE: Fast Spin-Echo TSE: Turbo Spin-Echo FLAIR: Fluid Attenuated Inversion Recovery IA: Ipertensione Arteriosa
PET: Tomografia ad Emissione di Positroni
BEE: Barriera emato-encefalica SPECT: Tomografia ad Emissione di Singoli Fotoni
ASL: Arterial Spin Labeling
CBF: Cerebral Blood Flow MTT: Mean Transit Time DSC: Dynamic Susceptibility Contrast-enhanced
MDC: Mezzo di Contrasto FWHM: Full width at half maximum AIF: Arterial Input Function
BOLD: Blood Oxygenation level dependent ROI: Region of Interest
KPS: Karnofsky Performance Status
RANO: Response Assessment in Neuro-Oncology Criteria
ROC: Receiver operating characteristic
DS: Deviazione Standard
AIFA: Agenzia italiana del farmaco

Bibliografia

- [1] Cotran, Cumar, Collins: Robbins *Le basi patologiche delle malattie*. Piccin Nuova Libreria, 2000
- [2] MacCabe J.J.: *Glioblastoma in Vinken PJ, Bruyn GW (eds) Handbook of Clinical Neurology*. Vol 18. pp 49-71, 1975
- [3] A.H. Ropper, R. H. Brown: *Adams and Victor's Principles of Neurology*. McGraw Hill, cap.31, 2005
- [4] Antonio Omuro, Lisa DeAngelis: *Glioblastoma and other malignant gliomas A clinical review*. JAMA 6;310(17):1842-50, 2013
- [5] Stephen M. Sagar, Mark A. Israel: *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw Hill, cap.375, 1999
- [6] Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Jouvett A, Scheithauer BN, Kleihues P: *The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. Acta Neuropathol, 114: 97-109, 2007
- [7] Bailey P, Cushing H: *Classification of Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlation Study of Prognosis*. Lippincott: Philadelphia, 1926
- [8] Ohgaki H, Biernat W, Reis R, Hegi M, Kleihues: *Gliosarcoma*. In Kleihues P, Cavenee WK, eds . *Pathology and genetics of tumours of the nervous system, World Health Organization classification of tumours*. IARC Press, Lyon, 2000
- [9] CBTRUS statistical report: *Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009*. NeuroOncol.2012;14(suppl5):v1-v49. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C.

- [10] Hottinger AF, Khakoo Y: *Update on the management of familial central nervous system tumor syndromes*. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2007; 7(3): 200-207.
- [11] Linos E, Raine T, Alonso A, Michaud D: *Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis*. *J Natl Cancer Inst*. 2007; 99(20): 1544-1550
- [12] Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, et al: *Brain Tumor Epidemiology Consortium. Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium*. *Cancer*. 2008; 113(7)(suppl): 1953-1968.
- [13] Pearce MS, Salotti JA, Little MP, et al: *Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study*. *Lancet*. 2012; 380(9840): 499-505.
- [14] Huber R, Treyer V, Schuderer J, et al: *Exposure to pulse-modulated radiofrequency electromagnetic fields affects regional cerebral bloodflow*. *Eur J Neurosci*. 2005; 21(4): 1000-1006.
- [15] Volkow ND, Tomasi D, Wang GJ, et al: *Effects of cell phone radio-frequency signal exposure on brain glucose metabolism*. *JAMA*. 2011; 305(8): 808-813.
- [16] Corle C, Makale M, Kesari S. : *Cell-phones and glioma risk: a review of the evidence*. *J Neurooncol*. 2012; 106(1): 1-13.
- [17] Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, et al; Cancer Genome Atlas Research Network: *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1*. *Cancer Cell*. 2010; 17(1): 98-110.
- [18] Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, et al: *Molecular subclasses of high-grade glioma predict Prognosis , delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis*. *Cancer Cell*. 2006; 9(3): 157-173.
- [19] Chaichana, KL, Jusue-Torres, I et al: *Establishing percent resection and residual volume thresholds affecting survival and recurrence for patients with newly diagnosed intracranial glioblastoma*. *NEURO-ONCOLOGY* 2014; 16(1): 113-122

- [20] Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al: *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005,352:987-996
- [21] Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al: *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. N Engl J Med, 2005,352:997-1003.
- [22] Hottinger AF: *Standards of care and novel approaches in the management of glioblastoma multiforme*. Chin J Cancer; 2014; Vol. 33 Issue 1: 32-39
- [23] Keime-Guibert F, Chinot O, Taillandier L, et al: *Radiotherapy for glioblastoma in the elderly*. N Engl J Med, 2007,356:1527-1535
- [24] Malmstrom A, Gronberg BH, Marosi C, et al: *Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2012,13:916-926
- [25] Wick W, Platten M, Meisner C, et al: *Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2012,13:707-715
- [26] Huang H, Held-Feindt J, Buhl R, et al: *Expression of VEGF and its receptors in different brain tumors*. Neurol Res, 2005,27:371-377
- [27] Friedman HS, Prados MD, Wen PY, et al: *Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma*. J Clin Oncol. 2009;27:4733-4740
- [28] Kreisl TN, Kim L, Moore K, et al: *Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma*. J Clin Oncol.2009;27:740-745
- [29] Gilbert MR, Dignam J, Won M, et al: *RTOG 0825: phase III double-blind placebo-controlled trial evaluating bevacizumab in patients with newly diagnosed glioblastoma*. J Clin Oncol.2013;31(suppl):1.
- [30] Wick W, Cloughesy TF, Nishikawa R, et al: *Tumor response based on adapted Macdonald criteria and assessment of pseudoprogression (PsPD) in the phase III AVAglio trial of bevacizumab (Bv) plus temozolomide (T) plus radiotherapy (RT) in newly diagnosed glioblastoma (GBM)*. J Clin Oncol.2013;31(suppl):2002.

- [31] Wick A, Felsberg J, Steinbach JP, et al: *Efficacy and tolerability of temozolomide in an alternating weekly regimen in patients with recurrent glioma*. J Clin Oncol. 2007;25(22):3357-3361.
- [32] Scoccianti S, Detti B, Sardaro A et al: *Second-line chemotherapy with fotemustine in temozolomide-pretreated patients with relapsing glioblastoma: a single institution experience*. Anticancer Drugs 19:613-620, 2008.
- [33] Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E et al: *Fotemustine as second-line treatment for recurrent or progressive glioblastoma after concomitant and/or adjuvant temozolomide: a phase II trial of Gruppo Italiano Cooperativo di Neuro-Oncologia (GICNO)* Cancer Chemother Pharmacol 64:769-775, 2009.
- [34] Fabrini MG, Silvano G, Lolli I et al: *A multi-institutional phase II study on second-line Fotemustine chemotherapy in recurrent glioblastoma*. J Neurooncol 92:79-86, 2009.
- [35] Addeo R, Caraglia M, De Santi MS et al: *A new schedule of fotemustine in temozolomide-pretreated patients with relapsing glioblastoma*. J Neurooncol 102:417-424, 2011.
- [36] Batchelor TT, Mulholland P, Neyns B, et al: *Phase III randomized trial comparing the efficacy of cediranib as monotherapy, and in combination with lomustine, vs lomustine alone in patients with recurrent glioblastoma*. J Clin Oncol.2013;31(26):3212-3218.
- [37] Del Vecchio M, Mortarini R, Canova S et al (2010): *Bevacizumab plus fotemustine as first-line treatment in metastatic melanoma patients: clinical activity and modulation of angiogenesis and lymphangiogenesis factors*. Clin Cancer Res 16:5862-5872, 2010.
- [38] Soffietti R., Trevisan E. et al: *Bevacizumab and fotemustine for recurrent glioblastoma: a phase II study of AINO (Italian Association of Neuro-Oncology)*. J Neurooncol. 2014 Feb;116(3):533-41
- [39] Shibuya M: *Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis*. J Biochem Mol Biol, 2006,39:469-478.
- [40] Bergers G, Benjamin LE: *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. Nat Rev Cancer, 2003,3:401-410.

- [41] De Groot JF, Lamborn KR, Chang SM, et al: *Phase II study of aflibercept in recurrent malignant glioma: a North American Brain Tumor Consortium study*. J Clin Oncol; 29(19):2689-2695, 2011.
- [42] Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, 2nd, et al: *Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme*. J Clin Oncol. 2007;25:4722-4729.
- [43] Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, 2nd, et al: *Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma*. Clin Cancer Res. 2007;13:1253-1259.
- [44] De Groot JF, Fuller G, Kumar AJ, et al: *Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and mice*. Neuro Oncol. 2010;12:233-242.
- [45] Sathornsumetee S, Desjardins A, Vredenburgh JJ, et al: *Phase II trial of bevacizumab and erlotinib in patients with recurrent malignant glioma*. Neuro Oncol. 2010;12:1300-1310.
- [46] Lai A, Tran A, Nghiemphu PL, et al: *Phase II study of bevacizumab plus temozolomide during and after radiation therapy for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme*. J Clin Oncol. 2011;29:142-148.
- [47] Reardon DA, Fink KL, Mikkelsen T, et al: *Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme*. J Clin Oncol. 2008;26:5610-5617.
- [48] Stupp R, Hegi ME, Neyns B, et al: *Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma*. J Clin Oncol. 2010;28:2712-2718.
- [49] Gilbert MR, Kuhn J, Lamborn KR, et al: *Cilengitide in patients with recurrent glioblastoma: the results of NABTC 03-02, a phase II trial with measures of treatment delivery*. J Neurooncol. 2012;106:147-153.
- [50] Rich JN, Reardon DA, Peery T, et al: *Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma*. J Clin Oncol. 2004;22:133-142.

- [51] Raizer JJ, Abrey LE, Lassman AB, et al: *A phase II trial of erlotinib in patients with recurrent malignant gliomas and nonprogressive glioblastoma multiforme postradiation therapy*. Neuro Oncol 2004;22:133-142.
- [52] Thiessen B, Stewart C, Tsao M, et al: *A phase I/II trial of GW572016 (lapatinib) in recurrent glioblastoma multiforme: clinical outcomes, pharmacokinetics and molecular correlation*. Cancer Chemother Pharmacol 65(2):353-61, 2010.
- [53] Hasselbalch B, Lassen U, Hansen S, et al: *Cetuximab, bevacizumab, and irinotecan for patients with primary glioblastoma and progression after radiation therapy and temozolomide: a phase II trial*. Neuro Oncol. 12(5):508-16, 2010.
- [54] Lokker NA, Sullivan CM, Hollenbach SJ, et al: *Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors*. Cancer Res. 2002;62:3729.
- [55] Wen PY, Yung WK, Lamborn KR, et al: *Phase I/II study of imatinib mesylate for recurrent malignant gliomas: North American Brain Tumor Consortium Study 99-08*. Clin Cancer Res. 2006;12:4899-4907.
- [56] Rao SK, Edwards J, Joshi AD, et al: *A survey of glioblastoma genomic amplifications and deletions*. J Neurooncol. 2010;96:169-179.
- [57] Arcella A, Biagioni F, Antonietta Oliva M, et al: *Rapamycin inhibits the growth of glioblastoma*. Brain Research. 2013;1495:37-51.
- [58] Akhavan D, Cloughesy TF, Mischel PS: *mTOR signaling in glioblastoma: lessons learned from bench to bedside*. Neuro Oncol, 2010,12:882-889.
- [59] Reardon DA, Desjardins A, Vredenburgh JJ, et al: *Phase 2 trial of erlotinib plus sirolimus in adults with recurrent glioblastoma*. J Neurooncol, 2010,96:219-230.
- [60] Lassen U, Sorensen M, Gaziel TB, et al: *Phase II study of bevacizumab and temsirolimus combination therapy for recurrent glioblastoma multiforme*. Anticancer Res. 2013;33:1657-1660.

- [61] Lee EQ, Kuhn J, Lamborn KR, et al: *Phase I/II study of sorafenib in combination with temsirolimus for recurrent glioblastoma or gliosarcoma: North American Brain Tumor Consortium study 05-02*. Neuro Oncol.2012;14(12):1511-18.
- [62] Weller M, Gorlia T, Cairncross JG, et al: *Prolonged survival with valproic acid use in the EORTC/NCIC temozolomide trial for glioblastoma*. Neurology. 2011;77:1156-1164
- [63] Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al: *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. N Engl J Med. 2010;363:711-723
- [64] Sampson JH, Heimberger AB, Archer GE, et al: *Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma*. J Clin Oncol. 2010;28:4722.
- [65] Kirson ED, Dbaly V, Tovarys F, et al: *Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104:10152-10157
- [66] Jordan MA, Toso RJ, Thrower D, et al: *Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90:9552-9556.
- [67] Kirson ED, Schneiderman RS, Dbaly V, et al: *Chemotherapeutic treatment efficacy and sensitivity are increased by adjuvant alternating electric fields*. BMC Med Phys 2009;9:1. doi: 10.1186/1756-6649-9-1.
- [68] NCCN.org: *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Central Nervous System Cancers 2013; version I: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cns.pdf*
- [69] Wong ET, Gautam S, Malchow C, Lun M, Pan E, Brem S: *Bevacizumab for recurrent glioblastoma multiforme: a meta-analysis*. J Natl Compr Canc Netw 2011;9:403-7.
- [70] Boockvar JA, Tsiouris AJ, Hofstetter CP, et al: *Safety and maximum tolerated dose of superselective intraarterial cerebral infusion of bevacizumab after osmotic blood-brain barrier disruption for recurrent malignant glioma*. Clinical article. J Neurosurg 2011;114:624-32.

- [71] Nagane M, Nishikawa R, Narita Y, et al: *Phase II study of single-agent bevacizumab in Japanese patients with recurrent malignant glioma*. Jpn J Clin Oncol 2012;42:887-95.
- [72] Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA et al: *Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group*. Journal of Clinical Oncology 2010; 28, 1963-1972.
- [73] Vredenburgh JJ, Cloughesy T, Samant M, et al: *Corticosteroid use in patients with glioblastoma at first or second relapse treated with bevacizumab in the BRAIN study*. Oncologist 2010;15:1329-34.
- [74] Zuniga RM, Torcuator R, Jain R, et al: *Rebound tumour progression after the cessation of bevacizumab therapy in patients with recurrent high-grade glioma*. J Neurooncol 2010;99:237-42.
- [75] Dahlberg SE, Sandler AB, Brahmer JR, Schiller JH, Johnson DH: *Clinical course of advanced non-small-cell lung cancer patients experiencing hypertension during treatment with bevacizumab in combination with carboplatin and paclitaxel on ECOG 4599*. J Clin Oncol 2010;28:949-54..
- [76] Mir O, Coriat R, Cabanes L, et al: *An observational study of bevacizumab-induced hypertension as a clinical biomarker of antitumor activity*. Oncologist 2011;16:1325-32
- [77] Wick A, Schafer N, Dorner N, et al: *Arterial hypertension and bevacizumab treatment in glioblastoma: no correlation with clinical outcome*. J Neurooncol 2010;97:157-8.
- [78] Ranpura V, Pulipati B, Chu D, Zhu X, Wu S: *Increased risk of high-grade hypertension with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis*. Am J Hypertens 2010;23:460-8.
- [79] Narita Y: *Drug Review: Safety and Efficacy of Bevacizumab for Glioblastoma and Other Brain Tumors*. J Clin Oncol 2013;43(6):587-595.
- [80] Wang MY, Cheng JL, Han YH, Li YL, Dai JP, Shi DP: *Measurement of tumor size in adult glioblastoma: Classical cross-sectional criteria on 2D MRI or volumetric criteria on high resolution 3D MRI?* Eur. J. Radiol., 2011, doi: 10.1016/j.ejrad. 2011.05.017.

- [81] Hoisak JD, Jaffray DA: *A method for assessing voxel correspondence in longitudinal tumor imaging*. Med. Phys., 2011, 38(5), 2742-2753.
- [82] Dal Pozzo G: *Compendio di Risonanza Magnetica - Cranio e rachide*. UTET, 2001.
- [83] Fan G, Deng QL, Wu ZH et al: *Usefulness of diffusion/perfusion weighted MRI in patients with non-enhancing supratentorial brain gliomas: a valuable tool to predict tumor grading?* 2006, Br J Radiol 79:652-658.
- [84] Nistri M, Mascacchi M, Moretti M, Tessa C, Politi LS, Orlandi I, Pellicanò G, Villari N: *Studio con risonanza magnetica della diffusione protonica: principi e applicazioni cliniche in malattie encefaliche selezionate*. Radiol Med 100;470 -479, 2000. Edizioni Minerva Medica. Torino.
- [85] Chenevert TL, Brunberg JA, Piper JG: *Anisotropic diffusion within human white matter: demonstration with NMR techniques in vivo*. Radiology 1990; 177(2): 401-405.
- [86] Crank J: *The mathematics of diffusion*. Oxford, England: Clarendon, 1975.
- [87] Pierpaoli C, Basser PJ: *Toward a quantitative assessment of diffusion anisotropy*. Magn Reson Med 1996 36: 893-906. Magn Reson Med 1996 36: 893-906.
- [88] Mattiello J, Basser PJ, Le Bihan D: *Analytical expression for the b matrix in NMR diffusion imaging and spectroscopy*. J Magn Reson A 1994 108: 131-141.
- [89] Bulakbasi N, Guvenc I, Onguru O et al: *The added value of the apparent diffusion coefficient calculation to magnetic resonance imaging in the differentiation and grading of malignant brain tumors*. 2004, J Comput Assist Tomogr 28:735-46.
- [90] Fan G: *Usefulness of diffusion/perfusion-weighted MRI in rat gliomas: correlation with histopathology*. Acad Radiol. 2005 May;12(5):640-51.
- [91] Yang D et al: *Cerebral gliomas: prospective comparison of multivoxel 2D chemical-shift imaging proton MR spectroscopy, echoplanar perfusion and diffusion-weighted MRI*. Neuroradiology. 2002 Aug;44(8):656-66.

- [92] Chenevert TL et al: *Diffusion magnetic resonance imaging: an early surrogate marker of therapeutic efficacy in brain tumors*. J Natl Cancer Inst. 2000 Dec 20;92(24):2029-36.
- [93] Ostergaard L, Weisskoff RM et al: *High resolution measurement of cerebral blood flow using intravascular tracer bolus passages, part I: mathematical approach and statistical analysis*. Magn Res Med. 1996;36:715-725.
- [94] Ostergaard L, Sorensen AG, et al: *High resolution measurement of cerebral blood flow using intravascular tracer bolus passages, part II: experimental comparison and preliminary results*. Magn Reson Med. 1996;36:726-736.
- [95] Petrella JR, Provenzale JM: *MR Perfusion imaging of the brain: Techniques and Application*. AJR 2000;175:207-219.
- [96] Edelman RR, Mattle HP et al: *Cerebral blood flow: assessment with dynamic contrast-enhanced T2*-weighted MR imaging at 1.5T* Radiology 1990; 176:211-220.
- [97] Rempp KA, Brix G, Wenz F, Becker CR, Guckel F, Lorenz WJ: *Quantification of regional blood flow and susceptibility contrast enhanced MR imaging*. Radiology 1994 193:637-641.
- [98] Kim S: *Quantification of relative cerebral blood flow change by flow-sensitive alternating inversion recovery (FAIR) technique application to functional mapping*. Magn Reson Med 1995;34:226-235.
- [99] Oliver Speck, Linda Chang, et al: *Perfusion MRI of the human brain with dynamic susceptibility contrast: gradient-echo versus spin-echo techniques*. Journal of Magnetic Res Im 12:381-387 (2000).
- [100] Burger P: *Malignant astrocytic neoplasm: classification, pathology, anatomy and response to therapy*. 1986, Semin Oncol 13:16-20.
- [101] Henegar MM, Moran CJ, Silbergeld DL: *Early postoperative magnetic resonance imaging following nonneoplastic cortical resection*. J Neurosurg 1996, 84:174-179.
- [102] Kumar AJ, Leeds NE, Fuller GN, et al: *Malignant gliomas: MR imaging spectrum of radiation therapy- and chemotherapy-induced necrosis of the brain after treatment*. Radiology 2000, 217:377-384.

- [103] Ulmer S, Braga TA, Barker FG 2nd., et al: *Clinical and radiographic features of peritumoral infarction following resection of glioblastoma*. Neurology 2006, 67:1668-1670.
- [104] Finn MA, Blumenthal DT, Salzman KL, et al: *Transient postictal MRI changes in patients with brain tumors may mimic disease progression*. Surg Neurol 2007, 67:246-250.
- [105] Gàllego Pérez-Larraya J, Lahutte M, et al: *Response assessment in recurrent glioblastoma treated with irinotecan-bevacizumab: comparative analysis of the Macdonald, RECIST, RANO, and RECIST + F criteria*. Neuro Oncol. 2012;14:667-73.
- [106] Chamberlain MC: *Radiographic patterns of relapse in glioblastoma*. J Neurooncol. 2011;101:319-23..
- [107] Rubenstein JL, Kim J, Ozawa T, et al: *Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption*. Neoplasia. 2000;2:306-14.
- [108] Kunkel P, Ulbricht U, Bohlen P, et al: *Inhibition of glioma angiogenesis and growth in vivo by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2*. Cancer Res. 2001;61:6624-8.
- [109] Henson JW, Ulmer S, Harris GJ: *Brain tumor imaging in clinical trials* Am J Neuroradiol. 2008;29:419-24.
- [110] Polley MY, Lamborn KR, Chang SM, et al: *Six-month progression-free survival as an alternative primary efficacy endpoint to overall survival in newly diagnosed glioblastoma patients receiving temozolomide*. Neuro Oncol. 2010;12:274-82.
- [111] Benjamin M. Ellingson: *Quantitative volumetric analysis of conventional MRI response in recurrent glioblastoma treated with bevacizumab*. Neuro-Oncology 13(4):401-409, 2011.
- [112] Iwamoto FM, Abrey LE, Beal K: *Patterns of relapse and prognosis after bevacizumab failure in recurrent glioblastoma*. Neurology 2009, 73:1200-1206.
- [113] Zuniga RM, Torcuator R, Jain R et al: *Efficacy, safety and patterns of response and recurrence in patients with recurrent high-grade gliomas*

- treated with bevacizumab plus irinotecan.* J Neurooncol 2009, 91:329-336.
- [114] Radbruch A, Lutz K, Wiestler B et al: *Relevance of T2 signal changes in the assessment of progression of glioblastoma according to the Response Assessment in Neurooncology criteria.* Neuro Oncol 2012, 14:222-229.
- [115] Wick A, Dörner N, Schäfer N et al: *Bevacizumab does not increase the risk of remote relapse in malignant glioma.* Ann Neurol 2011, 69:586-592.
- [116] Norden AD, Young GS, Setayesh K: *Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: efficacy, toxicity, and patterns of recurrence.* Neurology 70:779-787.
- [117] Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, et al: *MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients.* J Clin Oncol. 2008;26:2192-7.
- [118] B.M. Ellingson, S. Sahebjam: *Pretreatment ADC Histogram Analysis Is a Predictive Imaging Biomarker for Bevacizumab Treatment but Not Chemotherapy in Recurrent Glioblastoma.* AJNR Am J Neuroradiol. 2014 Apr;35(4):673-9.
- [119] Sundgren PC, Fan X, Weybright P, et al: *Differentiation of recurrent brain tumor versus radiation injury using diffusion tensor imaging in patients with new contrast-enhancing lesions.* Magn Reson Imaging. 2006; 24(9):1131-1142.
- [120] Pope WB, Lai A, Mehta R et al: *Apparent diffusion coefficient histogram analysis stratifies progression-free survival in newly diagnosed bevacizumab-treated glioblastoma.* AJNR Am J Neuroradiol. doi:10.3174/ajnr.A2385.
- [121] Pope WB, Kim HJ, Huo J et al: *Recurrent glioblastoma multiforme: ADC histogram analysis predicts response to bevacizumab treatment.* Radiology 2009 252:182-189.
- [122] Pope WB, Qiao XJ, Kim HJ et al: *Apparent diffusion coefficient histogram analysis stratifies progression-free and overall survival in patients with recurrent GBM treated with bevacizumab: a multi-center study.* J Neurooncol 2012, 108:491-498.

- [123] Ellingson BM, Malkin MG, Rand SD, LaViolette PS, Connelly JM, Mueller WM, Schmainda KM: *Volumetric analysis of functional diffusion maps is a predictive imaging biomarker for cytotoxic and anti-angiogenic treatments in malignant gliomas*. J Neurooncol 2011, 102:95-103.
- [124] Ellingson BM, Cloughesy TF, Lai A, Mischel PS, Nghiemphu PL, Lalezari S, Schmainda KM, Pope WB: *Graded functional diffusion map-defined characteristics of apparent diffusion coefficients predict overall survival in recurrent glioblastoma treated with bevacizumab*. Neuro-Oncology 2011, 13:1151-1161.
- [125] Jain R, Scarpace LM, Ellika S, Torcuator R, Schultz LR, Hearshen D, Mikkelsen T: *Imaging response criteria for recurrent gliomas treated with bevacizumab: role of diffusion weighted imaging as an imaging biomarker*. J Neurooncol 2010, 96:423-431.
- [126] Nowosielski M, Wolfgang R et al: *ADC histograms predict response to anti-angiogenic therapy in patients with recurrent high-grade glioma*. Neuroradiology (2011) 53:291-302.
- [127] Schmainda KM, Prah M: *Dynamic-susceptibility contrast agent MRI measures of relative cerebral blood volume predict response to bevacizumab in recurrent high-grade glioma*. Neuro Oncol. 2014 Jun;16(6):880-8.
- [128] Vidiri A, Pace A: *Early perfusion changes in patients with recurrent high-grade brain tumor treated with Bevacizumab: preliminary results by a quantitative evaluation*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2012, 31:33.
- [129] Sawlani RN, Raizer J: *Glioblastoma: a method for predicting response to antiangiogenic chemotherapy by using MR perfusion imaging—pilot study*. Radiology. 2010 May;255(2):622-8.