



Applicazione della tecnica perfusione MRI nella valutazione del grado di malignità dei gliomi cerebrali

Silvia Rota, Simona Brajkovic, Mauro Ceroni, Enrico Marchioni, Anna Luisa Di Stefano

*Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Pavia,
Fondazione IRCCS Casimiro Mondino, Pavia, Italia*

Applicazione della tecnica perfusione MRI nella valutazione del grado di malignità dei gliomi cerebrali

Nella clinica dei gliomi cerebrali un passo decisivo è la definizione del corretto grading. La possibilità di stabilire con precisione il grado di malignità di una lesione possiede notevoli implicazioni cliniche, in termini di outcome e atteggiamento terapeutico da assumere. La valutazione istopatologica della lesione è resa spesso difficoltosa dall'inaccessibilità chirurgica della stessa o da errori di campionamento, e lo studio di imaging attraverso la Risonanza Magnetica fornisce importanti informazioni di tipo morfologico, ma indicative di malignità soltanto in modo presuntivo. Negli ultimi anni si è assistito così ad un notevole sviluppo delle tecniche avanzate di RM, che permettono di completare le informazioni di tipo anatomico, con preziose indicazioni sulla funzionalità delle lesioni indagate. La perfusione rappresenta la misura diretta della microvascolarizzazione di un tessuto e può essere utilizzata come marker di imaging per valutare l'angiogenesi tumorale e di conseguenza il grado di malignità. Con il nostro lavoro si è voluto valutare il ruolo della perfusione RM nello stabilire il corretto grading dei gliomi cerebrali: sono state analizzate le mappe di perfusione di 22 pazienti affetti da gliomi di alto e basso grado, con o senza conferma istologica, e sono stati poi confrontati tra loro i gradi tumorale II, III, IV (sicuri o presunti) e i gradi semplificati (High Grade Gliomas e Low Grade Gliomas) attraverso i principali parametri di perfusione: CBV (Cerebral Blood Volume) e CBF (Cerebral Blood Flow). È stata trovata una correlazione positiva tra i due parametri e tra i parametri e il grado tumorale e ciò significa che all'aumentare del grado di malignità aumenta anche la perfusione. Questo concorda con il dato istologico che indica come lesioni a più alta malignità le lesioni a più alta vascolarizzazione. Mentre è stato possibile distinguere attraverso i parametri di perfusione i gliomi di alto grado dai gliomi di basso grado, la distinzione tra II/III e III/IV grado non è stata possibile, a causa della scarsa numerosità del campione di pazienti affetti da gliomi di grado III. Lo studio di perfusione RM sembra rappresentare dunque un utile strumento per la diagnosi differenziale tra HGG e LGG, con importanti implicazioni anche nel follow-up. Rimane ancora da valutare il potere discriminante della metodica nei tumori di grado intermedio.

Perfusion MRI application in the grading of cerebral gliomas

In the cerebral gliomas clinical practice, correct grading is really important. Establishing the correct lesion's malignancy degree has relevant clinical implications, in terms of outcome and therapeutic strategies. Histopathological evaluation of cerebral gliomas sometime is difficult because of the impossibility of surgery or sampling mistakes, and imaging study with Magnetic Resonance provides morphological important information, but not so reliable for malignancy. During last years, there has been a considerable development of

advanced RM techniques, which completes anatomy information, providing precious indications about the functionality of the investigated lesions. Perfusion represents the direct measure of the microvascularization of a tissue and can be used as a marker of imaging to estimate the tumor angiogenesis and the degree of malignancy. Our work aimed at evaluating the role of MR perfusion in establishing the correct grade of cerebral gliomas: we analysed perfusion maps of 22 patients affected by low grade or high grade gliomas, with or without histological confirmation, and after that we compared among tumor degrees II, III, IV and between simplified grade (low grade gliomas and high grade gliomas) with the main parameters of perfusion CBV (Cerebral Blood Volume) e CBF (Cerebral Blood Flow). A positive correlation has been found out between the two parameters and between the parameters and the cancer degree and this means that the bigger the degree of malignancy, the greater the perfusion is. This agrees with the histological datum that shows that the more consistent the vascularization, the more malignant the lesion is. It has been possible distinguishing between high grade gliomas and low grade gliomas through the perfusion parameters, but it has not been possible to make a distinction between II/III and III/IV, because of the low number of patients suffering from grade III gliomas. Therefore, perfusion MR study might represent a useful instrument for the differential diagnosis between HGG and LGG, with relevant implications in the follow-up too. It's still necessary to evaluate the discriminating power of the technique in the intermediate grade tumor.

Introduzione

I gliomi cerebrali sono i tumori cerebrali primitivi più frequenti nell'adulto e derivano dalle cellule della glia normalmente presenti nell'encefalo. La classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità li classifica in base alla cellula di origine in: astrocitomi, oligodendrogliomi, oligoastrocitomi misti. Questi tumori presentano un'ampia varietà di comportamenti biologici e per questo sono stati identificati criteri utili per la descrizione della malignità clinica. È stato dimostrato che gli intervalli di sopravvivenza dei pazienti sono strettamente dipendenti soprattutto dalle caratteristiche morfologiche della neoplasia e in particolare sono state trovate quattro caratteristiche istologiche in correlazione alla sopravvivenza, in modo riproducibile e predittivo: numero di mitosi, grado di atipia nucleare, proliferazione microvascolare e necrosi. Queste caratteristiche devono essere valutate in seno alle regioni con maggior grado di anaplasia all'interno del tumore, e questa regola si basa sull'osservazione che alcuni istotipi hanno tendenza intrinseca alla progressione verso fenotipi più maligni e, quando incorre, questa è tipicamente focale. Deriva dunque che proprio la popolazione di cellule con maggior grado di anaplasia determini il decorso della malattia [1]. In base alla presenza o meno di queste caratteristiche istologiche le neoplasie gliali vengono classificate in quattro gradi a malignità crescente: I, II, III, IV. Il grading è utile per valutare la prognosi e per stabilire l'approccio terapeutico, in modo particolare nella scelta dell'utilizzo o meno di radioterapia adiuvante e specifici protocolli chemioterapici. Negli adulti le forme diffusamente infiltranti sono le più frequenti: queste sono caratterizzate da diffusa infiltrazione delle strutture cerebrali adiacenti e distanti, in modo non correlato al grado di malignità istologica e manifestano un'intrinseca tendenza alla progressione verso i gradi più alti. Di questi il glioblastoma rappresenta l'esito di progressione assolutamente più maligno e tra tutti rappresenta il sottotipo più frequente [2]. È convenzione comune raggruppare i gliomi di grado I e II sotto la dicitura Low Grade Gliomas (LGG) e i gliomi di grado III e IV in High Grade Gliomas (HGG). Gli LGG (data la differenza clinico-prognostica tra grado I e II, nella pratica in questo gruppo sono inclusi solamente i gliomi di grado II, tumori con simile potenziale invasivo e di malignità) sono meno comuni degli HGG e si riscontrano tipicamente in pazienti più giovani (rispettivamente quarta decade e sesta decade). A questo gruppo appartengono: astrocitoma diffuso, oligodendroglioma e oligoastrocitoma. Invece al gruppo degli HGG appartengono: astrocitoma anaplastico (III), oligodendroglioma anaplastico (III), oligoastrocitoma anaplastico (III), e glioblastoma (IV). Queste forme possono originarsi più fre-

quentemente de novo (storia clinica breve), oppure da lesioni a minor grado di malignità (prognosi migliore). Per entrambi i gruppi, la possibilità di identificare una componente oligodendrogliale ha un significato prognostico positivo: queste neoplasie infatti presentano miglior risposta al trattamento, sebbene la maggior parte dei gliomi arrivano ad assomigliare morfologicamente al glioblastoma nello stadio maggiormente dedifferenziato [3-4]. Per quanto riguarda l'approccio terapeutico, attualmente la tendenza è quella di mantenere un atteggiamento di tipo conservativo negli LGG, mentre si applica un triplice trattamento (chirurgia, radioterapia, chemioterapia con Temozolomide) negli HGG. Nuove terapie comprendono l'uso di Bevacizumab, un anticorpo monoclonale umanizzato contro VEGF, con l'obiettivo di arrestare il processo di angiogenesi e normalizzare la vascolarizzazione tumorale [5-6].

Per la diagnosi dei gliomi cerebrali la biopsia è il gold standard: questo è infatti l'esame che possiede maggior accuratezza diagnostica e permette di porre diagnosi certa nella maggior parte dei casi. La biopsia viene praticata per conoscere l'esatta natura della lesione, per classificarla e per pianificare il trattamento terapeutico più appropriato. Ma due grosse limitazioni sono associate al grading istopatologico dei gliomi: errori di campionamento associati alla biopsia stereotassica causati dall'eterogeneità della lesione e l'impossibilità di valutare il tessuto tumorale residuo dopo chirurgia citoreduttiva. Ecco perché le tecniche di imaging sono di fondamentale importanza nello studio della patologia tumorale intracranica, specie per le lesioni non accessibili chirurgicamente. Tecnica di riferimento è la Risonanza Magnetica Nucleare con mezzo di contrasto (mdc): una RM con Gadolinio che dia reperti di normalità esclude la presenza di una neoplasia intracranica primitiva. Fondamentale è l'uso della RM anche nel follow-up di questi pazienti: negli LGG permette di documentare un eventuale viraggio verso gradi a malignità maggiore, mentre negli HGG permette di evidenziare una ripresa di malattia [7].

In RM la caratterizzazione del tessuto neoplastico è morfologica e basata prevalentemente sulla combinazione di immagini T1-T2 pesate e immagini T1-pesate post-contrasto. La RM convenzionale fornisce importanti informazioni riguardo la presenza o meno di caratteristiche che permettono di valutare l'aggressività tumorale e quindi il grado. In particolare gli LGG tendono a presentare un aspetto più omogeneo, presa di contrasto generalmente assente (questa solitamente compare alla progressione verso i gradi a malignità maggiore), scarso edema perilesionale, mancanza di effetto massa significativo, assenza di necrosi e raramente emorragia. Invece gli HGG presentano generalmente un enhancement particolarmente denso, uniforme-nodulare o ad anello, esteso edema perilesionale con effetto massa significativo e shift della linea mediana, necrosi solitamente centrale e frequentemente emorragia [8]. Ma nessuna di queste caratteristiche di risonanza è grado-specifica. Nel grading dei gliomi la RM convenzionale presenta infatti grossi limiti, a causa della scarsa specificità delle informazioni morfologiche. Un chiaro esempio è la presa di contrasto: fino al 15-39% degli LGG mostra presa di contrasto dopo la somministrazione di gadolinio e fino al 30% dei tumori che non incrementano sono in realtà tumori maligni [9]. La RM non è in grado poi di mostrare la reale estensione del tumore, non permettendo così un'ottima pianificazione chirurgica e non sempre è in grado di guidare nel modo più appropriato la biopsia stereotassica. Infatti identificare l'area più maligna all'interno della lesione con le tecniche convenzionali può essere difficile, per via della possibilità di evidenziare solo le aree di maggior alterazione della barriera emato-encefalica (BEE), che potrebbero non corrispondere alle aree a maggior malignità, le più vascolarizzate [10]. Date le grosse limitazioni della metodica morfologica, negli ultimi anni sono stati ricercati numerosi parametri funzionali che potrebbero essere visualizzati in vivo per migliorare la caratterizzazione tumorale, tra cui il tasso di crescita tumorale, il metabolismo, le caratteristiche chimiche tissutali, l'angiogenesi. Le tecniche di RM che permettono di visualizzare queste informazioni vengono definite tecniche avanzate e permettono di completare le informazioni anatomiche fornite dalla tecnica convenzionale con preziose informazioni sulla funzionalità dei tessuti indagati.

La perfusione si definisce come l'apporto costante di sangue ai tessuti attraverso i capillari. Lo studio del volume e del flusso ematici e di numerosi altri parametri descrittivi l'emodinamica di un tessuto

può offrire uno strumento utile per una miglior comprensione della patologia, essendo la perfusione alterata in numerosi processi morbosi. Particolare interesse è stato rivolto all'angiogenesi nei gliomi cerebrali: la misura diretta della microvascolarizzazione può essere utilizzata come importante marker di imaging per misurare la malignità della lesione. La RM di perfusione (Perfusion Weighted Imaging o PWI), con la sua sensibilità per il letto capillare, può essere particolarmente adatta per valutare l'angiogenesi e la crescita tumorale in vivo in modo non invasivo [11]. Il grado di angiogenesi si correla al grado di malignità e lesioni di grado maggiore presentano un aumento dei fattori angiogenetici (in particolare VEGF) rilasciati dalle cellule tumorali ed endoteliali e dai macrofagi. Alcuni autori hanno osservato come il livello di angiogenesi permette di differenziare gli astrocitomi anaplastici in categorie di sopravvivenza a breve e lungo termine e che nessun'altra caratteristica mostra un'associazione così significativa con la sopravvivenza [12]. Negli astrocitomi emisferici ben differenziati (grado II) non c'è neoformazione di vasi sanguigni e il tumore utilizza i vasi sanguigni preesistenti e li modifica. Al contrario, nei tumori maligni e principalmente nei glioblastomi, si generano vasi immaturi a partire dalla vascolarizzazione esistente attraverso un processo di iperplasia endoteliale. I vasi tumorali neoformati sono tortuosi, con trombi, dilatati ed eccessivamente permeabili; queste anomalie sono distribuite in modo focale e contribuiscono alla eterogeneità della perfusione tumorale. Gli oligodendrogliomi possiedono un'elevata densità microvascolare e, a parità di grado, sono più vascolarizzati degli astrocitomi [13].

La PWI consiste nell'acquisizione veloce di immagini al passaggio di un bolo di mezzo di contrasto all'interno dei vasi sanguigni cerebrali: il passaggio del bolo provoca un cambiamento di segnale, il cui andamento nel tempo può essere analizzato per valutare l'emodinamica cerebrale. È quindi una tecnica dinamica, che permette lo studio delle variazioni della circolazione cerebrale nel tempo. Infatti iniettando una quantità nota di un tracciante all'interno di un vaso e osservando quando ne fuoriesce, possiamo apprendere alcune informazioni sul vaso e il flusso sanguigno che lo attraversa. Applicando diversi modelli matematici si possono ricavare parametri quali il volume del vaso, la velocità del flusso, il tempo di circolo, parametri di permeabilità e per ognuno di essi viene creata la relativa mappa di perfusione. Questi vengono generalmente forniti in modo relativo, cioè normalizzati per uno standard interno, quale ad esempio la sostanza bianca sana controlaterale.

Esistono diverse metodiche di acquisizione delle immagini, tra queste la First-pass Dynamic Susceptibility Weighted Contrast-enhanced (DSC-MRI). Questa tecnica valuta il primo passaggio del bolo di mezzo di contrasto ed è pesata in T2 o T2*. I chelati di Gadolinio tendono a diffondere nello spazio interstiziale. Tuttavia, negli studi di perfusione di primo passaggio nell'encefalo, gli effetti dell'equilibrio extravascolare risultano molto meno marcati di quanto lo siano in altri tessuti, poiché la BEE trattiene i chelati paramagnetici extracellulari a basso peso molecolare all'interno dello spazio vascolare: ecco perché si definiscono non diffusivi. In seguito all'alterazione della BEE, il mezzo di contrasto fuoriesce dai vasi, penetrando così nel compartimento extravascolare. Ciò causa la perdita dell'effetto di suscettività magnetica: lo stravasamento determina valori di perfusione sottostimati rispetto a quanto si otterrebbe senza la fuoriuscita del mezzo di contrasto dai vasi. La DSC è dunque soggetta al cosiddetto effetto leakage. Algoritmi di correzione o somministrazione frazionata in due dosi del bolo possono minimizzare questi errori [14]. La perfusione RM permette dunque di studiare l'angiogenesi tumorale e la permeabilità della BEE. Attualmente i vantaggi dell'utilizzo della PWI nello studio dei tumori cerebrali si hanno principalmente in quattro campi: diagnosi differenziale, grading, programmazione della biopsia, monitoraggio del trattamento. I parametri maggiormente usati in campo neuro-oncologico sono il Cerebral Blood Volume (rCBV, dove r sta per relativo, cioè valore normalizzato; unità di misura: ml/100g) e il Cerebral Blood Flow (rCBF; unità di misura: ml/100g/min). Per l'interpretazione delle loro mappe, le immagini vengono generalmente interpretate confrontando l'area di lesione con la sostanza grigia e bianca normali controlaterali. Spesso all'interno delle masse tumorali questi parametri possiedono sia valori alti che bassi; in questi casi è importante riuscire a distin-

guere un piccolo focus di proliferazione neovascolare tumorale, da eventuali strutture vascolari normalmente presenti e adiacenti alle lesioni espansive. In caso di dubbio le mappe devono essere confrontate tra loro e agli studi convenzionali T1-pesate post-contrasto [15].

Diversi studi dimostrano la superiorità della PWI rispetto alla RM convenzionale nello studio del grado di malignità dei gliomi cerebrali. Questo vale soprattutto per quei gliomi che non presentano enhancement all'imaging convenzionale: è stata infatti dimostrata in questi gliomi una correlazione tra i parametri di perfusione, l'espressione di VEGF e il grado istopatologico [16]. La misurazione del rCBV, anche se non una misura assoluta del volume di sangue regionale, è il parametro migliore per predire il grading: si è dimostrato infatti più sensibile rispetto al parametro di flusso e meno soggetto all'effetto leakage [17]. Numerosi studi riportano che i gliomi di alto grado hanno valori più alti di rCBV e rCBF regionali rispetto ai gliomi di basso grado e i glioblastomi hanno il valore di perfusione più alto rispetto a tutti gli altri gradi di glioma [18]. L'eccezione è rappresentata dagli oligodendrogliomi. Sebbene l'rCBV corredi con la densità capillare, l'oligodendroglioma può avere un'umentata capillarità, senza un maggior grado di malignità. Questa maggiore densità microvascolare può determinare alti valori di perfusione anche in lesioni di basso grado [19]. I valori numerici dei parametri di perfusione sono molto differenti tra loro nei diversi studi. Questa differenza deriva dalle diverse tecniche applicate nei vari centri, ovvero scelta della sequenze, selezione delle regioni di interesse (ROI) nell'area della lesione, selezione della regione controlaterale al tumore per il calcolo del rapporto tra i valori della parte malata e della parte sana, ecc [20]. È stato dimostrato che la PWI ha una bassa specificità, soprattutto nel differenziamento di gliomi di grado II da gliomi di grado III e di gliomi di grado III da gliomi di grado IV. Questo è dovuto per esempio a valutazioni errate a causa dell'effetto leakage, o ad errori di campionamento biotico. Dunque la PWI ha ad oggi un'utilità limitata nel singolo paziente nel porre una diagnosi specifica, ma può avere grande valore clinico nel guidare la biopsia e nel delineare i confini con maggiore precisione rispetto alla RM convenzionale. Ad ogni modo rimane una tecnica davvero promettente e studi a lungo-termine saranno determinanti nel definire il reale valore prognostico e predittivo dei parametri di perfusione, comparati all'esame istopatologico [21-22].

Scopo del lavoro

Scopo di questa ricerca è valutare il ruolo della perfusione RM nello studio dei gliomi cerebrali. In particolare è stata indagata la capacità della tecnica PWI di stabilire un corretto grading. Sono state analizzate le mappe di perfusione di pazienti affetti da gliomi di alto e basso grado, con o senza conferma istologica, e confrontati poi tra loro i gradi tumorali II, III, IV (sicuri o presunti) e i gradi semplificati (HGG e LGG) attraverso i due parametri principali di perfusione rCBV e rCBF. Sono state definite dunque le caratteristiche qualitative e quantitative della metodica nei gliomi di basso e alto grado ed è stata dimostrata la correlazione tra rCBV e rCBF nel definire il giusto grado tumorale. Nel fare questo, le immagini di perfusione sono state confrontate con le immagini morfologiche fornite dalle tecniche di imaging convenzionale.

Materiali e metodi

Disegno e popolazione in studio

Trattasi di studio osservazionale retrospettivo condotto presso un unico centro di riferimento, il Servizio di Neuroradiologia della Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Casimiro Mondino di Pavia.

La popolazione target è stata rappresentata da soggetti adulti affetti da glioma cerebrale, sottoposti ad esame di perfusione tra il gennaio 2008 e il luglio 2011. La diagnosi di glioma si basava su prova istologica o forte suggestione di malattia attraverso esami neuroradiologici, eventuali accertamenti con tecniche ancillari e storia clinica. I criteri di inclusione sono stati i seguenti: età maggiore di 18 anni e documentazione RM di glioma cerebrale di natura astrocitaria od oligoendrogliale in prima diagnosi ed eventuale conferma all'esame istologico. L'unico criterio di esclusione applicato è stato: trattamento chirurgico, radio- e/o chemioterapico eseguito precedentemente all'esame di PWI, data l'alterazione della perfusione conseguente a queste procedure terapeutiche [23]. Sono stati inclusi nello studio 22 pazienti, di razza caucasica, 15 di sesso maschile e 7 di sesso femminile:

- 7 pazienti dei 22 sono stati sottoposti ad esame di perfusione alla diagnosi, preliminarmente al gesto chirurgico. All'esame istologico:
 - 1 paziente è risultato affetto da astrocitoma anaplastico (grado III);
 - 6 pazienti sono risultati affetti da glioblastoma (grado IV).
- 15 pazienti non sono stati sottoposti a procedura chirurgica. La diagnosi è stata posta in modo presuntivo sulla base dell'aspetto morfologico in RM convenzionale e, nei casi in cui l'esame di perfusione è stato effettuato in un momento diverso dalla diagnosi, anche sulla base della storia clinica. In 4 casi la diagnosi radiologica presunta è stata corroborata dai risultati di spettroscopia; in 6 casi dai valori della diffusione, in 1 caso dall'esame di SPECT.
 - 5 pazienti erano affetti da una lesione espansiva con le caratteristiche di un glioma di basso grado;
 - 9 pazienti erano affetti da una lesione espansiva con le caratteristiche di un glioma di alto grado;
 - 1 paziente era affetto da una lesione espansiva con le caratteristiche di glioma di grado intermedio (Tabella 1).

Si elencano di seguito i criteri morfologici utilizzati per la caratterizzazione delle lesioni espansive senza prova istologica. Glioma di basso grado: non enhancement in T1 post-mdc, assenza di necrosi, scarso edema perilesionale ed aspetto omogeneo, in particolare nelle sequenze FLAIR. Glioma di alto grado: enhancement ad anello o nodulare, edema periferico ed eventuale effetto massa, associati o meno a presenza di necrosi intralesionale nelle immagini T1-pesate post-mdc. Glioma di grado intermedio: comparsa di enhancement nodulare in seno ad una lesione con aspetto compatibile con glioma di basso grado ad esami precedenti, scarso edema perilesionale, assenza di necrosi tissutale [24].

Metodica d'analisi

Per ogni paziente è stato analizzato un esame di perfusione, eseguito con la macchina di RM Philips Intera Gioscan 1.5T presente presso il Servizio di Neuroradiologia della Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Casimiro Mondino. Le immagini sono state raccolte tramite la tecnica DSC-RMN, con sequenza GRE non echo-planare T2*-pesata (PRESTO). Il mezzo di contrasto impiegato è stato il GADOVIST alla concentrazione di 1.0 mmol/ml, alla dose di 0.3-0.4 mmol/kg e con un flusso di 5ml/s.

Per l'elaborazione delle mappe parametriche PWI e per ricavarne i rispettivi valori numerici, è stato utilizzato uno speciale software per la visualizzazione di immagini di perfusione MRI: PMA, Perfusion Mismatch Analyzer (versione 3.4.0.6), creato da ASIST-Japan. Il programma è molto semplice nell'utilizzo ed immediato nell'interpretazione. Permette di visualizzare con una duplice schermata le mappe parametriche di perfusione elaborate dal software e le immagini di risonanza acquisite con sequenze convenzionali (anatomiche), in modo da rendere più rapido un confronto tra mappa PWI e anatomica. Dopo aver tracciato le ROI sull'immagine, il programma fornisce i valori dei parametri rCBV e rCBF per le aree di lesione indagate sia sull'immagine PWI, che sull'immagine anatomica,

e sull'area di mismatch tra queste due regioni (Figura 1). Conoscendo il grado tumorale in modo sicuro o presunto, si è scelto generalmente di confrontare la mappa di perfusione con una sequenza T1-pesata post-mdc nei gliomi di alto grado e con una sequenza FLAIR, eventualmente associata ad una sequenza T1-pesata basale nei gliomi di basso grado.

Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite mediante software specifico (SPSS Statistics 17.0). Tutti i parametri considerati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (DS). Un valore di probabilità (p) <0.05 è stato considerato come statisticamente significativo di differenza, ad eccezione del test di correlazione a due code di Kendall, per il quale è stato considerato significativo $p<0.01$. I parametri rCBV e rCBF ricavati per ogni area di interesse (perfusione, anatomica e mismatch tra le due) sono stati inizialmente confrontati tra loro e con il grado tumorale tramite il test di correlazione a due code di Kendall. Il confronto delle variabili tra gruppi (pazienti con gliomi di stadio differente) è stato eseguito attraverso il test di ANOVA a due vie. Attraverso il successivo test di comparazioni multiple (post hoc con metodo di Bonferroni), si è quindi cercato di stabilire tra quali gradi è possibile questa discriminazione: è stata dunque indagata nel dettaglio l'influenza che il grado ha sui vari parametri e sono stati quindi cercati quali gradi hanno un comportamento significativamente diverso tra loro. Infine, data la difficoltà del grading tumorale soprattutto per il grado intermedio, è stato eseguito un ulteriore test ANOVA per verificare se l'esame di perfusione permette la diagnosi differenziale tra gliomi di basso e di alto grado.

Risultati

Correlazione dei parametri

Con il test di correlazione a due code di Kendall è stato trovato che tutti parametri sono correlati in modo statisticamente significativo ($p<0.01$) al grado, attraverso un coefficiente positivo. Questo implica che all'aumentare del grado, aumenta il valore dei parametri e viceversa (Figura 2). In generale c'è un correlazione anche tra i parametri stessi: quindi all'aumentare del rCBV aumenta il rCBF e viceversa. L'eccezione a questa correlazione è rappresentata dai valori di rCBV-pwi e rCBF-anatomica, rCBF-pwi e rCBF-anatomica, rCBV-mismatch e rCBF-anatomica, rCBF-mismatch e rCBF-anatomica. Dato che questi parametri non correlano tra loro, non si possono avere informazioni relative ad uno dei due anche se si conosce l'altro (Tabella 2).

Differenziazione dei gradi tumorali

Per valutare la possibilità di distinguere i gradi tumorali tra loro in base al valore medio di rCBV e rCBF, è stato eseguito il test ANOVA. I valori medi di rCBV trovati \pm DS per ciascuna area nei gliomi di grado II sono di: 5.16 ± 2.54 dalla mappa di perfusione, 7.50 ± 4.55 dall'anatomica, 6.25 ± 3.40 dal mismatch. I valori medi di rCBF trovati \pm DS sono invece rispettivamente di: 46.01 ± 27.92 , 77.82 ± 58.19 , 56.22 ± 36.61 . I valori medi di rCBV trovati \pm DS per ciascuna area nei gliomi di grado III sono di: 13.77 ± 6.87 dalla mappa di perfusione, 8.78 ± 2.43 dall'anatomica, 10.91 ± 10.91 dal mismatch. I valori medi di rCBF trovati \pm DS sono invece rispettivamente di: 144.03 ± 113.87 , 84.55 ± 43.28 , 127.13 ± 137.77 . I valori medi di rCBV trovati \pm DS per ciascuna area nei gliomi di grado IV sono di: 21.43 ± 10.49 dalla mappa di perfusione, 19.63 ± 5.69 dall'anatomica, 18.97 ± 9.44 dal mismatch. I valori medi di rCBF trovati \pm DS sono invece rispettivamente di: 175.95 ± 59.67 , 174.76 ± 41.81 , 161.47 ± 74.62 . Dall'analisi della varianza risultato che le medie dei parametri dei tre gradi, sono statisticamente differenti tra di loro ($p<0.05$) (Tabella 3). Si è poi valutato nel dettaglio per

quali gradi c'è una differenza significativa con l'analisi post-hoc, il test di comparazioni multiple secondo il metodo di Bonferroni. Si osserva che esiste una significatività statistica confrontando la media dei valori di rCBV e rCBF tra il grado II e IV. Il valore medio del rCBV di tutte e tre le ROI del grado II si differenzia dal valore medio degli stessi rCBV del grado IV in modo statisticamente significativo ($p < 0.05$) e viceversa; lo stesso vale per i valori medi di tutti e tre i rCBF del grado II che si differenziano in modo statisticamente significativo dai rCBF del grado IV ($p < 0.05$) e viceversa. Confrontando le medie dei parametri del III e IV grado, l'unica differenza effettiva si è registrata nel valore di rCBV dell'anatomica. Per II e III grado tutti i confronti hanno dato esito negativo (Tabella 4). La possibilità di differenziazione dei gradi tumorali con uno dei parametri utilizzati nello studio risiede dunque nella possibilità di discriminare tra loro gliomi di secondo e di quarto grado (Figura 3).

Differenziazione LGG e HGG

Data la mancata dimostrazione della possibilità di distinzione tra grado II e III tramite i parametri di perfusione, si è provato allora a valutare l'efficacia della perfusione nello stabilire la diagnosi di glioma di alto o di basso grado (grado semplificato). Per fare ciò è stata ridotta la numerosità a 12 pazienti, prendendo in considerazione per i gliomi di alto grado solo i pazienti con conferma istologica, per avere dati più certi su cui lavorare e campioni numerosamente più equi. Il campione era dunque composto da:

- 5 pazienti affetti da lesione di basso grado (grado II), diagnosi presuntiva posta sulla base delle tecniche di imaging convenzionale o ancillare e storia clinica;
- 1 paziente affetto da lesione di grado III, con diagnosi istologica confermata;
- 6 pazienti affetti da lesione di grado IV, con diagnosi istologica confermata.

Anche per questo confronto è stato utilizzato un test ANOVA. I p-value sono tutti sufficientemente bassi (< 0.05). Quindi, dallo studio effettuato su questo campione, i gliomi di basso e di alto grado possono essere distinti tra loro in base ai valori di rCBV e rCBF. I valori trovati per rCBV e rCBF sono: 5.16 ± 2.54 , 7.50 ± 4.55 , 6.25 ± 3.40 per il rCBV dei gliomi di basso grado nelle diverse aree considerate, 46.01 ± 27.92 , 77.82 ± 58.19 , 56.22 ± 36.61 per il rCBF dei gliomi di basso grado nelle diverse aree considerate; 18.07 ± 9.27 , 18.65 ± 8.82 , 15.00 ± 5.53 per il rCBV dei gliomi di alto grado nelle diverse aree considerate, 156.78 ± 38.00 , 173.16 ± 55.23 , 131.77 ± 48.02 per il rCBF dei gliomi di alto grado nelle diverse aree considerate (Tabella 5). La possibilità di distinzione tra HGG e LGG attraverso lo studio di perfusione può osservarsi anche da un'attenta valutazione delle mappe parametriche, confrontate con le immagini anatomiche (Figure 4-5).

Discussione

Questo studio sperimentale, eseguito attraverso una raccolta dati retrospettiva di pazienti affetti da glioma cerebrale, dimostra che esiste una differenza significativa dei parametri di perfusione considerati tra i tumori di basso grado e i tumori di alto grado. Il campione dei pazienti affetti da gliomi grado III non è sufficientemente rappresentato per estendere il confronto anche a questa categoria.

Predizione del grado

È stato dimostrato che esiste correlazione positiva tra i parametri rCBV-rCBF e grado tumorale e che quindi, all'aumentare del grado, aumentano i valori dei parametri di perfusione. Nella valutazione del grading tumorale con la tecnica di perfusione, è stato trovato che c'è distinzione tra le medie dei valori dei parametri rCBV e rCBF del II e IV grado. Infatti la media dei rCBV e rCBF del grado II è minore

di quella del grado IV in modo statisticamente significativo ($p < 0.05$). Quindi questi due gradi sono differenziabili tra loro. Nel confronto tra gradi non è stata invece dimostrata distinzione tra il grado II e III e grado III e IV. Mentre la distinzione tra III e IV si associa ad implicazioni clinico-prognostiche di minor rilievo, la distinzione tra II e III è molto importante dal punto di vista clinico. I gliomi di grado II appartengono infatti al gruppo dei LGG, caratterizzato da lenta evoluzione clinica e trattamento conservativo, mentre i gliomi di grado III e IV appartengono al gruppo degli HGG, caratterizzato da clinica rapidamente progressiva verso un esito infausto e trattamento aggressivo [2-3]. L'impossibilità della distinzione tra gliomi di II e III grado può essere dovuta, come già detto, alla scarsa numerosità del campione, soprattutto del III grado, che non permette di fare un'analisi efficiente. Inoltre un'ulteriore problematica potrebbe essere l'eventuale presenza di gliomi di natura oligodendrogliale tra i pazienti senza conferma istologica. Infatti un paziente con oligodendroglioma potrebbe avere valori aumentati di rCBV e rCBF rispetto al grado a cui appartenerrebbe [19]: questo potrebbe portare ad un overlap dei valori dei parametri che renderebbe più difficile la distinzione tra i gradi, in particolare se l'eventuale paziente con oligodendroglioma appartenesse al grado II. Sebbene l'efficacia nel predire con esattezza il grado tumorale non è stata confermata, data l'impossibilità di una corretta valutazione del grado intermedio, è stata dimostrata la possibilità di discriminare tra gliomi di alto e di basso grado. La capacità di poter inserire un glioma nel gruppo basso o alto grado ha implicazioni clinico-terapeutiche molto importanti, soprattutto nei casi dubbi, per i quali non c'è possibilità di eseguire un intervento chirurgico e le tecniche convenzionali non permettono una diagnosi sufficientemente sicura [9-10].

CBV, CBF ed effetto leakage

Secondo quanto trovato rCBV e rCBF sono soggetti ad un grado simile di variabilità e quindi ugualmente affidabili nel definire il grado. Il test di correlazione a due code di Kendall ha confermato come, in generale, questi due parametri siano correlati tra loro, indipendentemente dalle aree da cui vengono ricavati. Data la possibilità dell'influenza dell'alterata permeabilità (leakage) sulle mappe di perfusione dei tumori di alto grado, si è cercato di valutare un suo eventuale effetto sullo studio. Gli effetti leakage si dovrebbero tradurre in una varianza maggiore dei parametri, in quanto in alcuni casi il rilevamento dei valori di CBV e CBF sarebbe più corretto e affidabile, mentre in altri il rilevamento non sarebbe quello reale, essendo sottostimato [15]. Da queste statistiche non parrebbe che ci sia una differenza nella variabilità tra i vari fenomeni: infatti i valori di rCBV e rCBF dei gliomi di alto grado non possiedono una varianza maggiore rispetto agli stessi parametri dei gradi II e III. Sembra quindi che il nostro studio non sia stato soggetto ad effetti particolarmente evidenti dovuti a leakage. Se si osserva la figura 2 in alto a destra si possono osservare dei valori outlier per gliomi di grado IV. Il loro numero è al limite valido (1/10), ossia statisticamente parlando sono da considerarsi come eccezioni non significative. Si tende dunque ad escludere il leakage come causa di questo fenomeno.

Mappe di perfusioni ed immagini convenzionali

È stato visto come le immagini di perfusione siano in grado di fornire un'idea sulla malignità della lesione con un'interpretazione immediata. Consente infatti di valutarne l'estensione e di classificarla tra le lesioni di basso o di alto grado. Occorre tuttavia prestare attenzione ad eventuali artefatti, ad alterazioni nell'emisfero sano controlaterale e alla vascolarizzazione normalmente presente nell'area. È necessario dunque valutare l'asimmetria degli emisferi [25]. Le mappe di rCBV e rCBF rappresentano delle perfusioni molto simili tra loro e questo significa che i due parametri sono in grado di mostrare in ugual modo la vascolarizzazione. I valori numerici dei parametri confermano quanto rappresentato nelle mappe di perfusione. Dalle figure 4 e 5 si può osservare come generalmente la mappa di perfusione mostri una lesione più estesa di quanto appare nella sequenza convenzionale. Questo è dovuto al fatto che le due immagini mostrano due caratteristiche diverse del tumore. L'esempio più evidente si

ha per la sequenza T1-pesata post-mdc: questa infatti mostra le aree di alterata permeabilità della BEE, mentre la mappa di perfusione rappresenta la vascolarizzazione. Come detto, l'alterazione della BEE non può essere considerato indice di malignità altrettanto significativo quanto il grado di proliferazione vascolare. Lo stesso si può dire per la sequenza FLAIR che mostra l'estensione della compromissione tissutale, in particolare dell'edema vasogenico [14]. La perfusione dunque sembrerebbe migliore per la valutazione della reale estensione del tumore e del suo grado di malignità, rispetto alle tecniche di imaging convenzionale. La maggior estensione del tumore sulle mappe di perfusione è spiegata dal concetto di mismatch (PWI-anatomica, e cioè periferia della lesione), di cui si può valutare la vascolarizzazione. È dunque possibile stabilire con l'esame di perfusione quali siano le aree della lesione con maggior grado malignità, sia se si osserva attentamente l'immagine che raffigura la perfusione e si confronta con l'anatomica, sia se si osserva la tabella dei parametri, che indica quale tra le due parti (centrale o periferica) sia più vascolarizzata. Questo può essere importante per la programmazione di un'eventuale biopsia, che ad oggi è guidata da immagini convenzionali, che come è stato detto più volte, non sempre indicano l'area a maggior malignità [10].

Conclusioni

La metodica di perfusione sembra rappresentare uno strumento utile per la diagnosi differenziale tra gliomi di basso e di alto grado di malignità, grazie sia alla dimostrazione della correlazione dei parametri di vascolarizzazione CBV e CBF al grado tumorale semplificato (HGG e LGG), sia all'immediatezza dell'interpretazione della mappa di perfusione. Non è possibile esprimere un giudizio sul potere discriminante della metodica nei tumori di grado intermedio a causa della ridotta dimensione del campione in studio. Alcuni dati suggeriscono l'utilità potenziale della perfusione anche nel corso del follow-up per monitorare le variazioni dinamiche del tumore e il suo eventuale viraggio verso gradi di malignità superiore. Si ritiene che lo studio fornisca risultati molto promettenti come punto di partenza per la pianificazione di studi prospettici multicentrici su campioni sufficientemente rappresentativi della popolazione generale dei gliomi. I limiti principali della metodica sono:

- costi complessivi particolarmente alti in termini di risorse e di strumentazione;
- applicabilità solo presso centri ad elevata tecnologia;
- tempi necessari per l'elaborazione dei dati rispetto alle esigenze nel percorso diagnostico-terapeutico dei pazienti affetti da tumori cerebrali;
- necessità di apportare miglioramenti alla metodica, ad esempio per quanto riguarda la DSC-MRI, annullare l'effetto leakage, in modo tale che basti utilizzare una sola sequenza di perfusione per avere tutte le informazioni necessarie.

La perfusione potrebbe essere dunque in un futuro un ottimo strumento di diagnosi e valutazione della malignità della lesione. Sono necessari ulteriori studi affinché si possa potenziare l'aumento delle sue prestazioni e possa essere applicata anche indipendente da ulteriori tecniche in un corretto procedimento diagnostico-terapeutico. Occorre però ricordare che in ogni caso i valori medi di CBV e CBF trovati non possono essere considerati valori univoci, data la non uniformità dello studio di perfusione nei diversi centri di Neuroradiologia per diversa selezione delle sequenze, delle ROI e della regione controlaterale al tumore e dei modelli matematici applicati.

Tabelle e figure

Tabella 1. Popolazione in studio (Abbreviazioni: Istologico= numero di pazienti sottoposti a chirurgia/biopsia pre-pwi; presunto= numero pazienti con diagnosi presuntiva; età media= età media alla diagnosi espressa in anni; KPS: Karnofsky Performance Status).

	Istologico	Presunto	Totale	Età media	KPS
II		5	5	54.48	86
III	1	1	2	56.3	85
IV	6	9	15	65.3	66.7

Tabella 2. Correlazioni dei parametri rCBV e rCBF tra loro e con il grado tumorale calcolate con test di correlazione a due code di Kendall; significatività al 99% (Abbreviazioni: Pwi= valore dei parametri di perfusione sulla mappa di perfusione; anat= anatomica; mis= mismatch; coeff corr= coefficiente di correlazione).

	Grado	CBVpwi	CBFpwi	CBVanat	CBFanat	CBVmis	CBFmis
Grado							
<i>p-value</i>		0.001	0.002	0.000	0.002	0.004	0.007
<i>coeff corr</i>	1.000	0.591	0.541	0.659	0.566	0.516	0.479
CBVpwi							
<i>p-value</i>	0.001		0.000	0.000	0.132	0.000	0.000
<i>coeff corr</i>	0.591	1.000	0.840	0.578	0.236	0.831	0.733
CBFpwi							
<i>p-value</i>	0.002	0.000		0.000	0.050	0.000	0.000
<i>coeff corr</i>	0.541	0.840	1.000	0.578	0.307	0.724	0.769
CBVanat							
<i>p-value</i>	0.000	0.000	0.000		0.004	0.002	0.001
<i>coeff corr</i>	0.659	0.578	0.578	1.000	0.453	0.498	0.507
CBFanat							
<i>p-value</i>	0.002	0.132	0.050	0.004		0.268	0.050
<i>coeff corr</i>	0.566	0.236	0.307	0.453	1.000	0.173	0.307
CBVmis							
<i>p-value</i>	0.004	0.000	0.000	0.002	0.268		0.000
<i>coeff corr</i>	0.516	0.831	0.724	0.498	0.173	1.000	0.760
CBFmis							
<i>p-value</i>	0.007	0.000	0.000	0.001	0.050	0.000	
<i>coeff corr</i>	0.479	0.733	0.769	0.507	0.307	0.760	1.000

Tabella 3. ANOVA dei gradi II, III, IV; intervallo di confidenza al 95%, significatività 95%(Abbreviazioni: Pwi= valore dei parametri di perfusione sulla mappa di perfusione; anat= anatomica; mis= mismatch; N= numerosità del campione; DS= deviazione standard).

	N	Media	DS	Minimo	Massimo	p-value
CBVpwi						
<i>II</i>	5	5.162	2.5427	2.0	8.1	0.010
<i>III</i>	2	13.770	6.8731	8.9	18.6	
<i>IV</i>	15	21.434	10.4942	12.4	43.2	
<i>Tot</i>	22	17.039	11.1938	2.0	43.2	
CBFpwi						
<i>II</i>	5	46.0120	27.91915	12.44	83.45	0.002
<i>III</i>	2	144.0300	113.88662	63.50	224.56	
<i>IV</i>	15	175.9533	59.67099	105.39	313.66	
<i>Tot</i>	22	143.5191	78.45388	12.44	313.66	
CBVanat						
<i>II</i>	5	7.500	4.55015	2.56	13.54	0.001
<i>III</i>	2	8.7800	2.43245	7.06	10,50	
<i>IV</i>	15	19.6267	5.68566	12.03	37.42	
<i>Tot</i>	22	15.8845	7.57128	2.56	37.42	
CBFanat						
<i>II</i>	5	77.818	58.1853	21.3	160.5	0.001
<i>III</i>	2	84.545	43.2820	53.9	115.2	
<i>IV</i>	15	174.757	41.8123	116.8	255.7	
<i>Tot</i>	22	144.524	62.8850	21.3	255.7	
CBVmis						
<i>II</i>	5	6.2500	3.39545	2.11	10.45	0.027
<i>III</i>	2	10.9150	10.91066	3.20	18.63	
<i>IV</i>	15	18.9667	9.43714	6.60	45.43	
<i>Tot</i>	22	15.3445	9.90811	2.11	45.43	
CBVmis						
<i>II</i>	5	56.2200	36.60995	12.40	104.71	0.039
<i>III</i>	2	127.1300	137.78683	29.70	224.56	
<i>IV</i>	15	161.4707	74.62451	70.47	331.56	
<i>Tot</i>	22	134.4282	82.79877	12.40	331.56	

Tabella 4. Comparazioni multiple con metodo di Bonferroni: i gradi sono stati confrontati tra loro; significatività al 95% (Abbreviazioni: Pwi= valore dei parametri di perfusione sulla mappa di perfusione; anat= anatomica; mis= mismatch).

Variab dipend	Grado	Differenza Medie	p-value
CBVpwi	2 3	-8.6080	0.835
	4	-16.2720	0.009
	3 2	8.6080	0.835
	4	-7.6640	0.850
	4 2	16.2720	0.009
CBFpwi	3	7.6640	0.850
	2 3	-98.01800	0.184
	4	-129.94133	0.001
	3 2	98.01800	0.184
	4	-31.92333	1.000
CBVanat	4 2	129.94133	0.001
	3	31.9233	1.000
	2 3	-1.2800	1.000
	4	-12.12667	0.001
	3 4	1.2800	1.000
CBFanat	2	-10.84667	0.043
	4 2	12.12667	0.001
	3	10.84667	0.043
	2 3	-6.7270	1.000
	4	-96.9387	0.002
CBVmis	3 4	6.7270	1.000
	2	-90.2117	0.051
	4 2	96.9387	0.002
	3	90.2117	0.051
	2 3	-4.66500	1.000
CBFmis	4	-12.71667	0.030
	3 2	4.66500	1.000
	4	-8.05167	0.689
	4 2	12.71667	0.030
	3	8.05167	0.689
CBFmis	2 3	-70.9100	0.787
	4	-105.25067	0.036
	3 2	70.9100	0.787
	4	-34.34067	1.000
	4 2	105.25067	0.036
	3	34.34067	1.000

Tabella 5. ANOVA dei bassi e degli alti gradi; intervallo di confidenza al 95%, significatività 95% (Abbreviazioni: Pwi= valore dei parametri di perfusione sulla mappa di perfusione; anat= anatomica; mis= mismatch; N= numerosità del campione; DS= deviazione standard).

	N	Media	DS	Differenza Medie	p-value
CBVpwi					
HGG	7	18.066	9.2674	12.9037	0.013
LGG	5	5.162	2.5427		
CBFpwi					
HGG	7	156.7800	37.99759	110.768	0.000
LGG	5	46.0120	27.91915		
CBVanat					
HGG	7	18.6514	8.81869	11.15143	0.028
LGG	5	7.5000	4.55015		
CBFanat					
HGG	7	173.159	55.2319	95.3406	0.016
LGG	5	77.818	58.1853		
CBVanat					
HGG	7	14.9986	5.53185	8.74857	0.011
LGG	5	6.2500	3.39545		
CBVanat					
HGG	7	131.7671	48.01924	75.54714	0.015
LGG	5	56.2200	36.60995		

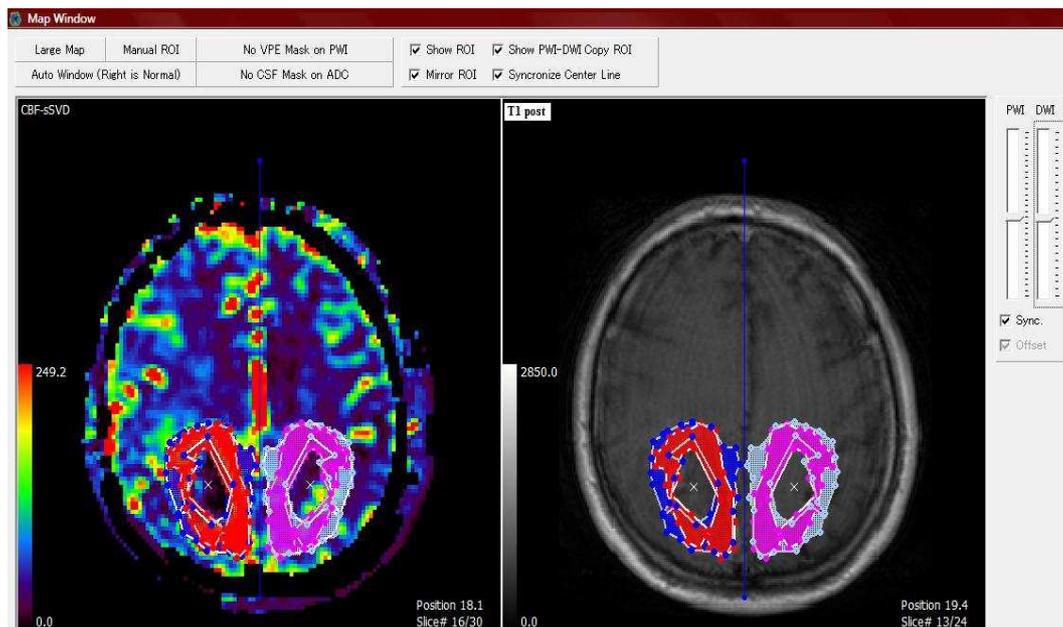


Figura 1. Schermata visualizzata con il programma Perfusion Mismatch Analyzer. A sinistra la mappa di perfusione (in questo caso di rCBF), a destra l'anatomica (in questo caso T1 post-mdc). In blu e rosso le regioni di interesse tracciate dall'operatore in corrispondenza dell'area di lesione rispettivamente su pwi e anatomica; in azzurro e rosa le stesse aree tracciate automaticamente dal programma sull'emisfero sano contro laterale, in modo speculare alla neoplasia.

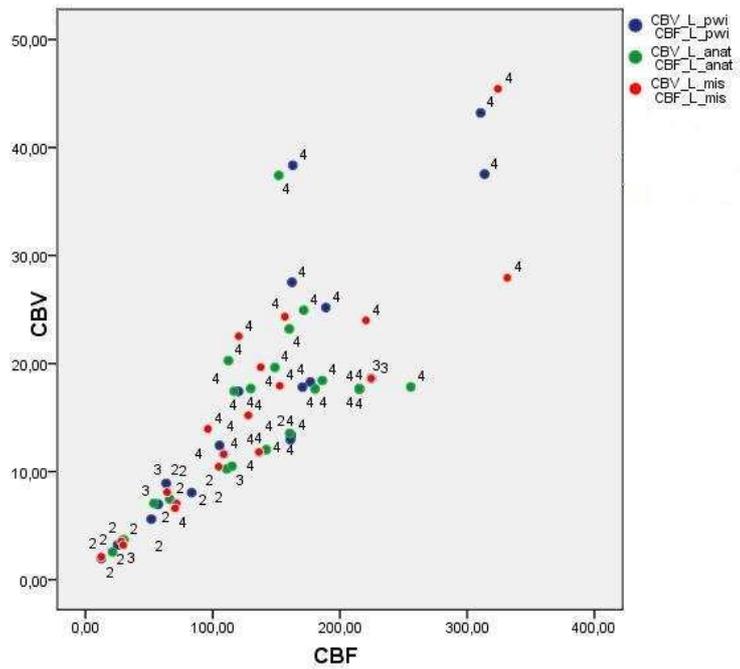


Figura 2. Nuvola dei punti di CBV e CBF. Aumento dei valori di CBV e CBF all'aumentare del grado.

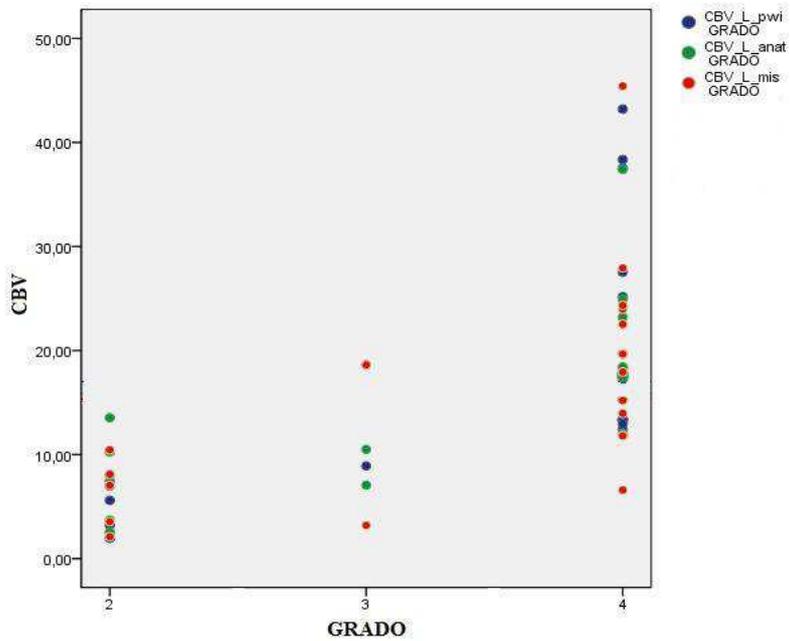


Figura 3. Grafico della distribuzione di rCBV rispetto al grado. Si può notare anche graficamente come sia effettivamente difficile distinguere secondo e terzo grado tra di loro. Ad ogni modo, all'aumentare del grado, aumenta il CBV.

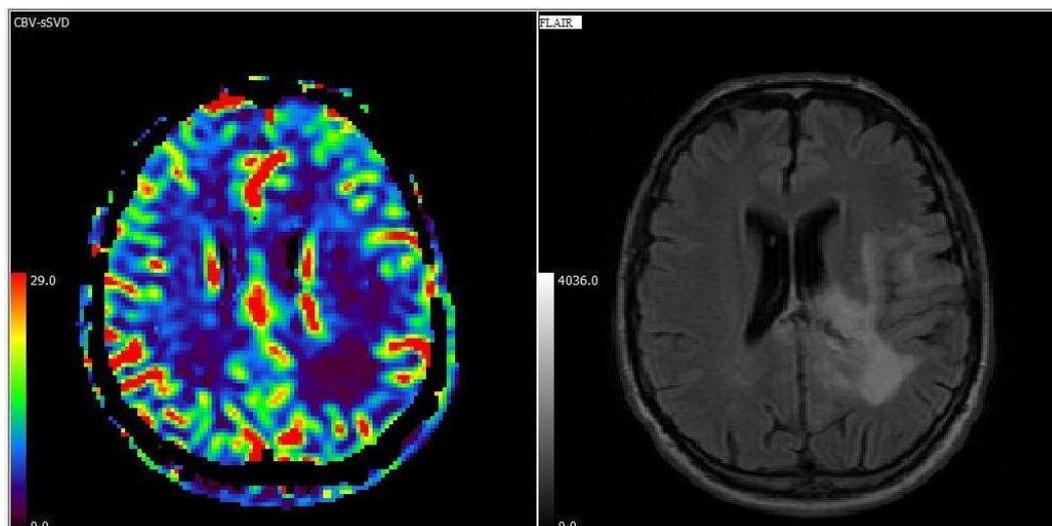


Figura 4. Perfusione nei bassi gradi, mappa pwi e FLAIR. Si noti la riduzione della perfusione in corrispondenza della lesione, per via della sofferenza tissutale (infiltrazione, edema).

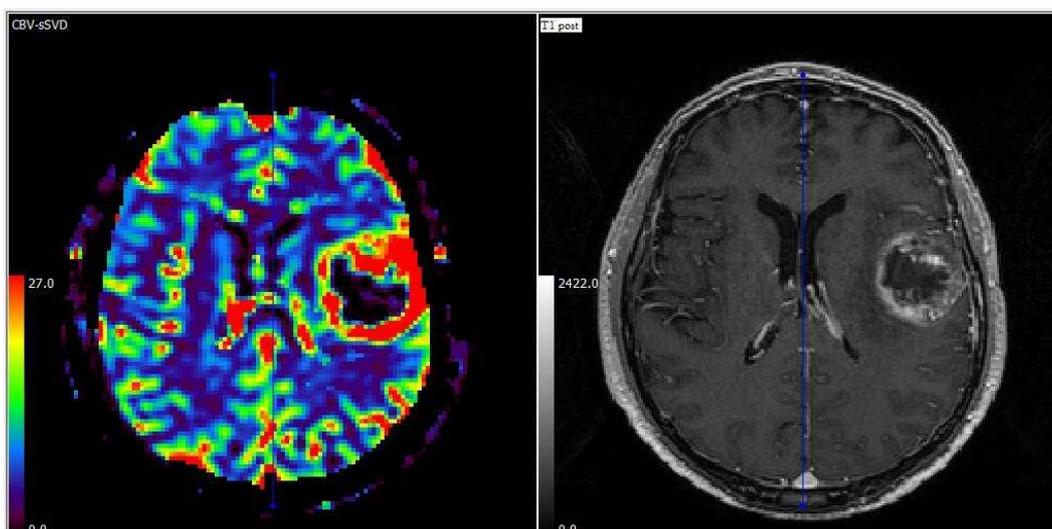


Figura 5. Perfusione negli alti gradi, mappa pwi e T1 post-mdc. Si noti l'aumento della perfusione in corrispondenza della lesione.

Bibliografia

1. Behin A, Hoang-Xuan K, Carpentier AF et al. Primary brain tumours in adults. *Lancet* 2003;361:323-331.
2. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *IARC Press*, Lione, FR 2007.
3. Figarella-Branger D, Colin C, Coulibaly B. Histological and molecular classification of gliomas. *Rev Neurol* 2008;164:505-515.
4. Ropper B, Samuels MA. Cerebral Tumours. In: Adams and Victor's Principles of Neurology, IX edition. *McGraw-Hill*, New York, NY 2009.
5. Cavaliere R, Lopes MBS, Schiff D. Low grade gliomas: an update on pathology and therapy. *Lancet Neurol* 2005;4:760-770.
6. Stupp R, Mason WP, van den Bent M et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant Temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987-995.
7. Kelly PJ, Dumas-Duport C, Scheithauer BW et al. Stereotactic histologic correlations of Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging-defined abnormalities in patients with glial neoplasms. *Mayo Clin Proc* 1987;62:450-459.
8. Price AC, Runge VM, Allen JH et al. Primary glioma: diagnosis with magnetic resonance imaging. *J Comp Tomogr* 1986;10:325-334.

9. Scott JN, Brasher PM, Sevick RJ et al. How often are nonenhancing supratentorial gliomas malignant? A population study. *Neurology* 2002;59:947-949.
10. Cha S. Perfusion MR imaging: basic principles and clinical applications. *Magn Reson Imaging Clin N Am* 2003;11:403-413.
11. Sorensen AG, Reimer P. Imaging di perfusione cerebrale: principi ed applicazioni correnti. *CIC Edizioni Internazionali*, 2002.
12. Jain RK, di Tomaso E, Duda DG et al. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neuroscience* 2007;8:610-622.
13. Schiffer D. Angiogenesis. In: Brain Tumors: biology, pathology and clinical references, second revised edition. *Springer*, Berlin, DH 1997.
14. Quantitative MRI of the brain: measuring changes caused by disease. *Wiley*, Philadelphia, USA 2003.
15. Modern functional imaging methods in neuroncology. *Wiley*, Philadelphia, USA 2002.
16. Maia AC, Malheiros SM, da Rocha AJ et al. MR cerebral blood volume maps correlated with vascular endothelial growth factor expression and tumor grade in nonenhancing gliomas. *Am J Neuroradiol* 2005;26:777-783.
17. Awasthi R, Rathore RK, Soni P et al. Discriminant analysis to classify glioma grading using dynamic contrast-enhanced MRI and immunohistochemical markers. *Neuroradiology* 2011;4:1-2
18. Dhermain F. Role of perfusion, vascular permeability and anatomic MR imaging in radiation therapy for gliomas. *Bullettin du Cancer* 2010;7:753-758.
19. Lev MH, Ozsunar Y, Henson JW et al. Glial tumor grading and outcome prediction using dynamic spin-echo MR susceptibility mapping compared with conventional contrast-enhanced MR: confounding effect of elevated rCBV of oligodendrogliomas. *Am J Neuroradiol* 2004;25:214-221.
20. Calli C, Kitis O, Yuntun N et al. Perfusion and diffusion MR imaging in enhancing malignant cerebral tumors. *Europ J Radiol* 2006;58:394-403.
21. Rimner A, Holodny AI, Hochberg FH. Perfusion magnetic resonance imaging to assess brain tumor responses to new therapies. *US neurological disease* 2006;1:1-6.
22. Law M, Young RJ, Babb JS et al. Gliomas: predicting time to progression or survival with cerebral blood volume measurements at dynamic susceptibility-weighted contrast-enhanced perfusion MR imaging. *Radiology* 2008;247:490-498.
23. Wenz F, Rempp K, Hess T et al. Effect of radiation on blood volume in low-grade astrocytomas and normale brain tissue: quantification with dynamic susceptibility contrast MR imaging. *Am J Roentgenol* 1996;166:187-193.
24. Price AC, Runge VM, Allen JH et al. Primary glioma: diagnosis with magnetic resonance imaging. *J Comp Tomogr* 1986;10:325-334.
25. Aronen HJ, Glass J, Pardo FS et al. Echo-planar MR cerebral blood volume mapping of gliomas. Clinical utility. *Acta Radiologica* 1995;36:520-528.