



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
Dipartimento di Scienze Neurologiche, Neuropsicologiche, Morfologiche e Motorie

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN
IMAGING MULTIMODALE IN BIOMEDICINA
CICLO XXIII

Carcinoma Coloretale: Nuove Metodiche Diagnostiche
Ricerche sperimentali con
Spettroscopia di Risonanza Magnetica

Coordinatore:
Ch.mo Prof. A. SBARBATI

Tutore:
Ch.mo Prof. C. CORDIANO

Dottoranda:
Dr.ssa ANNAMARIA MINICOZZI

ANNO ACCADEMICO 2009 - 2010

INDICE

ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	4-6
Bibliografia.....	6-8
CAPITOLO 1 – LA SPETTROSCOPIA	
1.1 Evoluzione della Spettroscopia.....	9-10
1.2 Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS).....	10-16
Bibliografia.....	16-17
CAPITOLO 2 – LA ¹H MRS NEI TUMORI UMANI NON COLORETTALI	
2.1 Applicazioni della ¹ H MRS nei tumori umani in vivo.....	18-21
2.2 Applicazioni della ¹ H MRS nei tumori umani ex vivo.....	21-27
Bibliografia.....	27-32
CAPITOLO 3 – LA ¹H MRS NEI TUMORI COLORETTALI	
3.1 L’Imaging clinico nel cancro del coloretto e del cancro del retto prima e dopo il trattamento neoadiuvante.....	33-52
3.2 Principali metaboliti neoplastici del tumore colorettaie.....	52-54
3.3 Applicazioni della ¹ H MRS nel tumore colorettaie umano in vivo... ..	54-55
3.4 Applicazioni della ¹ H MRS nel tumore colorettaie umano ex-vivo (su biopsie).....	55-57
Bibliografia.....	57-65
CAPITOLO 4 – RICERCHE SPERIMENTALI CON ¹H MRS EX VIVO NEL TUMORE COLORETTALE	
4.1 Obiettivi della ricerca.....	66
4.2 Materiali e Metodi	66-72
4.3 Risultati.....	72-78
4.4 Conclusioni.....	78-80
Bibliografia.....	80

ABSTRACT

Questa tesi di dottorato è stata elaborata nella prospettiva di studiare l'applicazione della spettroscopia di risonanza magnetica protonica (^1H MRS) nella possibile diagnosi istologica non invasiva dei polipi e del carcinoma coloretale.

In particolare, la sua utilizzazione nella stadiazione del cancro del retto dopo trattamento neoadiuvante (chemioradioterapia concomitanti), che risulta fortemente deficitaria con le metodiche tradizionali (EUS, MRI, TC e PET- TC), potrebbe consentire diagnosi più accurate soprattutto di risposte cliniche complete o di residuo minimo di malattia.

A tale scopo sono stati dapprima ricordati nella letteratura i risultati dell'uso delle metodiche di imaging tradizionali che non consentono scelte terapeutiche adeguate alla presenza della neoplasia, scelte che variano dalla astensione chirurgica ad interventi allargati e mutilanti.

E' stata rivista la utilizzazione su tumori umani (in vivo, ex-vivo e in studi sperimentali) della MRS, in modo specifico e più dettagliato, sul carcinoma coloretale.

Infine nell'ultima parte della tesi sono stati riportati scopi, metodi, apparati tecnologici e risultati della ricerca attuata, costituita dall'uso della ^1H MRS su pezzi operatori umani.

Parole chiave: spettroscopia di risonanza magnetica, carcinoma coloretale

ABSTRACT

This PhD thesis has been prepared with a view to the study of the application of proton magnetic resonance spectroscopy (^1H MRS) in the possible non-invasive histological diagnosis of colorectal polyps and cancer.

In particular, its use in staging of rectal cancer after neoadjuvant treatment (concurrent chemoradiotherapy), which is heavily deficient with traditional methods (EUS, MRI, CT and PET-CT), could allow more accurate diagnosis, overall of clinical complete responses or minimal residual disease.

choices ranging from abstention widened and mutilating surgical interventions. For this purpose, the results of the use of traditional imaging methods have been first of all remembered in the literature, results which do not allow appropriate therapeutic choices for cancer, ranging from surgical abstention to extended operations.

The use of the MRS on human tumors (in vivo, ex vivo and in experimental studies) was reviewed, in a more specific and detailed matter, on colorectal carcinoma.

Finally in the last part of the thesis aims, methods, technological equipments and results of implemented research, made of use of ¹H MRS on human surgical specimens, have been reported.

Keywords: magnetic resonance spectroscopy, colorectal cancer

INTRODUZIONE

In Europa il cancro del coloretto (CCR) è la terza forma tumorale per frequenza nell'uomo dopo quella del polmone e della prostata e la seconda nella donna dopo quella della mammella (1).

In Italia l'Istituto Superiore di Sanità ha stimato che il tasso di incidenza standardizzato per età è aumentato dal 1970 al 2010 da 30 a 70 per 100.000 abitanti negli uomini e si è stabilizzato a circa 38 per 100.000 nelle donne (2).

Attualmente, il rischio di avere una diagnosi di CCR nel corso della vita è del 9% nei maschi e del 5.9% nelle femmine, mentre il rischio di morire per questa causa è del 3.8% negli uomini e del 2.1% nelle donne (3).

La percentuale media di sopravvivenza relativa standardizzata a 5 anni dalla diagnosi è del 57.5% in Italia e del 53.5% in Europa (4,5).

Un recente studio prospettico ha evidenziato che in Italia, nonostante i progressi registrati dal 1984 al 2004, ancora oggi quasi il 50% dei CCR sono diagnosticati in stadio avanzato (III-IV), condizionando pesantemente la prognosi di questi pazienti strettamente dipendente dallo stadio di malattia (6).

La percentuale di sopravvivenza a 5 anni, infatti è del 94.7% se la neoplasia viene riconosciuta al I stadio, dell'80.8% al II stadio, del 66.1% al III stadio e solo del 6.2% per i tumori al IV stadio (7).

Diversi sono i risultati in termini di recidive locali e a distanza, di overall survival e disease free survival nei casi di cancro del retto.

Il trattamento neoadiuvante, proposto circa 20 anni fa per la cura del cancro del retto (8, 9), si è dimostrato molto valido per abbassare il tasso di recidive locali della malattia; si tratta di una procedura lunga e complessa che utilizza radio e

chemioterapia concomitante e obbliga a conoscere la reale diffusione neoplastica locoregionale, sia nella fase pre che post-trattamento.

I risultati sono significativi e ormai in tutte le casistiche , ad 8-12 settimane dalla fine della chemioradioterapia (10, 11,12) , l' assenza di malattia è diagnosticata nel 20%-30% dei casi con verifica istopatologica (13).

I pazienti con risposta clinica completa pongono delicati problemi di scelta terapeutica , considerato che la storia naturale della malattia extrarettale ha il suo decorso indipendentemente dal trattamento locale della neoplasia.

La diagnosi preoperatoria di risposta clinica completa non è accurata in più del 50% dei casi.

Si comprende come l'assenza di una certezza diagnostica post-neoadiuvante abbia fornito l'occasione per scelte chirurgiche le più disparate: interventi exeretici tradizionali, trattamenti chirurgici conservativi (Transanal Endoscopic Microsurgery o Local excision) (14,15), e addirittura uno stretto e intenso follow-up senza alcun trattamento che nell'esperienza del gruppo di Habr-Gama ha fornito interessanti risultati (16, 17).

Per tutti questi motivi appare evidente la necessità di cercare e verificare nuovi modelli di imaging che consentano diagnosi accurate dopo trattamento neoadiuvante. La MRI e la TC-PET al momento attuale sono le metodiche più utilizzate per valutare la risposta al trattamento neoadiuvante.

I risultati tuttavia restano fortemente deludenti sul piano dell'accuratezza non solo nei casi di minimal residual disease o di micrometastasi linfonodali, in cui qualunque strumento diagnostico è inefficace, ma anche in molti casi di regressione neoplastica incompleta .

Anche la MRI 3 Tesla non ha finora fornito risultati apprezzabili pur aumentando la risoluzione spaziale.

La spettroscopia di risonanza magnetica (MRS) che si va diffondendo nello studio di molte neoplasie e in alcuni casi è entrata nella routine diagnostica, appare di grande interesse perché fornisce informazioni metaboliche che caratterizzano il tessuto neoplastico anche prima che si verifino cambiamenti macroscopici del tessuto stesso (18).

Lo studio dei metaboliti in alcuni casi pare essere un marker importante della presenza di tumore, confermando così l'espressione: "Magnetic Resonance Spettroscopy as a probe of tumor metabolism" (19).

Attualmente, sono certe le potenzialità della metodica nella diagnosi istologica dei tumori cerebrali, della mammella e della prostata, mentre gli studi di spettroscopia sul cancro del colon e del retto sono tutt'ora scarsi e sono stati realizzati principalmente ex-vivo.

Questa ricerca è basata sulla ipotesi che la spettroscopia possa fornire un utile apporto alla diagnosi della diffusione neoplastica prima della chemioradioterapia e delle risposte cliniche complete dopo trattamento neoadiuvante, favorendo così le scelte terapeutiche.

BIBLIOGRAFIA

Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. **Ann Oncol.** 2007 Mar;18(3):581-92. Epub 2007 Feb 7.

1. Grande E, Inghelmann R, Francisci S, Verdecchia A, Micheli A, Baili P, Capocaccia R, De Angelis R. Regional estimates of colorectal cancer burden in Italy. *Tumori.* 2007 Jul-Aug;93(4):352-9.

2. AIRTUM working group. I tumori in Italia – Rapporto 2009. Nuovi dati di incidenza e mortalità. *Epidemiol Prev* 2009; 33:1-26.

3. Verdecchia A, Francisci S, Brenner H, Gatta G, Micheli A, Mangone L, Kunkler I; EURO CARE-4 Working Group. Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EURO CARE-4 data. *Lancet Oncol.* 2007 Sep;8(9):784-96.

4. AIRTUM working group. La sopravvivenza per tumour in Italia è nella media europea. *Epidemiol Prev* 2008;32:265.

5. Ciccolallo L, Capocaccia R, Coleman MP, Berrino F, Coebergh JW, Damhuis RA, Faivre J, Martinez-Garcia C, Møller H, Ponz de Leon M, Launoy G, Raverdy N, Williams EM, Gatta G. Survival differences between European and US patients with colorectal cancer: role of stage at diagnosis and surgery. *Gut.* 2005 Feb;54(2):268-73.

6. Ponz de Leon M, Rossi G, di Gregorio C, De Gaetani C, Rossi F, Ponti G, Pecone L, Pedroni M, Roncucci L, Pezzi A, Benatti P. Epidemiology of colorectal cancer: the 21-year experience of a specialised registry. *Intern Emerg Med.* 2007 Dec;2(4):269-79. Epub 2007 Nov 29.

7. Marks G, Mohiuddin MM, Masoni L, Pecchioli L. High-dose preoperative radiation and full-thickness local excision: a new option for patients with select cancer of the rectum. *Dis Colon Rectum* 1990; 33(9): 735-739
8. Mohiuddin M, Marks G, Bannon J. High-dose preoperative radiation and full-thickness local excision: a new option for selected T3 distal rectal cancer. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys* 1994; 30 (4): 845-849
10. Tulchinsky H, Shmueli E, Figer A, Klausner JM, Rabau M. An interval >7 weeks between neoadjuvant therapy and surgery improves pathologic complete response and disease-free survival in patients with locally advanced rectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2008 Oct;15(10):2661-7. Epub 2008 Apr 4.
11. Lim SB, Choi HS, Jeong SY, Kim DY, Jung KH, Hong YS, Chang HJ, Park JG. Optimal surgery time after preoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancers. *Ann Surg*. 2008 Aug;248(2):243-51.
12. Kalady MF, de Campos-Lobato LF, Stocchi L, Geisler DP, Dietz D, Lavery IC, Fazio VW.
Predictive Factors of Pathologic Complete Response After Neoadjuvant Chemoradiation for Rectal Cancer.. *Ann Surg*. 2009 Aug 25.
13. Maas M, Nelemans PJ, Valentini V, Das P et al. Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer : a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2010; 11:835-844.
14. Lezoche G, Baldarelli M, Paganini et al. A prospective randomised study with a 5 year minimum follow-up evaluation of transanal endoscopic microsurgery versus laparoscopic total mesorectal excision after neoadjuvant therapy. *Surg Endosc* 2007
15. Moore JS, Cataldo PA, Osler T, Hyman NH. Transanal Endoscopic Microsurgery is more effective than traditional transanal excision for resection of rectal masses. *Dis Colon Rectum* 2008; 51: 1026-1031.
16. Habr-Gama A, Perez RO. Non-operative management of rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation. *Br J Surg* 2009; 96: 125-127.
17. Habr-Gama A, Perez RO, Proscurshim I, Gama-Rodrigues J. Complete Clinical Response after neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2010; 19 (4): 829-845.

18. Bezabeh T, Smith IC, Krupnik E, Somorjai RL, Kitchen DG, Bernstein CN, Pettigrew NM, Bird RP, Lewin KJ, Briere KM. Diagnostic potential for cancer via ¹H magnetic resonance spectroscopy of colon tissue. *Anticancer Res.* 1996 May-Jun;16(3B):1553-8.
19. Gadian DG. Magnetic resonance spectroscopy as a probe of tumour metabolism. *Eur J Cancer.* 1991;27(5):526-8.

CAPITOLO 1 – LA SPETTROSCOPIA

Evoluzione della spettroscopia

Il fenomeno della Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) si fonda sullo spin nucleare, una caratteristica delle particelle atomiche .

L'interazione elettromagnetica tra nuclei che hanno una carica e lo stimolo radiante provoca un assorbimento e poi una conseguente emissione di segnale determinato da un ritorno alle condizioni iniziali dei nuclei.

Questo fenomeno è stato studiato per la prima volta nel 1946 (1, 2).

Nel 1952, il Premio Nobel è stato assegnato congiuntamente a Felix Bloch e Edward Mills Purcell per aver contribuito allo sviluppo di nuovi metodi e applicazioni della risonanza magnetica nucleare.

Bloch ha dato il nome alle equazioni che descrivono l'effetto delle radiazioni elettromagnetiche nel nucleo, ma la potenzialità della risonanza magnetica nucleare è stata intuata da Ernest Anderson (1966), che per primi hanno impiegato l'impulso a radiofrequenza combinato con la trasformata di Fourier su un nucleo sottoposto ad un campo magnetico.

Questo rappresenterà il principio cardine della spettroscopia.

Nel 1971, Damadian riesce a differenziare le caratteristiche del tessuto sano rispetto a quello tumorale, evidenziando l'utilità diagnostica della risonanza magnetica (3) .

Saranno Lauterbur e Mansfield a sviluppare la teoria e l'hardware in grado di trasformare il rilassamento nucleare in immagine di risonanza (4, 5). Questo consentirà la realizzazione di nuove apparecchiature di risonanza magnetica che verranno impiegate per ricerche scientifiche cliniche e pre-cliniche.

Il primo spettro di risonanza magnetica di un tessuto sano è stato riportato nel 1974 (6).

Il primo spettro al ^{31}P è stato realizzato sul tessuto muscolare sano del ratto e ha dimostrato le potenzialità della metodica in vivo.

Nel 1981 la spettroscopia al ^{31}P viene realizzata sul muscolo umano e ha consentito di individuare i cambiamenti metabolici indotti dalle malattie (7).

Nel 1983 iniziano i primi studi clinici; Radda studia il metabolismo dei muscoli dell'adulto(8) e nello stesso anno Cady studia il metabolismo cerebrale dei neonati (9).

In questi anni le apparecchiature di risonanza magnetica sono ancora inadeguate e la risoluzione degli spettri sono fortemente insufficienti.

Con lo sviluppo di magneti a più alto campo magnetico si incrementerà l'impiego della spettroscopia per studi clinici a partire dal 1996 (10), non solo per la diagnosi, ma anche per la prognosi e il monitoraggio di molte patologie.

Anche le maggiori conoscenze del metabolismo neoplastico sta aiutando ad individuare nuovi markers nei vari tumori umani.

Infine vi è, negli ultimi anni, un consistente apporto di nuovi metodi e di nuovi traccianti.

1.2. Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS)

La Magnetic resonance spectroscopy (MRS) è una metodica di studio che consente di ottenere informazioni metaboliche dei tessuti sani o patologici in vitro attraverso la spettroscopia ad alta risoluzione (HR-NMR High Resolution nuclear Magnetic Resonance) ed ex vivo attraverso per esempio la HR-MAS-NMR (High Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance).

Le prime applicazioni medico-biologiche risalgono agli anni '70 e sono state realizzate per studiare i liquidi biologici.

Successivamente si è assistito ad un progressivo utilizzo della MRS in vivo in ambito clinico, grazie al miglioramento delle apparecchiature di risonanza magnetica cliniche che consentono una ottimizzazione dei tempi e migliori acquisizioni.

Principi Fisici

Il principio fisico su cui si fonda la spettroscopia di risonanza magnetica si basa sulla natura quanto-meccanica della materia, in particolare la proprietà di spin dei suoi nuclei. In presenza di un campo magnetico statico, che si può chiamare B_0 , la direzione attorno alla quale si ha il moto di precessione degli spin si allinea parallelamente alla direzione del campo B_0 .

Quando viene applicato un impulso a radio frequenza opportunamente calibrato, si crea un campo magnetico oscillante che provoca una variazione dello spin. Dopo l'interruzione dell'impulso, lo spin "rilassa" ovvero ritorna alla direzione originaria.

La variazione di campo magnetico che viene di conseguenza prodotta dal rilassamento è quello che viene chiamato Free Induction Decay (FID) e ha una componente esponenziale e una oscillante avente una certa frequenza.

La frequenza (f) a cui risuonano i nuclei viene descritta dall'equazione di Larmor

$$f = \gamma B_0$$

dove B_0 è l'intensità del campo magnetico e γ è il rapporto giromagnetico nucleare. Per il protone di Idrogeno (H) γ è uguale a 42.58 MHz/Tesla (11).

Tutti i nuclei protonici hanno la stessa frequenza di Larmor, ma il differente intorno chimico determina una variazione di questa frequenza di oscillazione durante il rilassamento viene descritta da:

$$f = \gamma B_0 (1 - \sigma_{cs})$$

dove σ_{cs} è una costante di carica nucleare che dipende dalla schermatura e dai legami con l'intorno chimico circostanti e ha valori prossimi allo zero ma non nulli (12).

Questo piccolo cambiamento in frequenza determinato da σ_{cs} sta alla base della spettroscopia di risonanza magnetica.

Nell'imaging di risonanza magnetica, si osservano il tempo e le modalità di rilassamento dell'acqua, e l'informazione spaziale si ottiene grazie ai gradienti di campo magnetico che sono attivati sul piano trasversale rispetto alla direzione del campo B_0 .

Nella spettroscopia di risonanza invece non solo si può osservare il rilassamento del segnale dell'acqua ma, grazie agli impulsi di soppressione di tale segnale, al rilassamento degli altri metaboliti che, avendo appunto un intorno chimico differente, rilassano con frequenze differenti.

In ambito clinico i nuclei usualmente esaminati sono l'idrogeno (^1H), il fosforo (^{31}P) e il fluoro (^{19}F) e il carbonio (^{13}C).

Ognuno di essi, oltre quelli precedentemente descritti, consente lo studio di specifici metabolici ed ha una applicazione particolare (tab. 1).

Tab. 1

Isotopo	Frequenza (rel. ¹ H)	Abbondanza naturale (%)	Sensibilità (rel 1H)	Applicazione
¹ H	1.00	99.98	100	Metabonomica in vivo
¹⁹ F	0.94	100	83	Ossigeno, pH, traccianti
³¹ P	0.41	100	6.6	Bioenergetica, lipidi
²³ Na	0.26	100	9.3	Cellularità, energetica
¹³ C	0.25	1.1	0.016	Metabolismo intermediario
² H	0.15	0.0156	0.00015	Perfusione

La ¹H MRS rappresenta ad oggi la metodica usualmente utilizzata a scopo clinico perché permette di ottenere spettri ad alta risoluzione da piccoli volumi di interesse e di individuare numerosi metabolici con diverso significato biochimico.

La ³¹P MRS è una tecnica di risonanza magnetica, che è possibile implementare su sistemi di RM ad uso clinico, dotando l'apparecchiatura di hardware e software opportuni. Essa consente di determinare il pH intracellulare e di studiare il metabolismo energetico in vivo, e cioè il ruolo svolto dalla glicolisi e dalla fosforilazione ossidativa. Rispetto alla spettroscopia protonica, quella al fosforo è caratterizzata da una bassa sensibilità (a causa del basso rapporto giromagnetico della specie chimica) e da una minore risoluzione spaziale, ma è in grado di fornire un quadro piuttosto completo dei flussi energetici nei sistemi biologici.

La ¹⁹F MRS ha un'alta sensibilità ed è utilizzata per monitorizzare i farmaci e gli anestetici contenenti fluoro in vivo e in vitro. Con tale spettroscopia viene monitorizzata la risposta alle terapie con 5-Fluorouracile in vivo.

La ¹³C MRS ha una bassa sensibilità e la sua abbondanza naturale è solo dell'1.1%; questo significa che solo questa percentuale di nuclei contribuisce alla creazione del segnale di NMR per cui lo spettro ottenuto è molto semplice.

La sua applicazione si realizza maggiormente sul cuore e cervello.

La sensibilità di rivelazione e quindi la specificità dell'indagine delle tecniche di spettroscopia multinucleare può essere aumentata da una parte con l'utilizzo di campi magnetici più elevati, shimming (ovvero omogeneità del campo magnetico) migliore e dall'altra con l'implementazione di tecniche di editing del segnale e con la programmazione di nuove sequenze di acquisizione.

Segnale di risonanza magnetica: in spettroscopia, l'intensita' del segnale di MR è proporzionale al numero di protoni. Il dato spettroscopico è acquisito nel dominio del tempo e può essere visualizzato in termini di frequenza per mezzo della trasformata di Fourier (FFT) (12). Nel dominio di frequenza, l'area sotto uno specifico picco è proporzionale al numero di protoni che rilassano a quella determinata frequenza (nel caso della spettroscopia al protone, mentre sarà il numero di nuclei di carbonio nel caso della C-MRS, dei nuclei di fosforo nella P-MRS e così via).

Inoltre l'omogeneità di campo magnetico determina il tempo di rilassamento dello spin: maggiore è l'omogeneità del campo magnetico locale, più lungo sarà il tempo di rilassamento. Questo si traduce in una minore ampiezza o FWHM (Full Width Half Maximum) del segnale nel dominio delle frequenze, e quindi sarà possibile distinguere segnali che risuonano con frequenze vicine. Questo determina la differenza in risoluzione tra la spettroscopia in vitro e quella in vivo: la prima possiede una omogeneità di campo più elevata della seconda, di conseguenza è possibile distinguere più segnali. Quindi la qualità e la quantità di informazioni è fortemente determinata dall'omogeneità.

L'omogeneità dipende anche dal campione preso in esame: più gli spin sono mobili all'interno del campione, migliore omogeneità è possibile ottenere. Questo valore, oltre che a essere determinato dallo stato della materia preso in esame, dipende anche dalla temperatura.

Rappresentazione del segnale

Nel dominio della frequenza, l'asse delle ascisse può essere espresso in termini di Hz o ppm (parts per million).

Esprimere la frequenza in termini di ppm permette il confronto di segnali spettroscopici acquisiti con diversa intensità di campo magnetico.

Il ppm viene calcolato dalla seguente formula:

$$\delta \text{ cs} = (f_s - f_{\text{ref}}) / (f_{\text{ref}} \times 10^{-6})$$

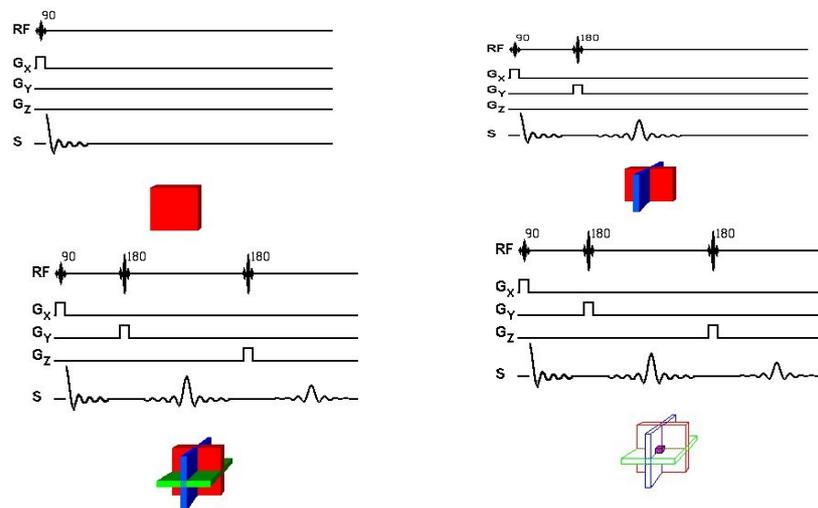
dove f_s è la frequenza del segnale ed f_{ref} la frequenza del segnale di riferimento: ad esempio nella spettroscopia del cervello l'NAA (N-Acetyl Aspartato) a 2.01 ppm oppure il segnale dell'acqua non soppressa a 4.7 ppm vengono utilizzati come riferimento (13).

Nella spettroscopia ad alta risoluzione il TMS (Tetramethyl-silane) o il DSS (2,2 Dimethyl-2-silapentane -5-Sulfonate) costituiscono il riferimento (0.00 ppm) (14).

Secondo l'opinione di molti l'acqua non è un buon riferimento, perché la distanza in frequenza tra l'acqua e gli altri metaboliti può essere influenzata dalla temperatura e/o dal pH del tessuto preso in esame.

Spettroscopia di volume (SVA, Single Voxel Acquisition): Le sequenze utilizzate nella 1H MRS in vivo sono la STimulated Echo Acquisition Mode (STEAM) e la Point-RESolved Spectroscopy (PRESS) (15, 16). Entrambe utilizzano 3 impulsi di radiofrequenze selettive che si intersecano con i gradienti di campo magnetico, in modo da definire il volume di interesse (VOI). La fig. 1 mostra una sequenza

Fig. 1: sequenza PRESS



Come spiegato precedentemente, successivamente ai 3 impulsi RF, gli spin rilassano producendo un FID (Free Induction Decay) (17).

Le sequenze PRESS (con impulsi di 90° - 180° - 180°) e STEAM (90° - 90° - 90°) si differenziano per il diverso spostamento dello spin indotto dall'impulso e per gli intervalli di tempo tra gli impulsi stessi (Fig. 2). Attraverso la sequenza PRESS è possibile ottenere un migliore rapporto segnale rumore (S/N) e una risoluzione spettrale superiore rispetto alla STEAM (18).

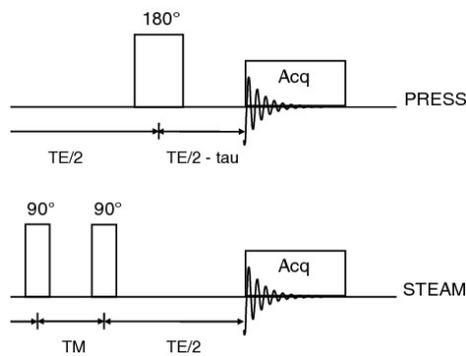


Fig.2: Sequenze PRESS e STEAM: schema riassuntivo

Il segnale dell'acqua ha una intensità pari a 1/1000 rispetto alla maggior parte dei metaboliti presenti nel tessuto. Per questo vengono utilizzate per l'indagine metabolica delle sequenze di soppressione dell'acqua (VAPOR Variable Pulse power and Optimized Relaxation delays, CHESS CHemical Shift Selected pulses) che precedono le sequenze di acquisizione del segnale. La bontà della soppressione viene impostata manualmente o automaticamente, e dipende fortemente dall'omogeneità del campo (18).

Chemical shift imaging (CSI): STEAM e PRESS possono essere impiegati per acquisire dati da voxel multipli tramite il chemical shift imaging (CSI) (16, 19).

Il CSI consente un miglior rapporto segnale/rumore rispetto alla SVA. Le informazioni su multipli voxel vengono raccolte in un minor tempo. Tuttavia, l'omogeneità di campo magnetico è in questo tipo di acquisizioni inferiore, e questo compromette la soppressione del segnale dell'acqua e quindi la risoluzione dello spettro acquisito (20-24).

Spettroscopia 2D: per l'indagine in vivo, la SVA e la CSI sono le tecniche maggiormente utilizzate. Tuttavia anche le tecniche bidimensionali, usualmente e largamente utilizzate in vitro ed ex vivo dall'HR-NMR e HR-MAS NMR, si stanno sviluppando anche per il campo clinico, in particolare le sequenze L-COSY e JPRESS. Queste permettono di distinguere e valutare i metaboliti che sono presenti negli spettri in vivo ma che sono indistinguibili dagli altri segnali quando sono acquisiti mediante la spettroscopia localizzata a bassi campi.

Queste sequenze evidenziano la diversa struttura della molecola presa in esame attraverso i cosiddetti “cross peaks”, che sono presenti quando due code chimiche sono vicendevolmente influenzate a seconda della loro posizione spaziale nella struttura chimica.

BIBLIOGRAFIA

1. Bloch F, Hansen WW , Packard HE. Nuclear induction . Phys.Rev.1946; 69:127
2. Purcell EM, Torrey HC, Pound RV. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. Phys.Rev ; 1946, 69: 37
3. Damadian , R., Goldsmith, M. AND Minkoff, L.(1977) NMR in cancer : XVI. FONAR image of the live human body. Physiol. Chem. Phys. 9,97.
4. Lauterbur, P.C. (1973) Image formation by induced local interactions: Examples employing nuclear magnetic resonance. Nature 242, 190.
5. Mansfield, P. and Pykett, I.L. (1978) Biological and medical imaging by NMR. J. MAGNET. Reson. 29, 355.
6. Hoult, D.I., Busby, S.J.W., Gadian, D.G., Radda, G.K., Richards, R. E. and Seeley, P.J. (1974) Observation of tissue metabolites using ³¹P nuclear magnetic resonance. Nature 252, 285.
- 7 Ross, B.D., Radda, G.K., Gadian, D.G., Rocker, G., Esiri, M. and Falconer-Smith, J. (1981) Examination of a case of suspected McArdle’s syndrome by ³¹P nuclear magnetic resonance. New Eng. J. Med. 304, 1338.
- 8 Radda, G.K., Bore, P.J. and Rajagopalan, B.(1983) Clinical aspects of ³¹P NMR spectroscopy. Br. Med. Bull. 40, 155.
- 9 Cady, E. B., Costello, A. M., Dawson, J.M., Delpy, D.T., Hope, P.L., Reynolds, E.O., Tofts, P.S., and Wilkie, D.R. (1983) Non invasive investigation of cerebral metabolism in newborn infants by phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy. Lancet 8333, 1059.
- 10 Young, I.R. and Charles, H. C. (eds)(1996) MR spectroscopy clinical applications and techniques. M Dunitz, London.
- 11 P. G. Webb, N. Sailasuta, S. J. Kohler, T. Raidy, R. A. Moats, and R.E. Hurd, “Automated single-voxel proton MRS: Technical development and multisite verification,” Magn. Reson. Med 31, 365-373 (1994).

- 12 . W. Cooley and J.W. Tukey, "An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series," *Math. Comput.* 19,297-301 (1965).
- 13 Ishihahara, A. Calderon, H. Watanabe, K. Okamoto, Y. Suzuki, K. Kuroda, and Y. Suzuki, "A precise and fast temperature mapping using water proton chemical shift," *Magn. Reson. Med.* 34, 814-823 (1995).
- 14 . Govindaraju, K. Young, and A. A. Maudsley, "Proton NMR chemical shifts and coupling constants for brain metabolites," *NMR Biomed.* 13, 129-153 (2000).
- 15 . Frahm, K. Merbolt, and W. Hanicke, "Localized proton spectroscopy using stimulated echoes," *J. Magn. Reson.* 72, 502-508 (1987).
- 16 . A. Bottomley, "Spatial localization in NMR spectroscopy in vivo," *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 508, 333-348 (1987).
- 17 C. Hoch and A. S. Stern, *NMR Data Processing* (Wiley- Liss, New York, 1996).
- 18.C. T. Moonen, M. von Kienlin, P. C. van Zijl, J. Cohen, J. Gillen, P. Daly, and G. Wolf, "Comparison of single-shot localization methods (STEAM and PRESS) for *in vivo* proton NMR spectroscopy," *NMR Biomed.* 2, 201-208 (1989).
19. Salibi and M. A. Brown, *Clinical MR Spectroscopy: First Principles* (Wiley-Liss, New York,1998).
- 20 . H. Duyn, J. Gillen, G. Sobering, P. C. M. van Zijl , and C. T. W. Moonen, "Multisection proton MR spectroscopy imaging of the brain," *Radiology* 188, 277-282 (1993)
- 21 R. Brown, B. M. Kincaid, and K. Ugurbil , "NMR chemical shift imaging in three dimensions," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 3523-3526 (1982).
22. C. Shungu and J. D. Glickson, "Sensitivity and localization enhancement in multinuclear *in vivo* NMR spectroscopy by outer volume presaturation," *Magn. Reson. Med.* 30, 661-671 (1993).
23. Adalsteinsonn, P. Irarrazabal, S. Tropp, C. Meyer, A. Macovski, and D. M. Spielman, "Volumetric spectroscopic imaging with spiral-based k-space trajectories," *Magn. Reson.Med.* 39 889-898 (1998).
- 24 Posse, G. Tedeschi, R. Risinger, R. Ogg, and D. Le Bihan, "High speed 1H spectroscopic imaging in human brain by echo planar spatial-spectral encoding," *Magn. Reson. Med.* 33, 34-40 (1995).

CAPITOLO 2 – LA ¹H MRS NEI TUMORI UMANI NON COLORETTALI

Applicazioni della ¹H MRS nei tumori umani in-vivo

Nella pratica clinica la MRS è eseguita in organi poco mobili ed omogenei. Il cervello, in particolare, è l'organo studiato maggiormente perché è contenuto nella teca cranica, è più o meno sferico ed ha un alto grado di omogeneità.

I fattori che influenzano la qualità dell'esame spettroscopico sono principalmente, le dimensioni della lesione, il movimento del paziente e la presenza di aria vicino alla sede di acquisizione dell'immagine.

I tumori gastrointestinali si prestano poco alle analisi spettroscopiche proprio per i motivi sopraelencati. Nei casi in cui il tumore cresce circonferenzialmente si può avere un'intrappolamento di aria nella massa che impone l'impiego di voxel più piccoli per l'acquisizione di aree non contenenti aria. Il numero e la frequenza di metaboliti, invece, è da attribuire alle caratteristiche strutturali del tumore.

L'unica esperienza su visceri cavi, in vivo, sull'uomo, è stata realizzata nel cancro del retto (1) (vedi pag.48).

Negli anni recenti la metodica si è arricchita di esperienze cliniche; sono stati individuati nuovi metaboliti in diversi tumori, gli apparati tecnologici sono diventati più potenti e sono state utilizzate nuove metodiche.

Si profila ormai nella pratica clinica un nuovo capitolo diagnostico: “ l'imaging metabolico”.

La MRS appare densa di prospettive nella diagnosi istologica non invasiva della neoplasia, tenuto conto delle problematiche riferite a proposito della scarsa accuratezza diagnostica delle metodiche tradizionali per il cancro del retto.

Tumori del cervello: nella pratica clinica la ¹H MRS è molto diffusa soprattutto nella diagnosi di tumori cerebrali.

L'esperienza è stata realizzata nel proposito di proporre la spettroscopia per la diagnosi istologica non invasiva.

Il tessuto cerebrale con neoplasia è caratterizzato da una riduzione della N-acetyl-aspartate (marker neuronale) e della creatina (indicatore di energia cellulare), e da un incremento della colina (marker di proliferazione cellulare) rispetto al tessuto cerebrale sano.

In genere il rapporto colina/creatina è incrementato nei tumori ad alto grado, mentre il rapporto mioinositolo/creatina diminuisce (2-5).

Registando il rapporto colina/creatina è possibile realizzare una mappa spettroscopica che identifica l'attività neoplastica in ogni sede in modo da guidare correttamente la biopsia.

Empiricamente, se il rapporto colina/creatina è > 2 il tessuto è neoplastico, se è 1.5-2 vi è un sospetto di infiltrazione neoplastica.

In molti studi condotti con controlli istologici, la ^1H MRS è una tecnica molto sensibile che può differenziare i gliomi ad alto grado da quelli a basso grado (6-8), tumori non neurogliali (meningiomi, adenomi, schwannomi e papillomi) e metastasi cerebrali da tumori della mammella, del polmone e del rene (9).

Anche i metaboliti della regione peritumorale sono stati studiati al fine di definire le caratteristiche del tumore. Chawla (10) riesce a distinguere i glioblastomi dai linfomi cerebrali primari ed entrambi dalle metastasi.

Aggiungendo l' ^1H MRS alla MRI, in rapporto al tipo di lesione e al grading, si ha un incremento delle diagnosi corrette del 15 %, una riduzione del 6.2% delle diagnosi errate e una riduzione delle diagnosi dubbie del 16% (8).

In alcuni studi in cui è stata realizzata la multivoxel 3D MRS (11). Quando era presente un aumento della colina con valore dell' N-Acetil-Aspartato basso rispetto a valori normali riscontrati nei tessuti non neoplastici, si trattava in tutti i casi di un'area tumorale.

Se la colina e l' N-Acetil-Aspartato avevano valori più bassi rispetto al tessuto sano, il riscontro istologico era di necrosi indotta da radiazioni, astrogliosi, infiltrazione macrofagica o tumore con diverso grading.

Con la tecnica multivoxel è possibile, inoltre, guidare le biopsie e consentire trattamenti focali.

Il gruppo della Mountford (12) ha proposto un uso della ^1H MRS ancillare alla chirurgia: si tratta di applicare la metodica per individuare l'area cerebrale per eseguire una biopsia ottenendo così una diagnosi più accurata, ma anche per pianificare terapie locali e monitorizzare il malato dopo trattamento.

Tumori della prostata: la ^1H MRS può consentire la diagnosi di tumore prostatico senza la necessità di multipli prelievi biopsici.

La MRI con ^1H MRS consente, in modo non invasivo, di definire la sede e l'estensione spaziale del tumore nella periferia della ghiandola.

I markers molecolari di questo tumore sono citrato, creatina e colina. La variazione di concentrazione di queste sostanze riesce a predire con accuratezza la presenza di tumore (13).

L'aggressività della neoplasia è valutata tramite il rapporto colina+creatina/citrato che è correlato con il Gleason score. Un aumento della colina e una riduzione del citrato è indicativo di aggressività neoplastica (14-16).

Dopo radioterapia nei tumori della prostata, il rapporto colina+creatina/citrato si riduce sensibilmente (17).

La spettroscopia può anche consentire la realizzazione di biopsie mirate (18).

La spermina è indicativa di iperplasia prostatica benigna (19).

Tumori della mammella: la ^1H MRS può consentire la diagnosi di tumori della mammella in rapporto alla presenza della colina e al rapporto della colina /creatina con una accuratezza sino al 96% (20). La metodica può guidare le biopsie FNAB e l'analisi spettroscopica può essere realizzata anche sulle biopsie per valutare lo stato linfonodale, l'invasione vascolare, il grading e lo stato recettoriale (21).

La ^1H MRS può, inoltre, valutare la risposta alla chemioterapia neoadiuvante che è il trattamento standard per i tumori avanzati della mammella. In particolare, la ^1H MRS consente dopo solo 24 h dalla somministrazione del primo ciclo di chemioterapia di evidenziare le pazienti responders e non responders.

Meisamy (22) ha osservato una modificazione della concentrazione di colina totale, prima della prima dose di chemioterapia e a 24 h dalla sua somministrazione. Questa modificazione era correlata statisticamente con modificazioni delle dimensioni del tumore ($r=0.79$, $p=0.001$). Per tale motivo, la colina potrebbe essere utilizzata come indicatore di risposta clinica alla terapia neoadiuvante.

Anche il trattamento chemioradioterapico dei tumori della mammella viene monitorizzato con MRS che evidenzia una riduzione della colina in caso di risposta alla terapia (23).

In letteratura sono stati evidenziati falsi positivi determinati da shift chimici per l'alto contenuto lipidico dei tessuti (24). I picchi ritrovati devono essere definiti correttamente con una buona soppressione dell'acqua (25).

Melanoma: lo studio del melanoma con MRS è stato realizzato in vivo ed ex-vivo. In vivo è sempre stata riscontrata colina a 3.2 ppm nelle acquisizioni sul tumore cutaneo o anche a livello delle metastasi linfonodali. Il lattato a 3 ppm si ritrovava nella cute, ma non nelle lesioni metastatiche (26).

Tumori del Capo-Collo: una recentissima esperienza confronta (27) i risultati della ^1H MRS, DCE-MRI (dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging) e ^{18}F -FDG PET (^{18}F -labeled fluorodeoxyglucose positron emission tomography) per la diagnosi di malattia e soprattutto per la valutazione della risposta alla chemioterapia, nei tumori squamosi del capo e collo.

La ^{18}F -FDG PET, in questa analisi, risulta la metodica di imaging più accurata.

2.2 Applicazioni della ^1H MRS nei tumori umani ex-vivo.

a) Biopsie e pezzo operatorio

Il primo report di ^1H MRS ad alta risoluzione ottenuto da cellule tumorale vitali è stato realizzato da Block ed al. nel 1973. Successivamente gli studi sono stati realizzati su ratti e hanno consentito di identificare i tumori con capacità metastatizzante da quelli con invasività locale.

Il passo successivo nella diffusione della tecnica è stata l'applicazione della metodica a biopsie umane con conseguente studio delle correlazioni tra metaboliti e istologia del tumore.

I risultati dimostrarono che il metodo era veloce, accurato e complementare alla biopsia routinaria, ma era necessario che lo stesso pezzo di tumore sottoposto ad MRS venisse verificato istologicamente.

Per definire il carattere benigno o maligno delle lesioni è stata sviluppata all'Istituto di Biodiagnostica canadese, National Research Council (NRC), ad opera di Lean C., Smith I. e Somorjai R. (28) la "three stage statistical classification strategy (SCS)", con ^1H MRS in 1D (Tab.1). Il metodo consente un'analisi spettroscopica automatica e differenzia con grande accuratezza le lesioni benigne da quelle maligne su biopsia.

Tab. 1

biopsy type (n)	classification	spectral regions (ppm)	accuracy (%)
thyroid (107)	normal vs malignant	spectral identity not retained	99.0
brain (206)	control vs malignant	23/55 subregions	94.4
astrocytoma (91)	high vs low grade	0.81–0.85, 1.71–1.75, 2.16–2.20, 2.46–2.50, 2.54–2.58, 3.02–3.06, 3.51–3.55	95.7
breast FNA (140)	benign vs malignant	1: 0.87–0.92, 1.20–1.25, 1.63–1.67, 1.79–1.82, 1.95–1.98, 2.85–2.87, 2.95–2.97, 3.19–3.33 2: 1.19–1.23, 1.32–1.38, 1.79–1.82, 1.96–2.00, 2.13–2.15, 2.70–2.76, 2.92–2.94, 2.97–2.99	96.1
	lymph node involvement	1: 0.43–0.51, 0.64–0.77, 1.10–1.20, 1.56–1.59 2: 0.44–0.51, 0.67–0.71, 1.13–1.19, 1.56–1.60, 1.86–1.96	95.0
prostate (87)	benign vs malignant	3.46–3.52, 3.40–3.46, 2.50–2.56, 2.14–2.20, 1.84–1.90, 1.12–1.18	96.6
	residual cancer after radiotherapy	0.77–0.82, 0.94–1.00, 1.32–1.37, 1.59–1.71, 2.24–2.27, 3.19–3.28	91.4
liver (122)	normal vs HCC	1.34–1.37, 2.28–2.33, 2.83–2.85	100
	cirrhotic vs HCC	3.00–3.03, 3.56–3.60, 3.66–3.68	98.4
ovary (56)	normal vs cirrhotic	1.52–1.57, 2.03–2.08, 3.63–3.67	92.1
	normal vs cancer	1.47, 1.68, 2.80, 2.97, 3.17, 3.34	98
esophagus (105)	normal vs cancer	3.49–3.57, 3.23–3.28, 0.92–1.12	100
	normal vs Barrett's Barrett's vs cancer	3.50–3.54, 1.93–2.06, 1.37–1.43	100
melanoma	metastatic vs benign	3.05–3.13, 2.51–2.57, 1.45–1.49, 1.21–1.29	98.6
In Vivo at 1.5 T		not yet available	
brain	gray vs white matter	not yet available	98
brain	pain vs no pain	0.72–1.44, 1.64–1.83, 2.39–2.84, 3.00–3.12, 3.17–3.42	96
soft tissue sarcoma	normal mesenchymal vs soft tissue sarcoma		93

Tumori del cervello: la diagnosi dei tumori cerebrali è istologica, perché la classificazione di questi tumori è varia per la complessità della biologia delle cellule neoplastiche.

La letteratura sulla applicazione della spettroscopia su biopsie cerebrali è scarsa.

In uno studio di Somorjai gli spettri di biopsie di soggetti con meningiomi, astrocitomi ed epilessia erano analizzati utilizzando la SCS. L'accuratezza della SCS era del 100% per la diagnosi di queste malattie (29).

Cheng et al. (30) hanno dimostrato con HR-MAS-NMR protonica ex vivo una prevalenza di inositolo e glicina nei tumori ad alto grado e il picco di colina che caratterizzava l'analisi in vivo si esprimeva attraverso 3 componenti: Glicerolfosfolina (GPCho), Fosfolina (Pcho) e Colina (Cho).

Il rapporto inositolo/creatina era in grado di distinguere il tipo di tumore, indicando che la metodica MAS era da aggiungere alla istologia per migliorare l'accuratezza diagnostica.

Tumori della prostata: anche per la patologia prostatica la SCS consente di differenziare lesioni benigne dal cancro con una sensibilità e specificità rispettivamente del 100% e 95% (30).

La prostata è un organo molto complesso con 4 differenti zone funzionali con tessuto ghiandolare e stromale presente in quantità variabili. Gli spettri ottenuti in caso di iperplasia (BPH) ghiandolare, iperplasia (BPH) stromale, di adenocarcinoma con percentuale neoplastica del 5% e del 50% e neoplasia intraepiteliale prostatica (PIN)

sono differenti (Fig.1). Lipidi, aminoacidi, citrato, colina e creatina sono individuati solo nell'adenocarcinoma e nella PIN. Il citrato è assente nella BPH stromale (31).

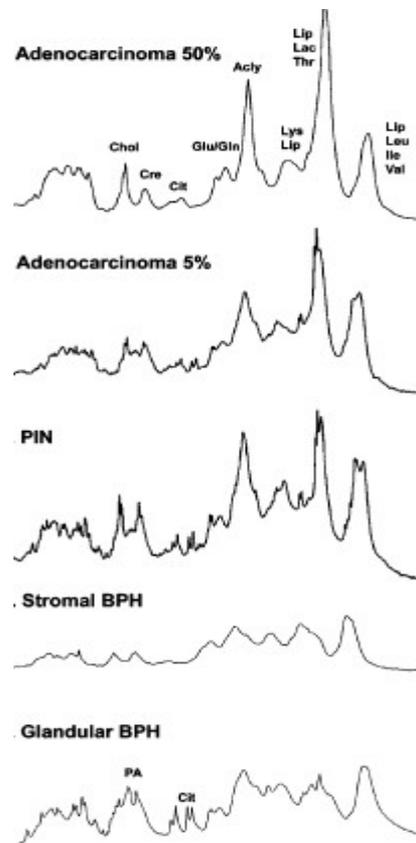


Fig.1: Spettri di biopsie prostatiche

Lo studio di Swindle (32) distingue campioni di iperplasia prostatica in pazienti con cancro e senza e li confronta con quelli contenenti adenocarcinoma. Risulta che il citrato è presente quando l'adenocarcinoma ha una componente del 5%, per cui assenza di citrato e picco di colina da soli non riescono a consentire la diagnosi di lesione maligna.

Cheng per mezzo della HR-MAS-NMR protonica dimostra una correlazione lineare tra la concentrazione di spermina e la % di volume ghiandolare prostatico normale (33).

Tumori della mammella: la MRS applicata su biopsie con FNAB (fine needle aspiration biopsy) consente di identificare il carcinoma invasivo se sono identificati: colina, creatina, fosfocreatina e lisina. Le lesioni benigne identificate con MRS di

FNAB sono correlate correttamente all' istologia nel 96% dei casi (34). In fig. 2 sono riportati gli spettri di lesioni mammarie benigne e maligne

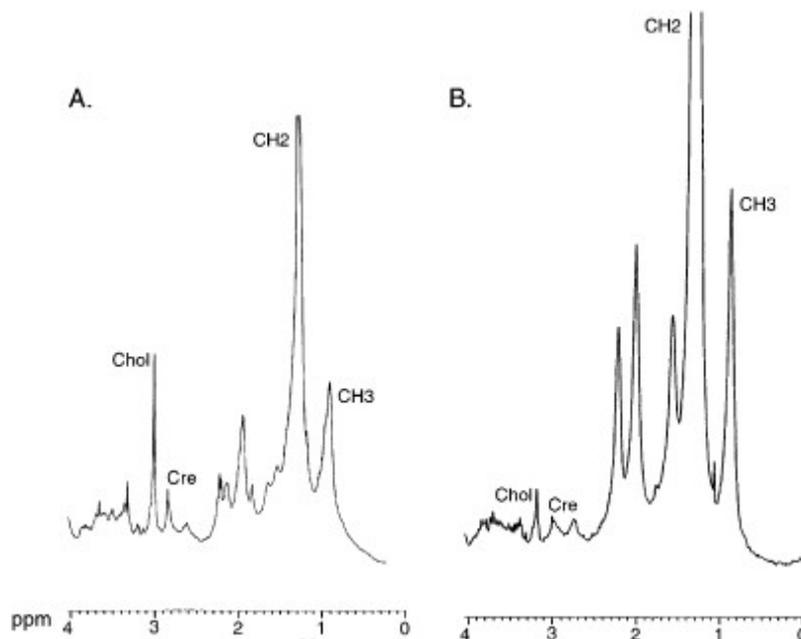


Fig 2: Spettri di lesione maligna (A) e benigna (B) della mammella

I falsi positivi sono il più delle volte causati dai fibroadenomi.

In alcuni studi è proposta anche l'analisi di biopsie di linfonodi in modo da definire meglio la malattia (21).

I carcinomi duttali in situ possono presentare una componente microinvasiva, nel caso la membrana basale sia stata superata localmente in più aree.

In questi casi lo spettro è simile a quello del tumore invasivo (33).

In altri casi di carcinoma duttale in situ, senza microinvasione, è evidente una minore attività chimica che si correla con i caratteri di benignità.

In fig. 3 sono riportati gli spettri e l'istologia di questo tumore in situ.

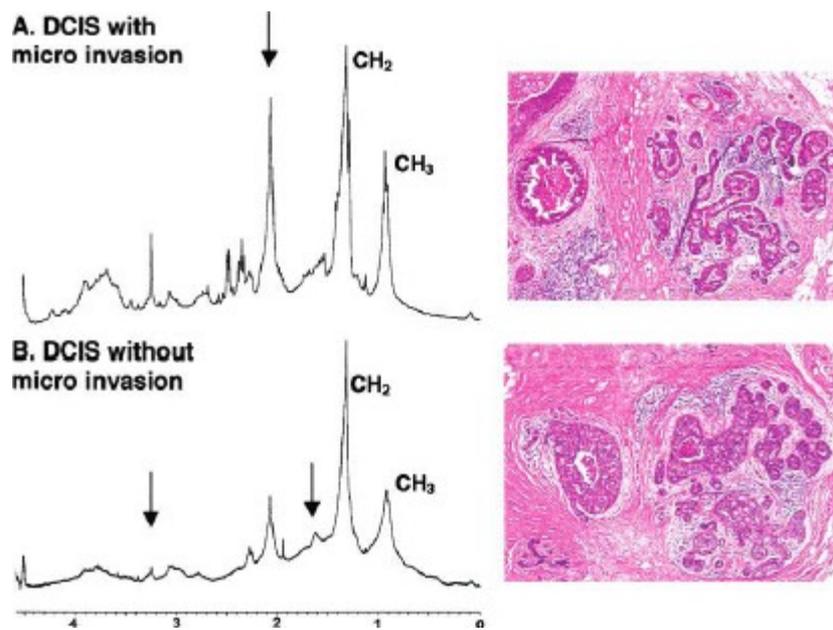


Fig.3: Spettri e istologia di DCIS con e senza microinvasione

Cheng studiando il carcinoma duttale con MAS NMR protonica identifica quali markers tumorali: colina, fosfocolina, lattato e lipidi (34).

Melanoma: l'esame ex-vivo su piccoli frammenti di tumore dopo l'exeresi chirurgica, consente di evidenziare altri metaboliti, tra cui taurina e alcuni aminoacidi (alanina, lisina, leucina, valina e glutammato/glutammica) indicativi di tumore (35).

Altri autori (36) hanno individuato ex- vivo anche acetato, glucosio, inositolo, fosfocolina o fosfocreatina.

Tumori della tiroide: la diagnosi di tumore è realizzata preoperatoriamente con citologia con FNAB. La metodica è accurata nell'identificare i carcinomi papillari, midollari e anaplastici, ma non è in grado di distinguere gli adenomi dagli adenocarcinomi follicolari.

Anche istologicamente la diagnosi è complessa ed è opportuno valutare la capsula ghiandolare e l'invasione vascolare per definire la malignità della lesione.

Uno dei problemi principali nella definizione corretta delle lesioni tiroidee con FNAB è la vascolarizzazione della ghiandola che può essere causa dell'aspirazione di grandi quantità di emazie e poche cellule neoplastiche.

L'analisi spettroscopica rivela anch'essa dei limiti nel definire il carcinoma follicolare probabilmente perchè gli adenomi con spettri maligni sono carcinomi follicolari non invasivi o preinvasivi(37).

Mackinnon et al. (38) hanno eseguito la ^1H MRS dopo tiroidectomia totale o subtotale e hanno osservato che vi era un incremento dei lipidi, soprattutto di- e trigliceridi nei carcinomi rispetto agli adenomi e ai noduli colloidali o iperplastici. Il colesterolo era presente nel 78% dei carcinomi tiroidei, la colina, l'alanina, la lisina, la leucina e l'isoleucina e la valina erano più elevate nei carcinomi. Attraverso spettroscopia bidimensionale (COSY) sono stati individuati due cross peaks definiti Th1 (tra 2.05 a 5.10 ppm) e Th2 (tra 1.65 a 5.10 ppm), non riscontrati in nessun'altra lesione erano espressione di benignità. Il lattato era presente sia nelle lesioni benigne che maligne. Il fucosio, soprattutto IIa e III, erano più comuni ai carcinomi.

Tumori gastrici: la ^1H MRS eseguita su pezzo operatorio dopo gastrectomia, sia nell'area colpita dal tumore che in quella libera, è stata oggetto di studio.

Mun e all. (40) hanno fatto acquisizioni sullo strato muscolare (MUS) e mucoso/sottomucoso (MC/SMC), sia nelle aree di parete gastrica non invasa da tumore che sul tumore.

Nelle aree gastriche sane i metaboliti ritrovati erano lipidi a 0.9 e 1.3 ppm, NANA (N-Acetyl Neuraminic Acid) a 2 ppm e glutatione a 2.2 ppm.

In corrispondenza del tumore, nell'ambito della tonaca muscolare lo spettro mostra un picco di colina a 3.2 ppm, per eventuale sconfinamento di stadio neoplastico (T1 vs T2). Questo metabolita è indicativo della presenza di tumore nell'area studiata.

Sul cancro gastrico anche Calabrese (41) ha realizzato ricerche con HR-MAS-NMR protonica. Con tale metodica sarebbe possibile differenziare la mucosa gastrica sana dall'adenocarcinoma. In particolare con sequenze CPMG (water-suppressed spin-echo Carr-Purcell-Meiboom-Gill) è evidente sul tessuto neoplastico: colina, glicerofosforilcolina (GPC), fosforilcolina (PC), glicina e alanina.

Tumori del Capo-Collo e dell'esofago: Per i tumori squamosi del capo-collo l'istologia rimane il gold standard. In letteratura sono riferiti pochi casi di MRS applicata su biopsie.

Per i tumori esofagei la ^1H MRS risulta un valido supporto alla MRI e potrebbe definire le modificazioni esistenti nella sequenza adenoma-adenocarcinoma.

L' ^1H MRS è utile anche nel diagnosticare con accuratezza l'esofago di Barrett, perché lo spettro della mucosa con Barrett è differente rispetto alla mucosa sana e a quella con neoplasia (42-45) (Fig.4).

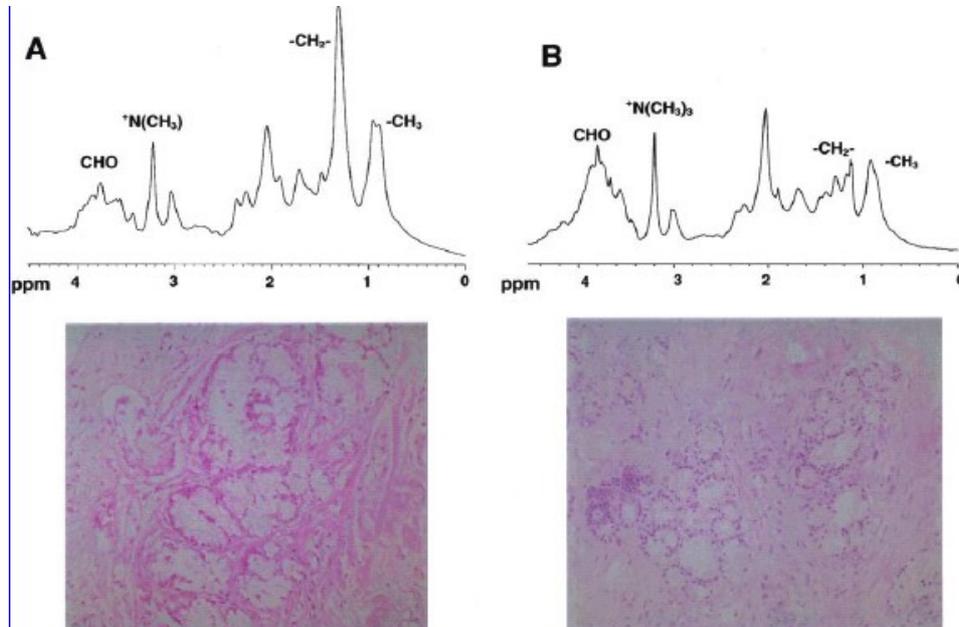


Fig.4: Spettro dell'epitelio di Barrett (A) e del tumore (B) con rispettiva istologia

Per la valutazione della risposta al trattamento neoadiuvante nel cancro dell'esofago valgono le stesse problematiche espresse in questa tesi a proposito del cancro del retto neoadiuvato.

Tuttavia non mi risultano al momento ricerche cliniche sull'argomento.

BIBLIOGRAFIA

1. Dzik-Jurasz ASK, Murphy PS, Gorge M, Prock T, Collins DJ, Swift I, Leach MO, Rowland IJ. Human rectal adenocarcinoma: demonstration of ^1H -MRSpectra in vivo at 1.5 T. Magn Reson Med 2002; 47:809-811
2. Smith JK, Castillo M, Kwock L. MR spectroscopy of brain tumors. Magn Reson Imaging Clin N Am. 2003 Aug;11(3):415-29, v-vi.
3. Castillo M, Scatliff JH, Bouldin TW, Suzuki K. Radiologic-pathologic correlation: intracranial astrocytoma. AJNR Am J Neuroradiol. 1992 Nov-Dec;13(6):1609-16.

- 4 Castillo M, Smith JK, Kwock L. Correlation of myo-inositol levels and grading of cerebral astrocytomas. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2000 Oct;21(9):1645-9.
- 5 Shimizu H, Kumabe T, Shirane R, Yoshimoto T. Correlation between choline level measured by proton MR spectroscopy and Ki-67 labeling index in gliomas. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2000 Apr;21(4):659-65.
- 6 Magalhaes A, Godfrey W, Shen Y, Hu J, Smith W. Proton magnetic resonance spectroscopy of brain tumors correlated with pathology. *Acad Radiol.* 2005 Jan;12(1):51-7.
- 7 Preul MC, Caramanos Z, Collins DL, Villemure JG, Leblanc R, Olivier A, Pokrupa R, Arnold DL. Accurate, noninvasive diagnosis of human brain tumors by using proton magnetic resonance spectroscopy. *Nat Med.* 1996 Mar;2(3):323-5.
- 8 Möller-Hartmann W, Herminghaus S, Krings T, Marquardt G, Lanfermann H, Pilatus U, Zanella FE. Clinical application of proton magnetic resonance spectroscopy in the diagnosis of intracranial mass lesions. *Neuroradiology.* 2002 May;44(5):371-81.
- 9 Faria AV, Macedo FC Jr, Marsaioli AJ, Ferreira MM, Cendes F. Classification of brain tumor extracts by high resolution ¹H MRS using partial least squares discriminant analysis. *Braz J Med Biol Res.* 2011 Feb;44(2):149-64. Epub 2010 Dec 17.
- 10 Chawla S, Zhang Y, Wang S, Chaudhary S, Chou C, O'Rourke DM, Vossough A, Melhem ER, Poptani H. Proton magnetic resonance spectroscopy in differentiating glioblastomas from primary cerebral lymphomas and brain metastases. *J Comput Assist Tomogr.* 2010 Nov-Dec;34(6):836-41.
- 11 Dowling C, Bollen AW, Noworolski SM, McDermott MW, Barbaro NM, Day MR, Henry RG, Chang SM, Dillon WP, Nelson SJ, Vigneron DB. Preoperative proton MR spectroscopic imaging of brain tumors: correlation with histopathologic analysis of resection specimens. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2001 Apr;22(4):604-12.
- 12 Mountford CE, Doran S, Lean CL, Russell P. Proton MRS can determine the pathology of human cancers with a high level of accuracy. *Chem Rev.* 2004 Aug;104(8):3677-704. Review

- 13 Kurhanewicz J, Swanson MG, Nelson SJ, Vigneron DB. Combined magnetic resonance imaging and spectroscopic imaging approach to molecular imaging of prostate cancer. *J Magn Reson Imaging*. 2002 Oct;16(4):451-63.
- 14 Zakian KL, Sircar K, Hricak H, et al. Correlation of proton MR spectroscopic imaging with Gleason score based on step – section pathologic analysis after radical prostatectomy. *Radiology* 2005; 234: 804-14.
- 15 Swindle P., McCredie S., Russel P., et al. Pathologic characterization of human prostate tissue with proton MR spectroscopy. *Radiology* 2003; 228:144-51.
- 16 Swanson MG, Vigneron DB, Tabatabai ZL, et al. Proton HR-MAS spectroscopy and quantitative pathologic analysis of MRI/3D-MRSI-targeted postsurgical prostate tissues. *Magn. Reson. Med*. 2003; 50: 944-54.
- 17 Menard C, Smith IC, Somorjai RL, Leboldus L, Patel R, Littman C, Robertson SJ, Bezabeh T. Magnetic resonance spectroscopy of the malignant prostate gland after radiotherapy: a histopathologic study of diagnostic validity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001 Jun 1;50(2):317-23.
- 18 Portalez D, Rollin G, Leandri P, Elman B, Mouly P, Jonca F, Malavaud B. Prospective comparison of T2w-MRI and dynamic-contrast-enhanced MRI, 3D-MR spectroscopic imaging or diffusion-weighted MRI in repeat TRUS-guided biopsies. *Eur Radiol*. 2010 Dec;20(12):2781-90. Epub 2010 Aug 3.
- 19 van der Graaf M, Schipper RG, Oosterhof GO, et al. Proton MR spectroscopy of prostatic tissue focused on the detection of spermine, a possible biomarker of malignant behaviour in prostate cancer. *MAGMA* 2000; 10:153-59.
- 20 Mackinnon WB, Barry PA, Malycha PL, et al. Fine-needle biopsy specimens of benign breast lesions distinguished from invasive cancer ex vivo with proton MR spectroscopy. *Radiology* 1997; 204:661-66.
- 21 Mountford CE, Somorjai RL, Malycha P, et al. Diagnosis and prognosis of breast cancer by magnetic resonance spectroscopy on fine-needle aspirates analysed using a statistical classification strategy. *Br J Surg* 2001; 88 1234-40.
- 22 Meiesamy S, Bolan PJ, Baker EH, et al. Adding in vivo quantitative ¹H MR spectroscopy to improve diagnostic accuracy of breast MR imaging: preliminary results of observer performance study at 4.0 T. *Radiology* 2005; 236: 465-475.

- 23 Kwock L, Smith JK, Castillo M, Ewend MG, Cush S, Hensing T, Varia M, Morris D, Bouldin TW. Clinical applications of proton MR spectroscopy in oncology. *Technol Cancer Res Treat*. 2002 Feb;1(1):17-28.
- 24 Stanwell P, Mountford C. In vivo proton MR spectroscopy of the breast. *Radiographics*. 2007 Oct; 27 Suppl 1:S253-66.
- 25 Thomas MA, Lipnick S, Velan SS, Liu X, Banakar S, Binesh N, Ramadan S, Ambrosio A, Raylman RR, Sayre J, DeBruhl N, Bassett L. Investigation of breast cancer using two-dimensional MRS. *NMR Biomed*. 2009 Jan;22(1):77-91.
- 26 Bourne RM, Stanwell P, Stretch JR, Scolyer RA, Thompson JF, Mountford CE, Lean CL. In vivo and ex vivo proton MR spectroscopy of primary and secondary melanoma. *Eur J Radiol*. 2005 Mar;53(3):506-13.
- 27 Jansen JF, Schöder H, Lee NY, Stambuk HE, Wang Y, Fury MG, Patel SG, Pfister DG, Shah JP, Koutcher JA, Shukla-Dave A. Tumor Metabolism and Perfusion in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Pretreatment Multimodality Imaging with (1)H Magnetic Resonance Spectroscopy, Dynamic Contrast-Enhanced MRI, and [(18)F]FDG-PET. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011 Jan 13.
- 28 Lean C., Somorjai RL, Smith ICP, Russel P, Mountford CE. In Annual Report on NMR Spectroscopy; Webb G, Ed.; Academic Press: New York, 2002; vol.48.
- 29 Somorjai RL, Dolenko B, Nikulin AK, Pizzi N, Scarth G, Zhilkin P, Halliday W, Fewer D, Hill N, Ross I, West M, Smith IC, Donnelly SM, Kuesel AC, Briere KMJ. 32. Classification of 1H MR spectra specimens. *Cancer Res*. 1998 May 1;58(9):1825-32.
- 30 Hahn P, Smith IC, Leboldus L, Littman C, Somorjai RL, Bezabeh T. The classification of benign and malignant human prostate tissue by multivariate analysis of 1H magnetic resonance spectra. *Cancer Res*. 1997 Aug 15;57(16):3398-401.
- 31 Cheng LL, Wu C, Smith MR, Gonzalez RG. Non-destructive quantitation of spermine in human prostate tissue samples using HRMAS 1H NMR spectroscopy at 9.4 T. *FEBS Lett*. 2001 Apr 6;494(1-2):112-6.

- 32 Windle P., McCredie S., Russel P., et al. Pathologic characterization of human prostate tissue with proton MR spectroscopy. *Radiology* 2003; 228:144-51.
- 33 Mackinnon WB, Barry PA, Malycha PL, et al. Fine-needle biopsy specimens of benign breast lesions distinguished from invasive cancer ex vivo with proton MR spectroscopy. *Radiology* 1997; 204:661-66.
- 34 Cheng LL, Chang IW, Smith BL, Gonzalez RG. Evaluating human breast ductal carcinomas with high-resolution magic-angle spinning proton magnetic resonance spectroscopy. *J Magn Reson*. 1998 Nov;135(1):194-202.
- 35 Bourne RM, Stanwell P, Stretch JR, Scolyer RA, Thompson JF, Mountford CE, Lean CL. In vivo and ex vivo proton MR spectroscopy of primary and secondary melanoma. *Eur J Radiol*. 2005 Mar;53(3):506-13.
- 36 Dobrota D, Péc J, Péc M, Salon F, Liptaj T, Prónayová N, Kasparová S, Dobiás J. Study of malignant melanoma using ¹H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Bratisl Lek Listy*. 1995 Mar;96(3):134-6. Slovak.
- 37 Lean CL, Delbridge L, Russell P, May GL, Mackinnon WB, Roman S, Fahey TJ 3rd, Dowd S, Mountford CE. Diagnosis of follicular thyroid lesions by proton magnetic resonance on fine needle biopsy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Apr;80(4):1306-11.
- 38 Mackinnon WB, Delbridge L, Russell P, Lean CL, May GL, Doran S, Dowd S, Mountford CE. Two-dimensional proton magnetic resonance spectroscopy for tissue characterization of thyroid neoplasms. *World J Surg*. 1996 Sep;20(7):841-7.
- 39 Mun CW, Cho JY, Shin WJ, Choi KS, Eun CK, Cha SS, Lee J, Yang YI, Nam SH, Kim J, Lee SY. Ex vivo proton MR spectroscopy (¹H-MRS) for evaluation of human gastric carcinoma. *Magn Reson Imaging*. 2004 Jul;22(6):861-70.
- 40 Calabrese C, Pisi A, Di Febo G, Liguori G, Filippini G, Cervellera M, Righi V, Lucchi P, Mucci A, Schenetti L, Tonini V, Tosi MR, Tugnoli V. Biochemical alterations from normal mucosa to gastric cancer by ex vivo magnetic resonance spectroscopy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 Jun;17(6):1386-95.

- 41 Blount PL, Meltzer SJ, Yin J, Huang Y, Krasna MJ, Reid BJ. Clonal ordering of 17p and 5q allelic losses in Barrett dysplasia and adenocarcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Apr 15;90(8):3221-5.
- 42 Streitz JM Jr, Andrews CW Jr, Ellis FH Jr. Endoscopic surveillance of Barrett's esophagus. Does it help?. J Thorac Cardiovasc Surg. 1993 Mar;105(3):383-7; discussion 387-8.
- 43 Ireland AP, Clark GW, DeMeester TR. Barrett's esophagus. The significance of p53 in clinical practice. Ann Surg. 1997 Jan;225(1):17-30. Review.
- 44 Mountford CE, Doran S, Lean CL, Russell P. Proton MRS can determine the pathology of human cancers with a high level of accuracy. Chem Rev. 2004 Aug;104(8):3677-704.

CAPITOLO 3 – LA ¹H MRS NEI TUMORI COLORETTALI

3.1 L'Imaging clinico nel cancro del coloretto e del cancro del retto prima e dopo il trattamento neoadiuvante

La stadiazione del cancro colorettales viene realizzata secondo il sistema TNM:

T: stadia la profondità di invasione della parete viscerale da parte della neoplasia e l'eventuale invasione o adesione a organi o strutture adiacenti

N: stadia la presenza o meno di metastasi linfonodali

M: stadia l'esistenza o meno di un coinvolgimento di organi a distanza

La stadiazione pre-operatoria del cancro del colon e quella pre e post- trattamento neoadiuvante del cancro del retto è di particolare importanza perché consente di pianificare correttamente l'intervento chirurgico ed eventuali trattamenti oncologici.

La stadiazione di malattia può essere realizzata con TC Torace Addome Torace e ¹⁸FDG-PET/TC a cui si aggiungono endosonografia (EUS) ed MRI per i tumori del retto.

TC Torace Addome Pelvi:

L'accuratezza della TC nella definizione del T varia tra il 41% e l'82% anche in rapporto all'apparecchiatura utilizzata (1-2). Con l'introduzione della MDCT (Multi-Detector row Computer Tomography) vi è stato indubbiamente un guadagno nella qualità delle immagini e una maggiore risoluzione spaziale .

La metodica, comunque, ha una limitata capacità di visualizzare gli strati della parete intestinale soprattutto nei tumori T1 (invasione della sottomucosa) e T2 (invasione della muscolare).

Il coinvolgimento del grasso periviscerale (T3) è di facile interpretazione se il tumore è un T3 advanced (infiltrazione del grasso a partire dalla muscolare >5mm) ma risulta difficile la distinzione tra T3 early (infiltrazione del grasso a partire dalla muscolare <5mm) e T2.

E' importante ricordare che la reazione fibrotico-infiammatoria del grasso periviscerale può essere causa di falsi positivi e quindi di sovrastadiazione di malattia (1). Per distinguere il T3 dal T4 (tumore che coinvolge le strutture adiacenti), il criterio fondamentale è l'individuazione o meno di un piano di clivaggio tra il tumore e gli organi vicini. La TC costituisce il gold standard per i T4.

L’N è un parametro prognostico importante (1–3).

La definizione di linfonodi metastatici risulta difficile con TC e le sue accuratèzze variano dal 56 al 79% (4).

Le dimensioni non sono un buon predittore di malignità e non possono essere impiegate per definire il coinvolgimento linfonodale. Il metodo piú affidabile per definire le metastasi linfonodali deve tener conto delle caratteristiche morfologiche, dell’intensità di segnale all’interno del linfonodo e la regolarità o irregolarità dei bordi (5).

La presenza di micrometastasi linfonodali non può essere diagnosticata con TC.

La TC è piú accurata nel definire le metastasi a distanza (epatiche, polmonari, ossee, encefaliche, peritoneali) rispetto al T e all’N.

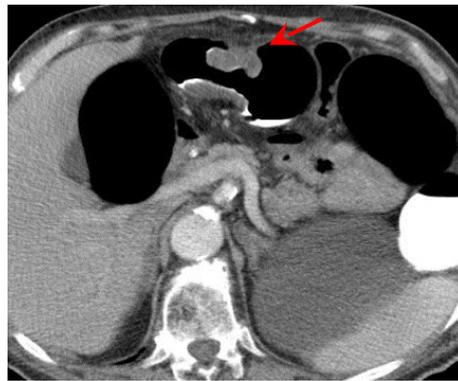


Fig. 1: TC con m.d.c. (mezzo di contrasto) di carcinoma del colon trasverso

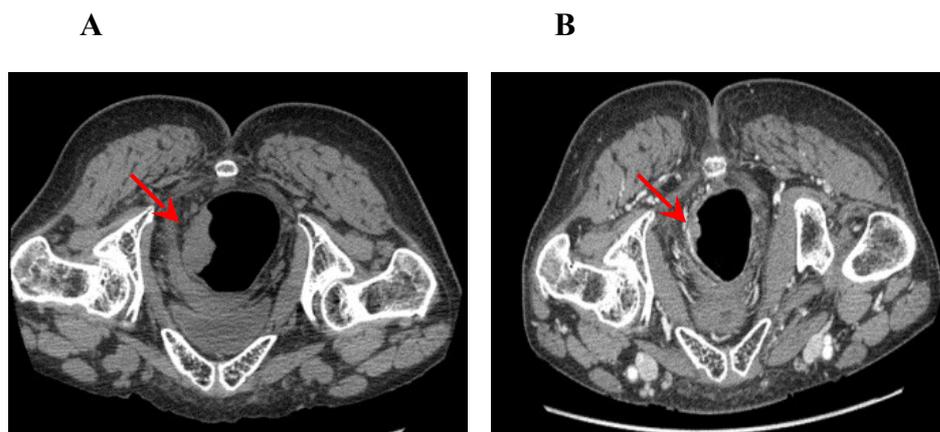


Fig. 2: TC con m.d.c. di carcinoma del retto inferiore prima del trattamento neoadiuvante (A, c-T2N0) e dopo 8 settimane dalla fine del trattamento (B, yc-T0N0)

Nei casi in cui la neoplasia è stenotica è possibile eseguire la colon-TC, conosciuta anche come coloscopia virtuale, che consente di valutare il colon a monte della stenosi e la possibile presenza di un secondo tumore colico o di polipi che possono associarsi in percentuale variabile ad un tumore coloretale.

La TC consente la ricostruzione volumetrica tridimensionale dei tumori e può consentire di individuare i responders e non responders in rapporto alla riduzione volumetrica prima e dopo il trattamento neoadiuvante

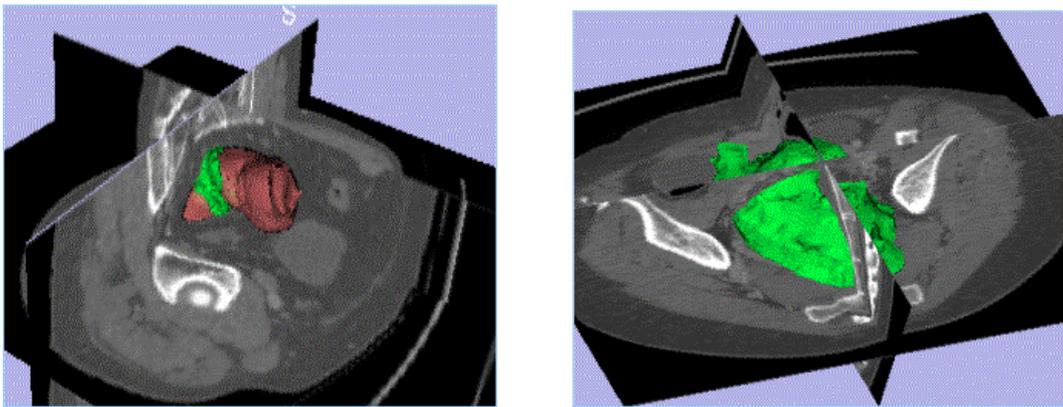


Fig. 3: ricostruzione TC volumetrica tridimensionale di carcinoma del retto superiore

La TC consente anche l'analisi e la ricostruzione tridimensionale dei sistemi vascolari epatici, in modo da conoscere preoperatoriamente le relazioni con le metastasi da resecare (6).

Il metodo permette di schematizzare i sistemi venosi epatici mediante un set gerarchico di curve che definiscono l'afferenza di ogni singolo ramo e la dimensione del vaso in ogni suo punto.

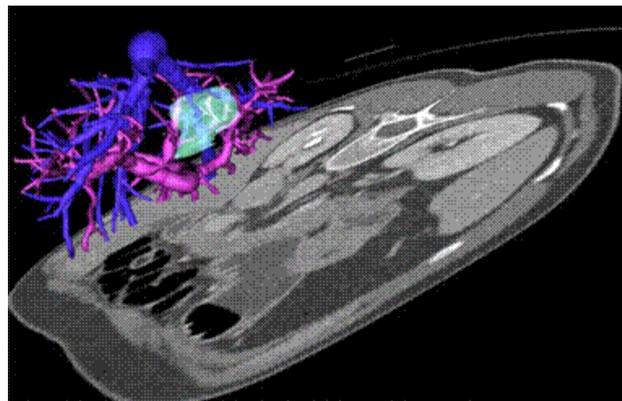


Fig.4: ricostruzione TC tridimensionale dei rapporti tra sistemi vascolari epatici e metastasi

¹⁸FDG-PET/TC

La tomografia ad emissione di positroni identifica l'aumentata attività glicolitica delle cellule neoplastiche, all'interno delle quali il glucosio è altamente concentrato grazie ad un abnorme incremento delle proteine carrier a livello di membrana cellulare e di alcuni enzimi (esochinasi), responsabile della fosforilazione del glucosio.

L'impiego di atomi emettitori di positroni consente la produzione di radio farmaci che mimano molto fedelmente il comportamento di molecole endogene(7).

Il tracciante più comunemente utilizzato nell'imaging oncologico è il ¹⁸F-fluorodeossiglucosio. Questo analogo del glucosio è preferenzialmente assunto dalle cellule metabolicamente attive, in modo correlato per la maggior parte all'abnorme incremento delle proteine trasportatrici di glucosio (GLUT transporter) di superficie ed in parte all'aumentata attività glicolitica (Warburg 1956). Le cellule con sovra espressione di "glucose transporter 1" (GLUT-1) di superficie come le cellule neoplastiche, assumono questo analogo del glucosio con il suo radionuclide ¹⁸F emettitore di positroni (8).

Una volta all'interno della cellula l'esochinasi, il primo enzima della via della glicolisi, converte il ¹⁸F-fluorodeossiglucosio in ¹⁸F-FDG-6-fosfato, il quale, non essendo un substrato per i rimanenti enzimi della glicolisi, rimane intrappolato all'interno della cellula. Il ¹⁸FDG decade con l'emissione di positroni (9).

Dalla collisione tra positrone ed elettrone, deriva, per la massa delle due particelle subatomiche un'energia della forma di due fotoni 511-KeV che viaggiano in direzioni opposte. Uno scanner PET capace di identificare questi fotoni, con l'ausilio di un software appropriato costruisce un'immagine basata sulla sua fonte di emissione.

Esistono zone di fisiologico accumulo del ¹⁸FDG e questo spiegherebbe perché la distribuzione del FDG non si limita soltanto ai tessuti neoplastici.

La PET identifica foci di malignità, evidenziandone l'anormale iperaccumulo del tracciante e fornisce una misurazione quantitativa con il "Standardized Uptake Value" (SUV) che è l'unità di misura dell'attività di captazione che può essere utile al confronto di varie lesioni.

La TC identifica cambiamenti anatomici indotti dal processo neoplastico, ma non consente di localizzare malattia in sedi prive di modificazioni macroscopiche o in linfonodi normali: quest'ultima capacità diagnostica è fornita dalla PET.

La FDG-PET fornisce informazioni complementari e/o supplementari di tipo funzionale che rendono possibile la rilevazione di neoplasie nei siti insospettati e nelle strutture morfologicamente normali.

La risoluzione delle apparecchiature PET di ultima generazione limita la rilevazione di piccole lesioni (<5-8 mm) e alcuni tumori possono risultare falsamente negativi, per la loro ipocaptazione di fluorodeossiglucosio: (es. glioma di basso grado e adenocarcinoma mucinoso).

Falsi positivi possono essere registrati in corso di processi infettivi o infiammatori e nelle malattie granulomatose.

Esistono inoltre aree focali avidi di fluorodeossiglucosio in sede gastrointestinale (circa 3%): nel 66% dei casi l'ipercaptazione è aspecifica, mentre nel 33% è legata alla presenza di polipi. In quest'ultimo caso, nel lavoro di Banti (10) il SUV max medio risulta 13.6 (range 7.3-20.1).

Nella stadiazione dei tumori coloretali la ^{18}F FDG-PET/TC non riesce a definire la profondità della malattia nella parete viscerale e non è indicata nella stadiazione del T.

Inoltre, la sua accuratezza si riduce del 50% in caso di tumori mucinosi perché la componente cellulare è inferiore e le cellule sono immerse nella mucina, presente in quantità variabile.

Nella valutazione dell'interessamento linfonodale la ^{18}F FDG-PET/TC non è l'esame di scelta: l'effetto blooming (fioritura-sboccatura) del tumore primitivo maschera i linfonodi vicini al tumore stesso.

La bassa risoluzione spaziale, inoltre, non consente di individuare le micro metastasi che rappresentano il principale problema diagnostico.

Esistono molti report in letteratura che hanno dimostrato la superiorità della ^{18}F FDG-PET/TC rispetto alla TC nel diagnosticare metastasi ai linfonodi par aortici e retro peritoneali in genere (11-13).

La ^{18}F FDG-PET/TC è la metodica di scelta nella diagnosi di M e ha maggior accuratezza dell'imaging convenzionale perché riesce ad individuare circa il 30% in più di sedi metastatiche.

La ^{18}F FDG-PET/TC identifica un 15% di metastasi epatiche in più rispetto al TC tradizionale e un 33% in più di metastasi extraepatiche. (14-16).

Una scarsa sensibilità della metodica nel definire le metastasi epatiche è riportata dopo chemioterapia (17-20).

La ^{18}F FDG-PET/TC in associazione alle consuete metodiche di imaging riesce a identificare lesioni misconosciute (tumori sincroni) e questo può modificare il piano terapeutico.

In letteratura esistono discordanze tra la ^{18}F FDG-PET/TC e la radiologia convenzionale che variano dal 15 al 18% (21, 22).

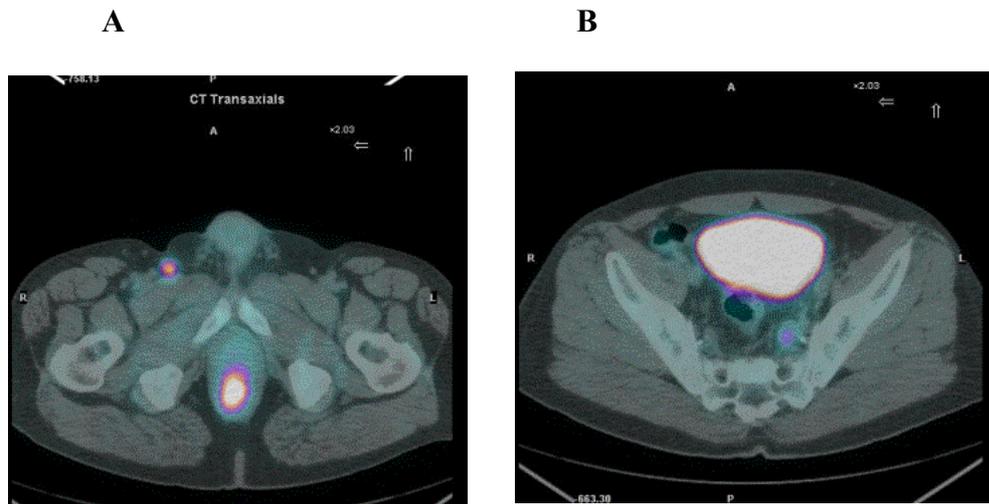


Fig. 5: ^{18}F FDG-PET/TC di metastasi linfonodale inguinale dx (A) e metastasi linfonodale mesoretale (B) da carcinoma del retto inferiore

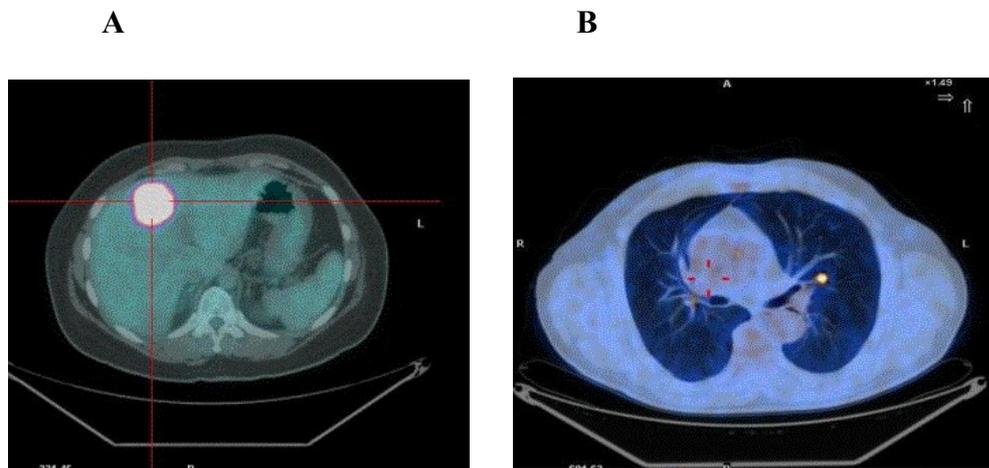


Fig. 6: ^{18}F FDG-PET/TC di metastasi epatica da carcinoma del ceco (A) e metastasi ilare sx da carcinoma del sigma (B)

La ^{18}F FDG-PET/TC è stata utilizzata per valutare la risposta al trattamento neoadiuvante nel cancro del retto.

La risposta dei trattamenti studiati con PET/TC possono essere espresse in vario modo(12).

Kalff (23) riporta una classificazione della risposta al trattamento neoadiuvante con PET in 5 classi: **GRADO 1:** Risposta Metabolica Completa (**CMR**), non identificabile attività nei siti di precedente captazione del ^{18}F -FDG (*CRITERIO 1*) o captazione indistinguibile o meno intensa rispetto l'attività dell'intestino immediatamente adiacente all'area originaria ipercaptante (*CRITERIO 2*); **GRADO 2:** Risposta Metabolica Parziale (**PMR**), miglioramento incompleto con captazione residua di alta intensità rispetto all'intestino adiacente nel sito di precedente anormalità; **GRADO 3:** Malattia Metabolica Stabile (**SMD**); captazione uguale a quella prima del trattamento; **GRADO 4:** Progressione Metabolica di Malattia (**PMD**); captazione maggiore rispetto lo stato iniziale.

Questa classificazione, come altre più utilizzate nella pratica clinica, registrano il valore di SUV basale e dopo il trattamento.

Il valore del SUV si può esprimere in due differenti modi: SUV_{\max} o $\text{SUV}_{\text{medio}}$.

E' possibile valutare la risposta al trattamento calcolando il $\Delta\text{-SUV}_{\max}$ ($\text{SUV}_{\max \text{ basale}} - \text{SUV}_{\max \text{ post-tratt}}$) o il $\Delta\text{-SUV}_{\text{medio}}$ ($\text{SUV}_{\max \text{ basale}} - \text{SUV}_{\max \text{ post-tratt}}$).

La risposta metabolica può essere espressa in termini di Response Index (RI) che esprime la percentuale del rapporto del $\Delta\text{-SUV}_{\max} / \text{SUV}_{\max \text{ basale}}$.

Se questo rapporto percentuale è $> 0 = 35\%$ secondo le linee guida della EORTC si ritiene che il paziente sia un responders.

Questo indice è sempre correlato con la risposta patologica del tumore. Se non c'è attività metabolica residua prima della chirurgia, il SUV è 0 e l'RI è del 100%(24).

Molti autori (12, 25) hanno studiato le correlazioni tra l'RI o il $\Delta\text{-SUV}$ con la classificazione patologica di Mandard o di Dworak che sono riportate in tab.1.

La classificazione Mandard è utilizzata per valutare la risposta al trattamento neoadiuvante nel cancro dell'esofago, ma viene da molti autori utilizzata anche per il cancro del retto (26).

La classificazione di Dworak, invece, è esclusivamente impiegata per il cancro del retto. In tab. 1 sono riportate entrambe le classificazioni (27).

Tab. 1

Mandard	Dworak
TRG 1: assenza di cancro residuo identificabile, fibrosi estesa (p-CR: risposta patologica completa)	TRG 0: nessuna regressione
TRG 2: rare cellule residue disperse nella fibrosi	TRG 1: massa tumorale dominante con fibrosi e /0 vasculopatia
TRG 3: aumento delle cellule neoplastiche residue ma fibrosi predominante	TRG 2: cambiamenti fibrotici dominanti, poche cellule neoplastiche residue o gruppi (facili da individuare)
TRG 4: prevalenza di cellule neoplastiche rispetto alla fibrosi	TRG 3: rare cellule neoplastiche residue (difficili da individuare microscopicamente) in tessuto fibrotico con o senza sostanza mucosa
TRG 5: nessuna regressione	TRG 4: nessuna cellula neoplastica, solo massa fibrotica (p-CR: risposta patologica completa)

Janssen (25) ha correlato l'RI SUV_{max} con la risposta patologica definita tramite il TRG (Tumor Regression Grade) di Mandard e ha osservato che maggiore era il residuo tumorale dopo trattamento neoadiuvante (TRG 3-4-5) e minore era l'RI SUV_{max} (tab.2).

Tab. 2

RISPOSTA PATOLOGICA	RI SUV _{max}
TRG1	59.4+/-9.4% (range 45.3-70.4%)
TRG2	53.2+/-10.5% (range 38.9-69.4%)
TRG3	26.7+/-22.9% (range -11.8-54.4%)
TRG4	13.0+/-20.4% (range -19.9-45.1%)
TRG1-2	56.1+/-10.2% (range -38.9-70.4%)
TRG3-5	20.5+/-22.5% (range -19.9-54.4%)

Al momento non si conosce il cutt-off della RI al di sopra del quale il paziente può essere considerato un responders .

Un altro problema non chiarito è il tempo di esecuzione della PET/TC dopo il trattamento neoadiuvante (28, 29).

La PET-TC può anche aiutare ad identificare i responders in corso di terapia e può indirizzare all'interruzione della chemioradioterapia o alla scelta di altri trattamenti

terapeutici. La valutazione dei responders può essere fatta monitorizzando le modificazioni del SUV_{medio} che riflette meglio il comportamento dell'intera massa tumorale.

L'architettura del tumore, tuttavia, cambia rapidamente e progressivamente, durante il trattamento neoadiuvante e alla fine, sino alla 12^a settimana.

Cascini (30) propone la ^{18}F FDG-PET/TC 12 giorni dall'inizio della chemioterapia. Un valore Δ - $SUV_{medio} \geq 52\%$ distingue i responders dai non responders con una accuratezza del 100%, mentre un Δ - $SUV_{max} \geq 0$ 42% ha un'accuratezza del 97% nel distinguere i due gruppi.

Rosenberg et al. (31) eseguono una ^{18}F FDG-PET/TC e a 14 giorni dall'inizio della chemioradioterapia e individuano i responders se la riduzione del SUV_{medio} è almeno del 35% (PPV 82%, NPV 58%; $p=0.04$).

Janssen (25) identifica responders e nonresponders realizzando una PET-TC dopo la prima settimana di chemioradioterapia e dopo la seconda.

La riduzione del SUV_{max} del 48% alla seconda settimana consentiva di identificare i responders con una specificità del 100% e una sensibilità del 64%

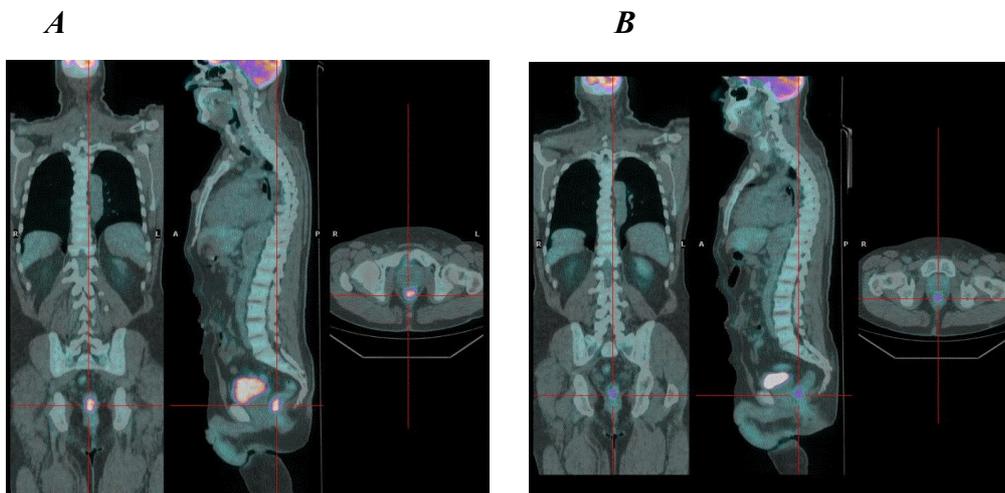


Fig. 7: ^{18}F FDG-PET/TC di carcinoma del retto inferiore prima del trattamento neoadiuvante (A, SUV 14.3) e a 14 giorni dall'inizio della chemioradioterapia (B, SUV 7.3).

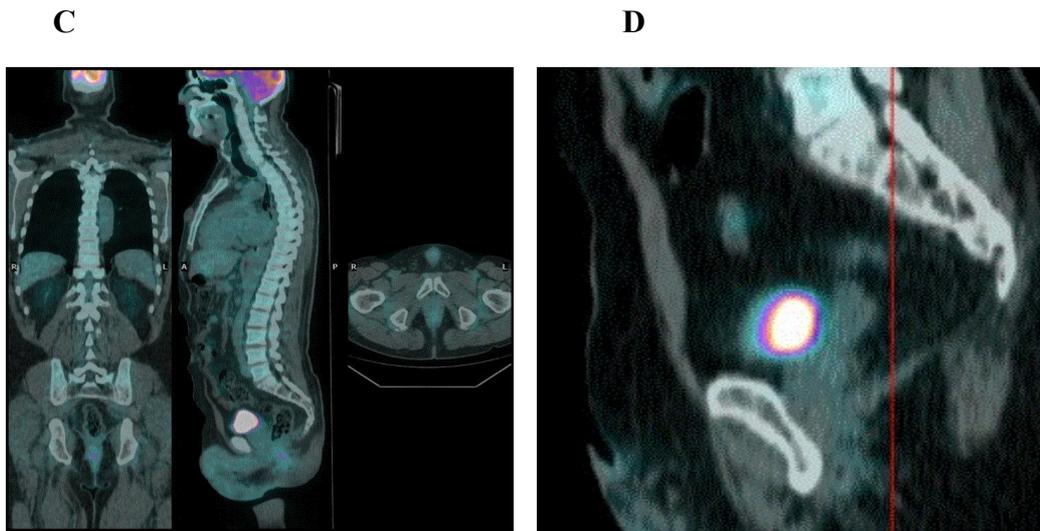


Fig 7: ^{18}F FDG-PET/TC di carcinoma del retto inferiore a 12 settimane dalla fine del trattamento (C-D).
Assenza completa di captazione(c-CR).

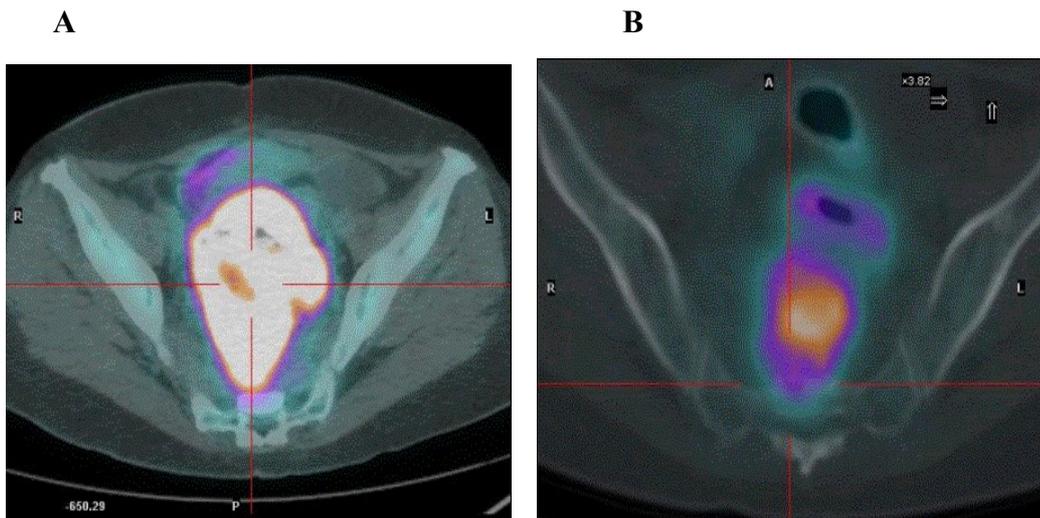


Fig.8: ^{18}F FDG-PET/TC di carcinoma del retto medio-basso prima del trattamento neoadiuvante (A, SUV 36) e a 8 settimane dalla fine del trattamento (B, SUV 8.5).

Endosonografia: la EUS è impiegata nella diagnosi dei tumori del retto distali e ha una buona accuratezza soprattutto per tumori di piccole dimensioni T1 e T2 e per valutare l'infiltrazione dello sfintere interno ed esterno.

Gli strati della parete rettale sono facilmente identificati: 3 sono iperecogeni e 2 ipoecogeni. I tumori sono masse ipoecogene. La sua accuratezza nella definizione del T è dell'80-90% (32).

Harewood (33) ha riportato nella sua review minori accuratezze dell'EUS e una corrispondenza tra *u*-T e *p*-T si ha nel 63- 69% dei casi, con sottostadiazioni del 12-15% e sovrastadiazioni del 24%.

Nei lavori esaminati la sottostadiazione del *u*-T1 si verificava dal 6 al 24% e del *u*-T2 dal 16 al 30%.

La sovrastadiazione del *u*-T3 si realizzava tra il 20 e 28%.

Per lesioni molto grosse l'EUS è difficile da interpretare e non sempre riesce ad identificare infiltrazioni vaginali , prostatiche o delle vescichette seminali.

Le informazioni anatomiche sono insufficienti in caso di tumori T3 e T4.

L'EUS, inoltre, non consente l'esplorazione del retto superiore e non può essere eseguita in caso di stenosi neoplastica.

L'EUS utilizza la rotondità, l'irregolarità dei bordi e l'ipoecogenicità come criteri predefinire i linfonodi metastatici. La sua sensibilità e specificità nella definizione delle metastasi linfonodali è bassa (34) e non riesce ad identificare linfonodi vicini alla fascia del mesoretto.

L'EUS non riesce a identificare la fascia del mesoretto e non può definire il CRM (margine circonfrenziale di resezione) che deve essere di 1 mm per essere considerato negativo. L'accuratezza della metodica si riduce di circa il 50% dopo il trattamento neoadiuvante.

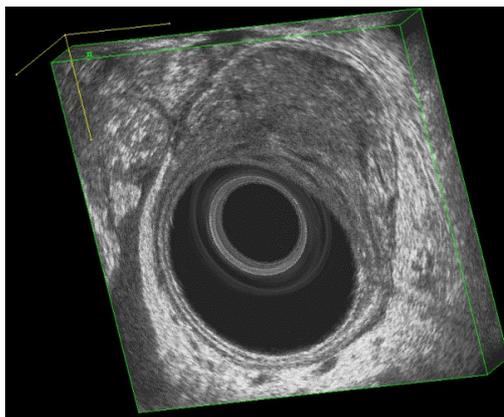


Fig. 9: EUS 3D di carcinoma del retto infiltrante il grasso periviscerale (u-T3N0)

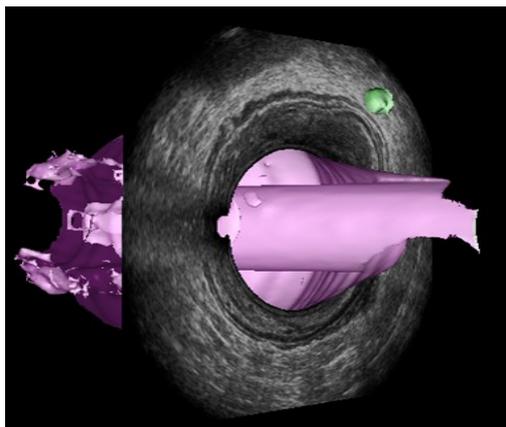


Fig.10: EUS 3D di carcinoma del retto infiltrante il grasso periviscerale con metastasi linfonodale segmentata e colorata in verde (u-T3N+)

Risonanza Magnetica

La MRI è la metodica più accurata per definire la diffusione locale di malattia.

L'esame consente di ottenere molte informazioni che sono importanti per pianificare il tipo di terapia, indirizzando al trattamento neoadiuvante i casi con stadio avanzato o quelli con sede molto bassa (T3, T4 o N+ o T2 candidati ad APR).

I miglioramenti dell'accuratezza nella diagnosi del tumore del retto, soprattutto dopo chemio radioterapia, si sono realizzati grazie all'impiego di nuove bobine phased array ad alta risoluzione (3T), nuove sequenze di acquisizione (MRI con DWI [Diffusion-Weighted] studio dinamico con MRI 3D [3D-DCE-MRI]) e di nuovi mezzi di contrasto (gadofosveset o USPIO).

Le informazioni fornite dalla MRI sono riportate di seguito (35):

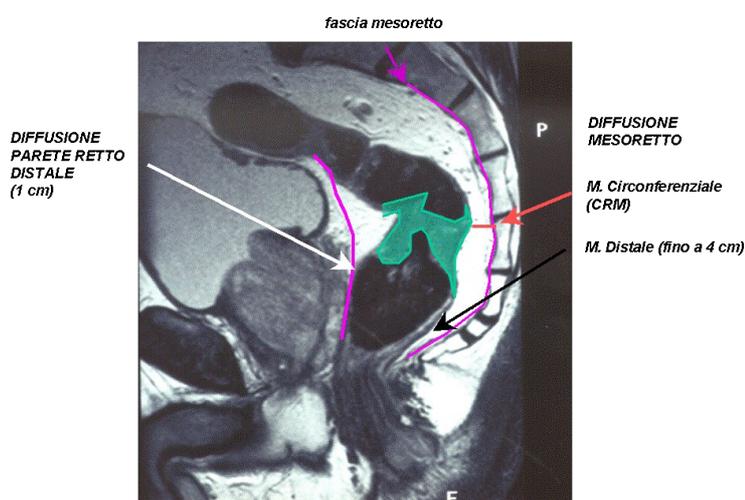


Fig. 11: MRI di carcinoma del retto e sua diffusione.

Morfologia del tumore: la MRI riesce a descrivere le caratteristiche morfologiche del tumore: se si tratta di una neof ormazione polipoide può essere presente un peduncolo che si impianta sulla parete o l'impianto può essere anulare ed esteso sulla parete di viscere.

In molti casi, con prognosi più sfavorevole, è presente un cratere ulceroso centrale con bordi infiltranti.

I tumori mucinosi, che hanno maggiore aggressività rispetto agli adenocarcinomi non mucinosi, sono caratterizzati da un segnale ad alta intensità e presentano diffusione intramurale (36).

Distanza tumore dal margine anale: viene calcolata la distanza del margine anale dal bordo inferiore della neoplasia e definisce se il tumore è del retto superiore (>10 cm dal m.a.), del retto medio (da 5 a 10 cm dal m.a.) o del retto basso (da 0 a 5 cm dal m.a.). Nel retto superiore il peritoneo riveste il viscere lungo la parete anteriore; nel retto medio la fascia mesorettale rappresenta il piano di dissezione della TME (Total Mesorectal Excision) e nel retto inferiore devono essere valutati i rapporti della neoplasia con gli sfinteri e l'elevatore dell'ano.

T staging: con MRI possono identificarsi lesioni coinvolgenti la mucosa, sottomucosa, muscolare, tessuto adiposo periviscerale, riflessione peritoneale, fascia mesorettale e le strutture o gli organi vicini.

Nell'ambito dei tumori T3 esiste una classificazione in sottoclassi in rapporto all'entità di infiltrazione del grasso: T3a: <1 mm; T3b: 1-5mm; T3c: 5-15 mm; T3d: >15 mm. I tumori T3c e T3d sono più aggressivi e hanno risultati oncologici sfavorevoli.

All'MRI con immagini T2 pesate, la mucosa appare come una linea sottile con bassa intensità di segnale e al di sotto di questa la sottomucosa presenta un segnale a più alta intensità. La muscolare propria è spesso visualizzata in due strati distinti: quello circolare più interno e quello longitudinale più esterno. Lo strato muscolare esterno è irregolare, corrugato e interrotto nei punti in cui vasi entrano nella parete del retto.

Il grasso perirettale ha un alto segnale attorno al basso segnale della muscolare propria.

La fascia mesoretale è una linea sottile a bassa intensità che contiene il grasso perirettale.

Per la definizione di T1 e T2 l'MRI ha minore accuratezza.

La MRI ha una sensibilità e specificità per definire i tumori coinvolgenti la muscolare propria del 94% e 69% rispettivamente, per l'infiltrazione del grasso rettale dell'82% e 76% rispettivamente (2).

Molto spesso, la distruzione dello strato esterno della muscolare a causa delle strutture vascolari che vi penetrano viene interpretata come infiltrazione. La misurazione in mm dell'invasione del grasso è utile per valutare la prognosi.

Tumori del retto basso: a livello della fionda del puborettale, il mesoretto si restringe e si riduce a un sottilissimo strato di grasso. Al di sotto del puborettale inizia il canale anale costituito da mucosa e sottomucosa, sfintere interno, piano intersfinterico di 1-2 mm e sfintere esterno. Queste informazioni sono importanti nella scelta del tipo di chirurgia da realizzare. I tumori che raggiungono lo sfintere interno possono essere trattati con una resezione intersfinterica, ma se il tumore raggiunge lo spazio intersfinterico è necessaria la resezione addomino perineale (APR) extralevator .

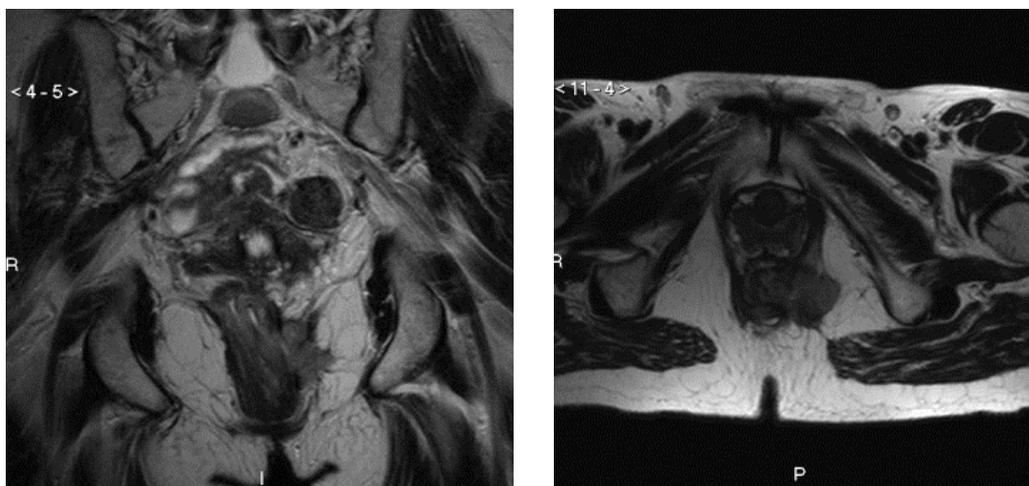


Fig 12: MRI di carcinoma del retto inferiore che invade sfintere interno, esterno, elevatore dell'ano e grasso della fossa ischio-rettale sx

Invasione venosa extramurale (EMVI): è un fattore prognostico sfavorevole associato spesso a recidiva locale di malattia o metastasi. E' presente nel 17-70% dei casi (37).

La MRI ha una sensibilità e specificità nell'identificare l'EMVI del 62% ed 88% dei casi rispettivamente. La EMVI è stata distinta in 5 tipi in rapporto alla vicinanza del tumore a strutture vascolari extramurali o alla loro infiltrazione (38).

Solo l'MRI è in grado di identificare la EMVI che si presenta come un'area con intensità di segnale intermedia, serpiginosa o tubulare.

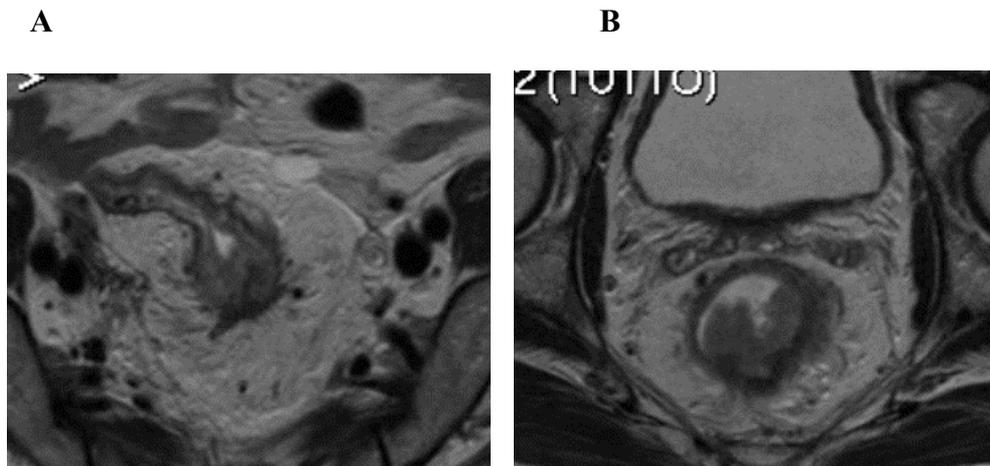


Fig. 13: MRI di carcinoma del retto inferire con infiltrazione dei vasi extramurali che si presentano assottigliati (A) e con contorni irregolari e nodulari (B)

N staging: le dimensioni e la forma sono parametri tradizionalmente considerati per valutare il coinvolgimento linfonodale, ma non sono accurati.

L'intensità di segnale è un parametro indubbiamente più affidabile. L'impiego di nuovi mezzi di contrasto come il gadofosveset o l'USPIO (Ultrasmall superparamagnetic particles of iron oxide) possono migliorare l'accuratezza nell'identificazione di linfonodi metastatici, così come apparecchiature ad alta risoluzione (39-40)

I linfonodi possono essere sospetti se hanno bordi irregolari, intensità di segnale mista o entrambe le condizioni.

La MRI con DWI riesce a definire metastasi linfonodali con un'accuratezza dell'84% in pazienti non sottoposti a terapia neoadiuvante (41), ma dopo chemio radioterapia non migliora l'accuratezza rispetto la sola MRI (42).

Distanza dal margine circonfrenziale di resezione (CRM): la fascia mesoretale rappresenta il margine di resezione nella TME. La MRI identifica bene la fascia mesoretale e consente di misurare la distanza del tumore da questa struttura in modo

da predire il CRM dopo TME. Molti studi definiscono differenti cut-off; Beets Tan RG (43) riferisce che una distanza del tumore dalla fascia mesorettale di 5 mm si associa a CRM negativi rivelati con esame istologico, mentre dal MERCURY study (44) emerge che se la distanza misurata tra tumore e fascia è di 1 mm il CRM è positivo all'istologia (92%, $k=0.81$).

Lo stesso studio riposta un'accuratezza del 91% e un valore predittivo negativo del 93% per pazienti sottoposti solo a chirurgia e un'accuratezza del 77% e un valore predittivo negativo del 98% per pazienti sottoposti chemio radioterapia e poi chirurgia.

Se è presente un linfonodo metastatico, un deposito, un nodulo satellite o un'invasione venosa extramurale più vicini alla fascia, allora la distanza dovrà essere misurata a partire da queste strutture.

Il coinvolgimento del CRM da parte di un linfonodo metastatico è una condizione non molto comune. Nel MERCURY study, il CRM+ da linfonodo metastatico si è registrato solo nel 10% dei pazienti con CRM+ (5/50) (45).

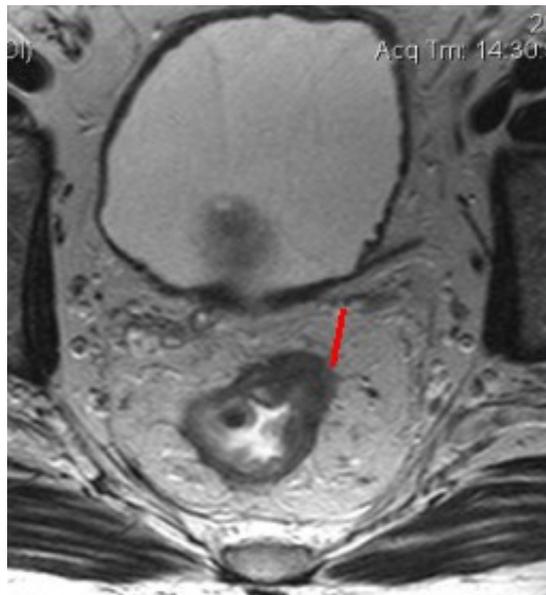


Fig. 14: MRI di carcinoma del retto inferiore e CRM (linea rossa)

Valutazione regressione tumorale dopo chemio radioterapia (TRG): si utilizza la classificazione di Dworak con gradualità compresa tra 1-5.

TRG5: Risposta radiologica completa, no evidenza di tumore (c-CR)

TGR4: fibrosi densa, no residuo tumorale o residuo minimo (c-MRD)

TGR3: fibrosi >50% e visibile intensità di segnale intermedia

TGR2: piccola area fibrosi, maggiore presenza di tumore residuo

TRG1: tumore simile all'originale e intensità di segnale intermedia

La valutazione della risposta dopo trattamento neoadiuvante è fondamentale per la scelta chirurgica.

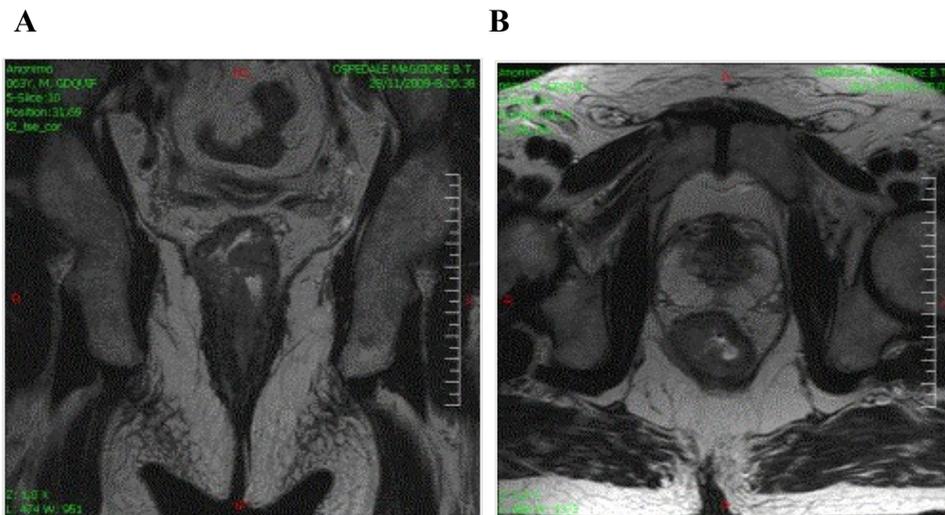
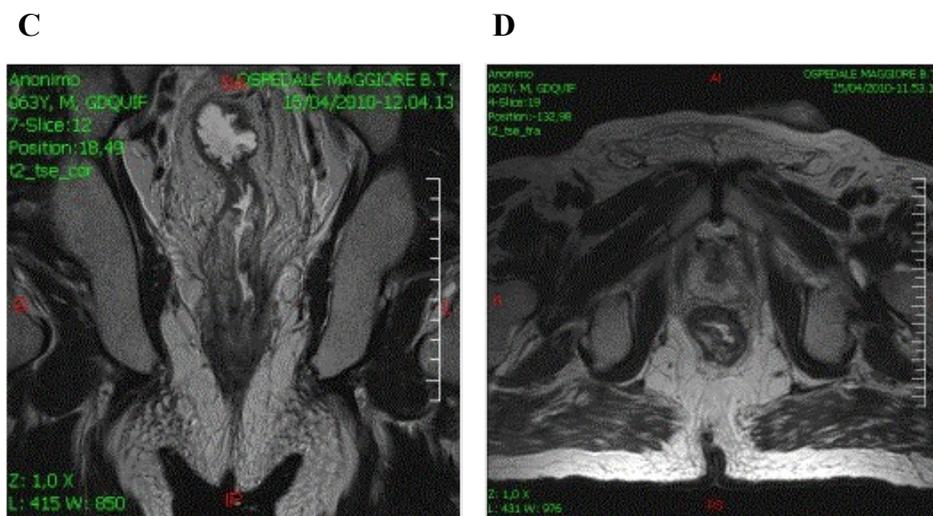


Fig.15: MRI di carcinoma del retto inferire prima del trattamento neoadiuvante con infiltrazione del muscolo elevatore dell'ano dx e dello sfintere interno(c- T4N0M0) (A-B).



MRI dopo 12 settimane dalla fine del trattamento neoadiuvante con evidente riduzione della massa

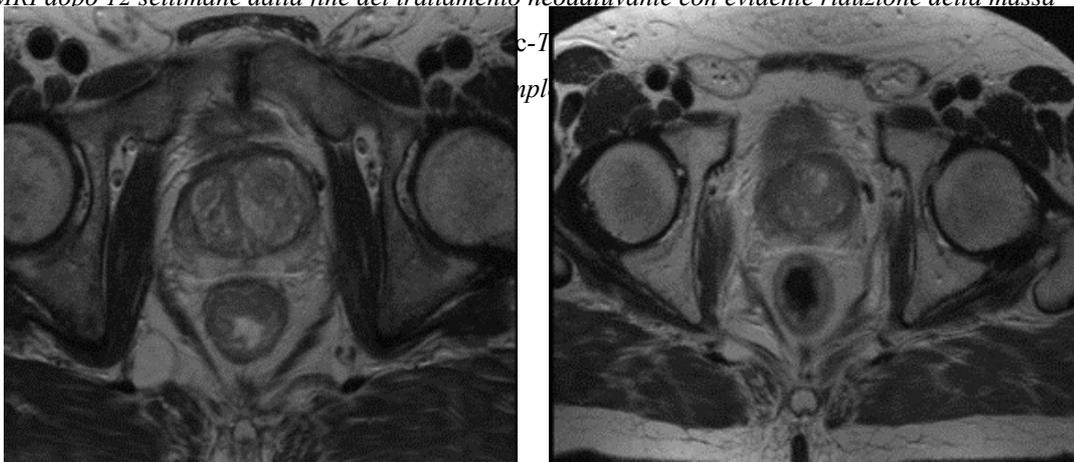


Fig. 16: MRI di carcinoma del retto inferiore prima del trattamento neoadiuvante con infiltrazione della parete muscolare (c-T2N0) (A) Risposta clinica completa a 8 settimane dalla fine del trattamento(yc-T0N0) (B) Paziente non operato. Nessuna recidiva a 16 mesi dalla fine del trattamento neoadiuvante.

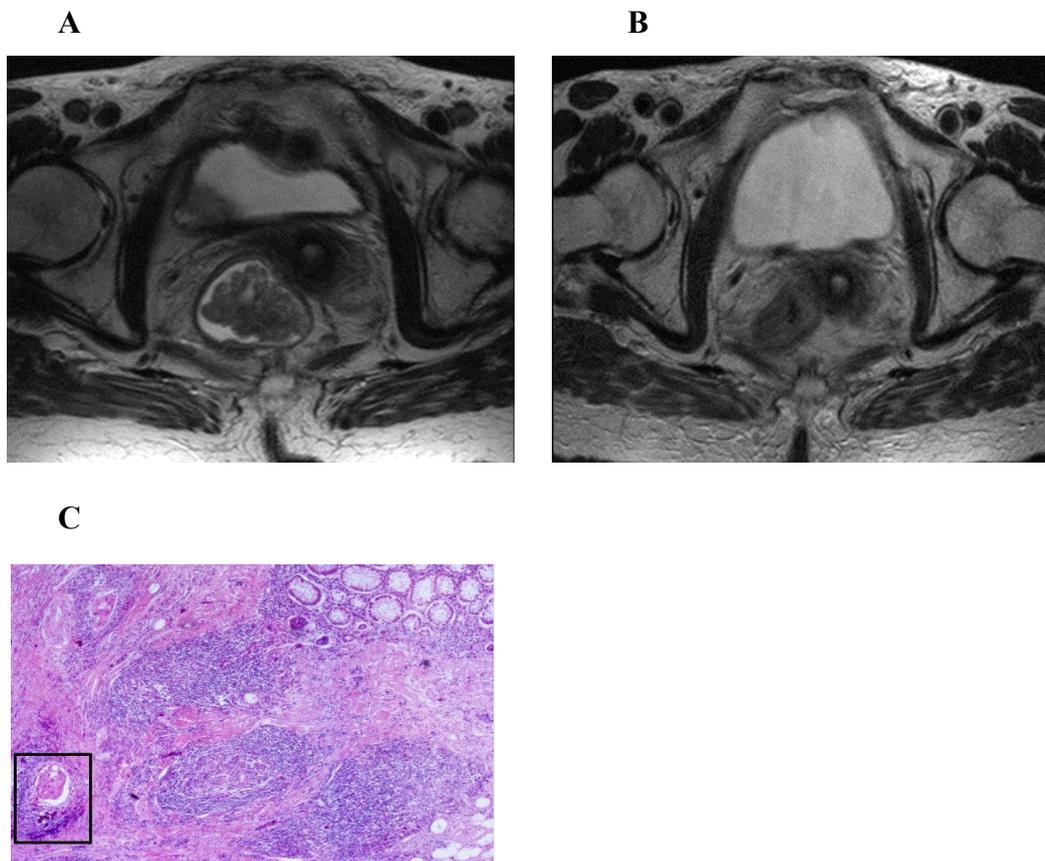


Fig. 17: MRI di carcinoma del retto inferiore prima del trattamento neoadiuvante con infiltrazione della parete muscolare (c-T2N0) (A) Risposta clinica completa a 12 settimane dalla fine del trattamento(yc-T0N0) (B.) All'esame istologico: minimal residual disease con focolaio neoplastico nella sottomucosa (C).

La MRI con diffusione o DWI (Diffusion Weighted MRI) è una tecnica di imaging funzionale che sfrutta il movimento extracellulare dei protoni dell'acqua per discriminare i tessuti in rapporto alla loro cellularità (46). Nei tessuti con normale cellularità, i protoni dell'acqua possono diffondere liberamente provocando una perdita di segnale; al contrario nei tessuti in cui vi è una spiccata cellularità, la diffusione dell'acqua è limitata e ciò risulta in un aumento del segnale.

La MRI con DWI riduce il numero di falsi negativi nel predire le risposte cliniche complete, mentre i falsi positivi si mantengono uguali.

Il suo impiego è fondamentale non solo per la definizione di risposta clinica completa, ma anche per la definizione di minimal residual disease.

In questi casi, infatti, risulta molto difficile differenziare piccole aree di tumore residuo da fibrosi e molto spesso si tende a sovrastimare il tumore. Le aree di fibrosi hanno una bassa densità cellulare che determina una bassa intensità di segnale.

In un'area dove è presente un residuo tumorale vi è un'alta densità cellulare e quindi un alto segnale che è circondato dal basso segnale della fibrosi vicina.

La specificità della MRI con DWI è >90% per cui la minimal residual disease è spesso identificata e il rischio di under treatment è inferiore al 10%. La MRI con DWI riesce ad identificare solo residui tumorali di 2-5 mm, piccoli cluster o cellule residue sono difficili da identificare.

L'ADC (Apparent Diffusion Coefficient) che consente la misura quantitativa della DWI (47) può essere utilizzato prima e dopo trattamento neoadiuvante per predire il grado di risposta alla terapia.

In conclusione, la MRI risulta la metodica di scelta nella stadi azione locale dei tumori del retto. Prima del trattamento chirurgico riesce a stratificare i pazienti e ad identificare quelli a miglior prognosi.

MRI e ricerche sperimentali su carcinomi coloretali umani: i modelli di studio sullo sviluppo neoplastico del carcinoma coloretale appaiono di grande interesse anche nella prospettiva di verificare il ruolo di MRI e MRS nella diagnosi delle fasi precoci del tumore e delle metastasi linfonodali.

Molti studi preclinici sono stati condotti al fine di valutare lo sviluppo del carcinoma colo rettale (48, 49).

Tsutsumi e all. (50) hanno impiantato direttamente nel retto dei ratti le cellule.

Alcuni autori per studiare la crescita del tumore, hanno preferito impiantare chirurgicamente cellule neoplastiche coloretali nel ceco dei ratti, nonostante l'alta mortalità correlata all'intervento (51).

In altri casi l'impianto delle cellule nel colon del ratto era associato al confezionamento di una stomia (52) e, in altri casi ancora, le cellule erano impiantate nel tessuto sottocutaneo (53).

In ricerche da noi eseguite nei laboratori della sezione di Anatomia normale dell'Università di Verona sotto la guida del Prof. A. Sbarbati è stata impiantata la linea cellulare di carcinoma coloretale umano Ht-29 nel retto di topi nudi.

Lo sviluppo neoplastico e la diffusione linfonodale della malattia sono stati monitorizzati con MRI utilizzando anche un mezzo di contrasto paramagnetico (P904), ancora non presente nella diagnostica clinica.

Con questo metodo sono state definite con MRI le diverse fasi dello sviluppo tumorale e le metastasi linfonodali presenti. Dopo il sacrificio dell'animale è stata valutata con esame istologico l'accuratezza della MRI nell'identificare linfonodi metastatici con e senza m.d.c paramagnetico.

Il modello di studio può essere utilizzato per indagare l'utilità della spettroscopia in vivo.

3.2 Principali metaboliti neoplastici del tumore coloretale

L'analisi spettroscopica con ^1H MRS ha consentito di individuare i principali metaboliti presenti nel tumore colo rettale: lipidi, colina, Glicina e taurina.

Spesso nell'analisi spettroscopica è presente anche il PEG (polietilene glicole) che è il composto normalmente utilizzato per la pulizia intestinale prima della colonscopia o della resezione chirurgica.

La HR-MAS-NMR protonica aumenta la possibilità di evidenziare metaboliti del carcinoma colo rettale (Tab. 3) come risulta dall'esperienza di Chan (54)

Tab. 3: metaboliti del carcinoma coloretale

metabolite	δ ¹ H (ppm)	group	multiplicity ^a	observed	% change of cancer from normal ^b	p ^c
Lipids	0.90	CH ₃	m	1D	-83.3	<0.01
	2.00	CH ₂ -C=C	m		-48.0	<0.05
	5.28-5.44	-CH=CH-	m		-84.5	<0.01
ChoCC ^d	3.21	N(CH ₃) ₃	s (multiple)	1D, COSY	82.7	<0.05
Taurine	3.25	NCH ₂	t	1D, JRES, COSY	115.8	<0.0001
	3.42	SCH ₂	t		152.3	<0.0001
Scyllo-inositol	3.34	Half δ -CH ₂	s	1D, JRES	39.1	<0.05
Glycine	3.55	CH ₂	s	1D, JRES	24.4	0.1751
PEG ^d	3.70	CH ₂	s	1D, JRES	-58.6	<0.01
PE ^d	3.99	OCH ₂	m	1D, JRES, COSY	46.0	0.0541
Lactate	4.11	α -CH	q	1D, JRES, COSY	65.0	<0.01
PC ^d	4.19	OCH ₂	t	1D, JRES, COSY	75.6	<0.01
Glucose	4.64	1-CH	d	1D, JRES, COSY	-45.8	<0.05
	5.23	1-CH	d	1D, JRES, COSY	-63.3	<0.01

I composti che contengono colina (colina CC o Choline Containing Compounds) sono fosfocolina (PC), fosfatidilcolina, glicerofosfocolina (GPC) e fosfoetanolamina che sono tutti importanti precursori delle membrane cellulari. Il loro segnale è individuato a 3.2-3.3 ppm

La presenza di colina si evidenzia non solo nei tumori coloretali, ma anche nei tumori della mammella, della prostata e del cervello; per tale motivo essa rappresenta un importante marker neoplastico (55).

L'aumento della colina e dei suoi metaboliti è correlato con l'elevato turnover cellulare.

Il segnale della colina totale può essere impiegato per l' ¹H MRS Imaging per discriminare bene il cancro dal tessuto normale, per mezzo di acquisizioni multivoxel realizzate su una slide o un volume di tessuto.

La HR NMR protonica di tessuti neoplastici consente anche di quantificare fosfocolina, glicerofosfocolina (GPC) e colina libera.

L'attività di enzimi coinvolti nel metabolismo della colina (colin-kinasi, fosfocolina citidiltrasferasi, etc.), si correla con alterazioni genetiche e può essere bloccata mediante farmaci antitumorali (56).

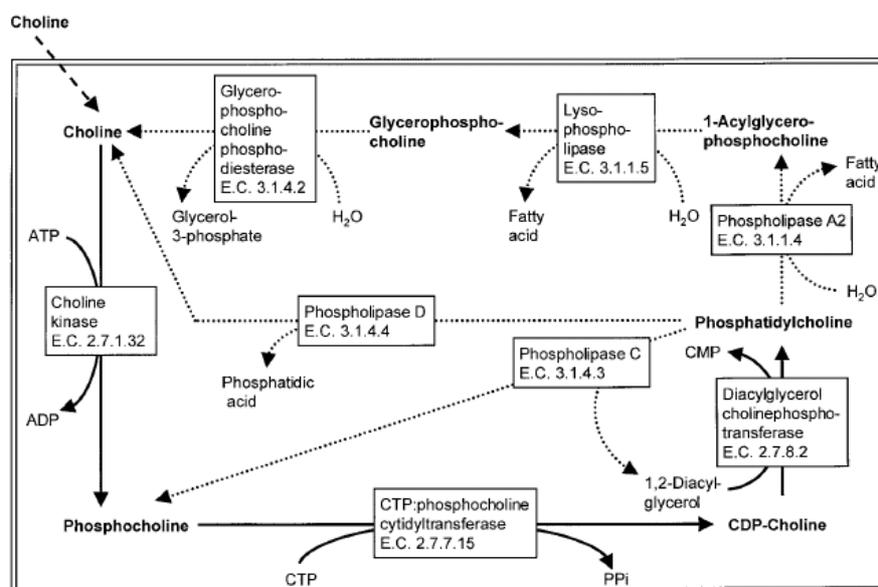


Fig. 18: metabolismo della colina

L'MN58b ad esempio è un potente inibitore della colin-kinasi sperimentato su culture cellulari neoplastiche e tumori coloretali e mammari umani impiantati su ratti.

Questo inibitore enzimatico ha dimostrato essere efficace nell'alterare il metabolismo della colina, provvando una riduzione della fosfocolina, della colina totale e della fosfomonoesterasi, senza modificare la glicerofosfocolina (56).

Altro trattamento utilizzato per il cancro coloretale è quello con U0126 che inibisce il metil-etil chetone provocando una riduzione della fosfocolina (57).

L'aumento di taurina nei tumori colo rettali può essere correlato con un aumento della proliferazione cellulare e con l'aggressività del tumore.

La taurina è un importante osmoregolatore e si riscontra elevata nei tumori, come lo scylloinositolo che è anch'esso un regolatore osmotico.

Questi markers indicano dei cambiamenti osmotici indotti dal tumore.

La riduzione del livello dei lipidi è causata dall'alto turnover metabolico con necessità di utilizzazione di lipidi, soprattutto trigliceridi e alcuni acidi grassi polinsaturi (PUFAs) (54).

3.3 Applicazioni della MRS nel tumore coloretale in vivo

In letteratura è presente un solo lavoro cui è stata impiegata la dell'¹H MRS per lo studio del tumore del coloretto.

La difficoltà di realizzare tale metodica in questi tumori è correlata all'elevato rapporto segnale/rumore per il volume del tumore, al movimento peristaltico del colon e al movimento del paziente

Le potenzialità dell'¹H MRS in vivo per monitorizzare la risposta al trattamento chemio radioterapico nei tumori del retto e chemioterapico nei tumori del colon non sono state ancora esplorate.

E' riportata una sola esperienza (58). condotta su 6 pazienti con tumore avanzato del retto. In questi casi è stato impiegato un voxel di 8 cm³.

Ad un tempo di Eco (TE) corto (20ms) è stato possibile individuare colina, metilene e metile, mentre ad un TE lungo (135 ms) la colina si individuava in 5 casi su 6, il metilene era sempre presente e il metile assente in tutti i casi.

Ricordo, solo per completezza di informazioni, che la MRS al ^{19}F è stata impiegata soprattutto negli ultimi anni in ambito clinico, ma non è oggetto di studio nella presente tesi.

La ^{19}F MRS è utilizzata per valutare la risposta degli adenocarcinomi coloretali metastatici al trattamento con 5-FU (59, 60).

Molti studi hanno dimostrato che la più lunga emivita del farmaco nel tumore ($t_{1/2} > 20$ min) è correlato con una migliore risposta.

L'emivita del 5-FU e il suo metabolismo possono essere accuratamente valutati con ^{19}F MRS.

Altre ricerche in vivo sono state eseguite sul ratto dopo impianto di cellule di carcinoma coloretale umano (HT29 linee cellulari più utilizzate) in sede sottocutanea sia per studiare markers metabolici neoplastici sia per valutare le modificazioni metaboliche indotte dalla radioterapia valutando il rapporto colina/acqua (61, 62).

3.4 Applicazioni della ^1H MRS nel tumore coloretale umano ex-vivo (su biopsie)

Già nel 1986 Mountfort e al. e successivamente lo stesso gruppo nel 1993 e nel 1996 hanno realizzato alcune ricerche per correlare le caratteristiche istopatologiche dei tumori coloretali e i dati di spettroscopia al protone su biopsie di tumori umani (63, 64).

In particolare, utilizzando la ^1H MRS sono stati identificati sottogruppi di pazienti con potenzialità metastatiche e sono stati differenziati casi di adenoma e carcinoma (64). Secondo gli autori era possibile con biopsie distinguere l' aggressività neoplastica in rapporto a modificazioni del profilo lipidico, alterazioni della colina CC (Choline Containing Compounds) e modificazioni del metabolismo del fucosio.

Per quanto riguarda i lipidi la ^1H MRS sembra dimostrare che lipidi mobili sono associati a processi di cancerogenesi (65, 66).

Brière et al hanno sottolineato l'importanza della taurina nell'identificazione della neoplasia coloretale.

Chan (54) ha studiato il profilo metabolico di biopsie di tumore coloretale e mucosa sana prelevata a 5-10 cm dal tumore applicando due metodi di analisi: HR-MAS-NMR protonica e la gas cromatografia con spettroscopia di massa (GC/MS).

La HR-MAS-NMR protonica riusciva a discriminare il tessuto neoplastico da quello sano e i metaboliti individuati fornivano informazioni che si correlavano con le caratteristiche istologiche del tumore.

In particolare, alti livelli di lipidi e glucosio erano presenti nella mucosa sana, mentre colina CC (colina containing compounds), taurina, scylloinositolo, glicina, fosfoetanolamina (PE), lattato e fosfocolina (PC) erano più presenti nel tumore.

Tutti questi metaboliti, ad eccezione della glicina e della fosfoetanolamina (PE) avevano una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$) nel tumore e nella mucosa sana.

La riduzione del glucosio e l'aumento di lattato e glicina sono correlati ad alcune alterazioni indotte dalla neoplasia. L'ipossia/ischemia causata dalla crescita tumorale, superiore alla neoangiogenesi, causa l'aumento di lattati che sono prodotti dalla glicolisi, mentre la glicina può essere espressione di sintesi nucleotidica.

Jordan (67) ha confrontato i risultati spettroscopici con quelli istologici e ha osservato che gli spettri possono consentire di differenziare le lesioni maligne da quelle benigne e si correlano con la percentuale di volume tumorale ($p=0.0065$ e $p=0.02$ rispettivamente), di epitelio benigno ($p=0.0051$ e $p=0.0255$ rispettivamente), di stroma e di infiammazione.

Un ulteriore apporto metodologico è costituito da studi della ^1H MRS (1D e 2D) su differenti linee cellulari di carcinoma coloretale, a diverso grado di differenziazione, coltivate in vitro (68). Anche in questi studi si conferma tuttavia la presenza di alcuni metaboliti che possono indicare la potenzialità di trasformazione neoplastica delle cellule e la progressione neoplastica di alcune cellule rispetto ad altre.

L'espressione della tumorigenicità, della dedifferenziazione cellulare e anche di alterazioni genetiche associate è evidenziabile dal livello di lipidi e di metaboliti, dalla glicosilazione realizzata dalla uridina difosfo-N-Acetilglucosammina (UDP-GlcNAc) e dalla fucosilazione della superficie cellulare (68).

Alcuni autori (69, 70) hanno confrontato i metaboliti ottenuti con ^1H MRS su biopsie di tumore coloretale umano con biopsie di tumore colico indotto da cancerogeni o impiantato nel ratto.

Nonostante qualche piccolissima variabilità, gli autori concludono che il colon del ratto può essere un buon modello di studio per il cancro del colon umano; inoltre, le cellule neoplastiche umane HT29 impiantate nel ratto hanno un profilo metabolico

molto simile al cancro umano e possono essere utilizzate anche per valutare la risposta alla radioterapia.

Tutte queste ricerche consentono di delineare nel futuro, un paesaggio metabolico più sofisticato e completo del passato che, con l'ausilio della proteomica tradizionale, potrà aiutare a comprendere meglio cancerogenesi e diffusione neoplastica del carcinoma colo rettale.

BIBLIOGRAFIA

1. Shin SS, Jeong YY, Min JJ, Kim HR, Chung TW, Kang HK. Preoperative staging of colorectal cancer : CT vs. integrated FDG PET/CT. *Abdom Imaging* 2008 33: 270-277.
2. Bipat S, Glas AS, Slors FJ, Zwinderman AH, Bossuyt PM, Stoker J. Rectal cancer: local staging and assessment of lymph node involvement with endoluminal US, CT, and MR imaging--a meta-analysis. *Radiology*. 2004 Sep;232(3):773-83. Epub 2004 Jul 23.
3. Kapse N, Goh V. Functional imaging of colorectal cancer: positron emission tomography, magnetic resonance imaging, and computed tomography. *Clin Colorectal Cancer*. 2009 Apr;8(2):77-87. Review.
4. Chessin et al. The emerging role of 18 F-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the management of primary and recurrent colorectal cancer. *J Am Coll Surg*. 2005; vol. 201 n. 6.
5. Valentini V, Aristei C, Glimelius B, Minsky BD, Beets-Tan R, Borrás JM, Haustermans K, Maingon P, Overgaard J, Pahlman L, Quirke P, Schmoll HJ, Sebag-Montefiore D, Taylor I, Van Cutsem E, Van de Velde C, Cellini N, Latini P; Scientific Committee. Multidisciplinary Rectal Cancer Management: 2nd European Rectal Cancer Consensus Conference (EURECA-CC2). *Radiother Oncol*. 2009 Aug;92(2):148-63.
6. Sboarina A, Foroni RI, Minicozzi A, Antiga L, Lupidi F, Longhi M, Ganau M, Nicolato A, Ricciardi GK, Fenzi A, Gerosa M, De Simone A, Fracastoro G, Guglielmi A, Cordiano C. Software for hepatic vessel classification: feasibility study for virtual surgery. *Int J Comput Assist Radiol Surg*. 2010 Jan;5(1):39-48. Epub 2009 Jun 30.
7. Taylor et al. a clinician's guide to nuclear medicine. Soc of Nucl Med Inc., Reston, USA, 2000.

8. Figueiras RG, Goh V, Padhani AR, Naveira AB, Caamaño AG, Martin CV. et al. The role of functional imaging in colorectal cancer. *AJR* 2010; 195:54-66.
9. Chessin DB, Kiran RP, Akhurst T, Guillem JG. et al. The emerging role of 18 F-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the management of primary and recurrent colorectal cancer. *J Am Coll Surg.* 2005; vol. 201 n. 6.
10. Banti E, Rampin L, Grassetto G, Marzola M, Cittadin S, Massaro A, Del Favero G, Rubello D. Incidental finding of FDG-avid hot spot in the colon at WB PET/TC: Clinical significance and diagnostic work-up. *Eur J Med and Mol Imaging S2.* Oct 2009.
11. Kristiansen et al. PET/CT and histopathologic response to preoperative chemoradiation therapy in locally advanced rectal cancer. *Dis Col Rectum* 2008; 51: 21-25.
12. Vriens D, de Geus-Oei LF, van der Graaf WT, Oyen WJ. Tailoring therapy in colorectal cancer by PET-CT. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2009 Apr;53(2):224-44. Review.
13. Davey K, Heriot AG, Mackay J, Drummond E, Hogg A, Ngan S, Milner AD, Hicks RJ. The impact of 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography-computed tomography on the staging and management of primary rectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 2008 Jul;51(7):997-1003. Epub 2008 May 7.
14. Khan S, Tan YM, John A, Isaac J, Singhvi S, Guest P, Mirza DF. An audit of fusion CT-PET in the management of colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol.* 2006 Jun;32(5):564-7. Epub 2006 Mar 24.
15. Sobhani I, Turet E, Lebtahi R, Aparicio T, Itti E, Montravers F, Vaylet C, Rougier P, André T, Gornet JM, Cherqui D, Delbaldo C. Early detection of recurrence by 18FDG-PET in the follow-up of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2008 Mar 11;98(5):875-80. Epub 2008 Feb 26.
16. Chen LB, Tong JL, Song HZ, Zhu H, Wang YC. (18)F-DG PET/CT in detection of recurrence and metastasis of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2007 Oct 7;13(37):5025-9.
17. Konski A, Hoffman J, Sigurdson E, Haluszka O, Engstrom P, Cheng JD, Cohen SJ, Watson JC, Eisenberg D, McGarrity E, Freedman G, Meropol NJ. Can molecular imaging predict response to preoperative chemoradiation in patients with rectal cancer? A Fox Chase Cancer Center prospective experience. *Semin Oncol.* 2005 Dec;32(6 Suppl 9):S63-7.

18. Takahashi S, Kuroki Y, Nasu K, Nawano S, Konishi M, Nakagohri T, Gotohda N, Saito N, Kinoshita T. Positron emission tomography with F-18 fluorodeoxyglucose in evaluating colorectal hepatic metastasis down-staged by chemotherapy. *Anticancer Res.* 2006 Nov-Dec;26(6C):4705-11.
19. Konski A, Li T, Sigurdson E, Cohen SJ, Small W Jr, Spies S, Yu JQ, Wahl A, Stryker S, Meropol NJ. Use of molecular imaging to predict clinical outcome in patients with rectal cancer after preoperative chemotherapy and radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009 May 1;74(1):55-9. Epub 2008 Nov 10.
20. Adie S, Yip C, Chu F, Morris DL. Resection of liver metastases from colorectal cancer: does preoperative chemotherapy affect the accuracy of PET in preoperative planning? *ANZ J Surg.* 2009 May;79(5):358-61.
21. Nahas CS, Akhurst T, Yeung H, Leibold T, Riedel E, Markowitz AJ, Minsky BD, Paty PB, Weiser MR, Temple LK, Wong WD, Larson SM, Guillem JG. Positron emission tomography detection of distant metastatic or synchronous disease in patients with locally advanced rectal cancer receiving preoperative chemoradiation. *Ann Surg Oncol.* 2008 Mar;15(3):704-11. Epub 2007 Sep 20. Erratum in: *Ann Surg Oncol.* 2008 Apr;15(4):1265.
22. Llamas-Elvira JM, Rodríguez-Fernández A, Gutiérrez-Sáinz J, Gomez-Rio M, Bellon-Guardia M, Ramos-Font C, Rebollo-Aguirre AC, Cabello-García D, Ferrón-Orihuela A. Fluorine-18 fluorodeoxyglucose PET in the preoperative staging of colorectal cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2007 Jun;34(6):859-67. Epub 2006 Dec 29.
23. Kalf , Duong C, Drummond EG, Matthews JP, Hicks RJ. Findings on 18F-FDG PET scans after neoadjuvant chemoradiation provides prognostic stratification in patients with locally advanced rectal carcinoma subsequently treated by radical surgery. *J Nucl Med* 2006; 47: 14-22.
24. Weber WA, Wieder H. Monitoring chemotherapy and radiotherapy of solid tumors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2006 Jul;33 Suppl 1:27-37. Review.
25. Jansen JF, Schöder H, Lee NY, Stambuk HE, Wang Y, Fury MG, Patel SG, Pfister DG, Shah JP, Koutcher JA, Shukla-Dave A. Tumor Metabolism and Perfusion in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Pretreatment Multimodality Imaging with (1)H Magnetic Resonance Spectroscopy, Dynamic Contrast-Enhanced MRI, and [(18)F]FDG-PET. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011 Jan 13.

26. Mandard AM, Dalibard F, Mandard JC, Marnay J, Henry-Amar M, Petiot JF, Roussel A, Jacob JH, Segol P, Samama G, et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer*. 1994 Jun 1;73(11):2680-6.
27. Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis*. 1997;12(1):19-23.
28. Eary JF. PET imaging for Treatment Response in Cancer. *PET Clin*. 2008 Jan 1;3(1):101-109. No abstract available.
29. Young H, Baum R, Cremerius U, Herholz K, Hoekstra O, Lammertsma AA, Pruim J, Price P. Measurement of clinical and subclinical tumour response using [18F]-fluorodeoxyglucose and positron emission tomography: review and 1999 EORTC recommendations. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PET Study Group *Eur J Cancer*. 1999 Dec;35(13):1773-82.
30. Cascini GL, Avallone A, Delrio P, Guida C, Tatangelo F, Marone P, Aloj L, De Martinis F, Comella P, Parisi V, Lastoria S. et al. 18 F-FDG PET is an early predictor of pathologic tumor response to preoperative radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer. *J Nucl Med* 2006; 47: 1241-1248.
31. Rosenberg R, Herrmann K, Gertler R, Künzli B, Essler M, Lordick F, Becker K, Schuster T, Geinitz H, Maak M, Schwaiger M, Siewert JR, Krause B. The predictive value of metabolic response to preoperative radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer measured by PET/CT. *Int J colorectal Dis* 2009; 24: 191-200. *Int J Colorectal Dis*. 2009 Feb;24(2):191-200. Epub 2008 Dec 3.
32. Beets GL, Beets-Tan RG. Pretherapy imaging of rectal cancers: ERUS or MRI? *Surg Oncol Clin N Am*. 2010 Oct;19(4):733-41.
33. Harewood GC. Assessment of publication bias in the reporting of EUS performance in staging rectal cancer. *Am J Gastroenterol*. 2005 Apr;100(4):808-16.
34. Puli SR, Reddy JB, Bechtold ML, Choudhary A, Antillon MR, Brugge WR. Accuracy of endoscopic ultrasound to diagnose nodal invasion by rectal cancers: a meta-analysis and systematic review. *Ann Surg Oncol*. 2009 May;16(5):1255-65. Epub 2009 Feb 14. Review.
35. Taylor F, Mangat N, Swift IR, Brown G. Proforma-based reporting in rectal cancer. *Cancer Imaging*. 2010 Oct 4;10 Spec no A:S142-50.

36. Oberholzer K, Menig M, Kreft A, Schneider A, Junginger T, Heintz A, Kreitner KF, Hötker AM, Hansen T, Düber C, Schmidberger H. Rectal Cancer: Mucinous Carcinoma on Magnetic Resonance Imaging Indicates Poor Response to Neoadjuvant Chemoradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2011 Jan 13. [Epub ahead of print]
37. Minsky BD, Mies C, Rich TA, Recht A, Chaffey JT. Potentially curative surgery of colon cancer: the influence of blood vessel invasion. *J Clin Oncol*. 1988 Jan;6(1):119-27.
38. Smith NJ, Barbachano Y, Norman AR, Swift RI, Abulafi AM, Brown G. Prognostic significance of magnetic resonance imaging-detected extramural vascular invasion in rectal cancer. *Br J Surg*. 2008 Feb;95(2):229-36.
39. Lahaye MJ, Engelen SM, Kessels AG, de Bruïne AP, von Meyenfeldt MF, van Engelshoven JM, van de Velde CJ, Beets GL, Beets-Tan RG. .USPIO-enhanced MR imaging for nodal staging in patients with primary rectal cancer: predictive criteria. *Radiology*. 2008 Mar;246(3):804-11. Epub 2008 Jan 14.
40. Lambregts DM, Beets GL, Maas M, Kessels AG, Bakers FC, Cappendijk VC, Engelen SM, Lahaye MJ, de Bruïne AP, Lammering G, Leiner T, Verwoerd JL, Wildberger JE, Beets-Tan RG. Accuracy of Gadofosveset-enhanced MRI for Nodal Staging and Restaging in Rectal Cancer. *Ann Surg*. 2011 Mar;253(3):539-45.
41. Mizukami Y, Ueda S, Mizumoto A, Sasada T, Okumura R, Kohno S, Takabayashi A. Diffusion-weighted Magnetic Resonance Imaging for Detecting Lymph Node Metastasis of Rectal Cancer. *World J Surg*. 2011 Apr;35(4):895-9.
42. Lambregts DM, Maas M, Riedl RG, Bakers FC, Verwoerd JL, Kessels AG, Lammering G, Boetes C, Beets GL, Beets-Tan RG. Value of ADC measurements for nodal staging after chemoradiation in locally advanced rectal cancer-a per lesion validation study. *Eur Radiol*. 2011 Feb;21(2):265-73. Epub 2010 Aug 22.
43. Beets-Tan RG, Beets GL, Vliegen RF, Kessels AG, Van Boven H, De Bruïne A, von Meyenfeldt MF, Baeten CG, van Engelshoven JM 77. Accuracy of magnetic resonance imaging in prediction of tumour-free resection margin in rectal cancer surgery. *Lancet*. 2001 Feb 17;357(9255):497-504.
44. MERCURY Study Group. Diagnostic accuracy of preoperative magnetic resonance imaging in predicting curative resection of rectal cancer: prospective observational study. *BMJ*. 2006 Oct 14;333(7572):779. Epub 2006 Sep 19.

45. Shihab OC, Quirke P, Heald RJ, Moran BJ, Brown G. Magnetic resonance imaging-detected lymph nodes close to the mesorectal fascia are rarely a cause of margin involvement after total mesorectal excision. *Br J Surg*. 2010 Sep;97(9):1431-6.
46. Lambregts DM, Maas M, Riedl RG, Bakers FC, Verwoerd JL, Kessels AG, Lammering G, Boetes C, Beets GL, Beets-Tan RG. Value of ADC measurements for nodal staging after chemoradiation in locally advanced rectal cancer-a per lesion validation study. *Eur Radiol*. 2011 Feb;21(2):265-73. Epub 2010 Aug 22.
47. Kim SH, Lee JM, Hong SH, Kim GH, Lee JY, Han JK, Choi BI. Locally advanced rectal cancer: added value of diffusion-weighted MR imaging in the evaluation of tumor response to neoadjuvant chemo- and radiation therapy. *Radiology*. 2009 Oct;253(1):116-25.
48. Heijstek MW, Heijstek MW, Kranenburg O, Borel Rinkes IH (2005) Mouse model of colorectal cancer and liver metastases *Dig Surg* 22(1-2): 16-25
49. Donigan M, Norcross LS, Aversa J, Colon J, Smith J, Madero-Visbal R, Li S, McCollum N, Ferrara A, Gallagher JT, Baker CH (2009) Novel murine model for colon cancer:non-operative trans-anal rectal injection *J Surg Res* 154(2):299-303
50. Tsutsumi S, Kuwano H, Morinaga N, Shimura T, Asao T (2001) Animal model of para-aortic lymph node metastasis *Cancer Lett*. 169(1):77-85
51. Cèspeles MV, Espina C, García-Cabezas MA, Trias M, Boluda A, Gomez del Pulgar MT, Sancho FJ, Nistal M, Lacal JC, Mangués R (2007) Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites *Am J Pathol* 170: 1077-1085
52. Jin H, Liu X, Li VK, Ding Y, Yun S, Liu F, Zhou S, Song Y, Ni M(2009) A simple colostomy implantation model for evaluating colon cancer *Int J Colorectal Dis*. 24(1):41-7
53. Han Liang, Hong-Jie Zhan, Bao-Gui Wang, Yuan Pan, Xi-Shan Hao (2007) Change in expression of apoptosis genes after hyperthermia, chemotherapy and radiotherapy in human colon cancer transplanted into nude mice *World J Gastroenterol*. 13(32):4365-71
54. Chan EC, Koh PK, Mal M, Cheah PY, Eu KW, Backshall A, Cavill R, Nicholson JK, Keun HC. Metabolic profiling of human colorectal cancer using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS

NMR) spectroscopy and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS). *Proteome Res.* 2009 Jan;8(1):352-61.

55. Ackerstaff E, Glunde K, Bhujwala ZM. Choline phospholipid metabolism: a target in cancer cells? *Cell Biochem.* 2003 Oct 15;90(3):525-33.

56. Al-Saffar et al. Noninvasive magnetic resonance spectroscopic pharmacodynamic markers of the choline kinase inhibitor MN58b in human carcinoma models. *Cancer Res.* 2006; 66: (1).

57. Belouche-Babari M, Jackson LE, Al-Saffar NM, Workman P, Leach MO, Ronen SM. Magnetic resonance spectroscopy monitoring of mitogen-activated protein kinase signaling inhibition. *Cancer Res.* 2005 Apr 15;65(8):3356-63.

58. Dzik-Jurasz ASK, Murphy PS, Gorge M, Prock T, Collins DJ, Swift I, Leach MO, Rowland IJ. Human rectal adenocarcinoma: demonstration of ¹H-MRSpectra in vivo at 1.5 T. *Magn Reson Med* 2002; 47:809-811

59. Kamm YJ, Heerschap A, van den Bergh EJ, Wagener DJ. ¹⁹F-magnetic resonance spectroscopy in patients with liver metastases of colorectal cancer treated with 5-fluorouracil. *Anticancer Drugs.* 2004 Mar;15(3):229-33.

60. van Laarhoven HW, Klomp DW, Rijpkema M, Kamm YL, Wagener DJ, Barentsz JO, Punt CJ, Heerschap A. Prediction of chemotherapeutic response of colorectal liver metastases with dynamic gadolinium-DTPA-enhanced MRI and localized ¹⁹F MRS pharmacokinetic studies of 5-fluorouracil. *NMR Biomed.* 2007 Apr;20(2):128-40.

61. Seierstad T, Røe K, Olsen DR. Noninvasive monitoring of radiation-induced treatment response using proton magnetic resonance spectroscopy and diffusion-weighted magnetic resonance imaging in a colorectal tumor model. *Radiother Oncol.* 2007 Nov;85(2):187-94. Epub 2007 Oct 15.

62. Madhu B, Robinson SP, Howe FA, Griffiths JR. Effect of Gd-DTPA-BMA on choline signals of HT29 tumors detected by in vivo ¹H MRS. *J Magn Reson Imaging.* 2008 Nov;28(5):1201-8.

63. Mountford CE, Saunders JK, May GL, Holmes KT, Williams PG, Fox RM, Tattersall MH, Barr JR, Russell P, Smith IC. Classification of human tumours by high-resolution magnetic resonance spectroscopy. *Lancet.* 1986 Mar 22;1(8482):651-3.

64. Lean CL, Newland RC, Ende DA, Bokey EL, Smith IC, Mountford CE. Assessment of human colorectal biopsies by ¹H MRS: correlation with histopathology. *Magn Reson Med*. 1993 Nov;30(5):525-33.
65. Brière KM, Kuesel AC, Bird RP, Smith IC. ¹H MR visible lipids in colon tissue from normal and carcinogen-treated rats. *NMR Biomed*. 1995 Feb;8(1):33-40.
66. Righi V, Mucci A, Schenetti L, Bacci A, Agati R, Leonardi M, Schiavina R, Martorana G, Liguori G, Calabrese C, Boschetti E, Bonora S, Tugnoli V. et al. Identification of mobile lipids in human cancer tissues by ex vivo diffusion edited HR-MAS MRS. *Onc. Rep*. 22: 1492-1496, 2009.
67. Jordan KW, Nordenstam J, Lauwers GY, Rothenberger DA, Alavi K, Garwood M, Cheng LL. Metabolomic characterization of human rectal adenocarcinoma with intact tissue magnetic resonance spectroscopy. *Dis Colon Rectum*. 2009 Mar;52(3):520-5.
68. Mackinnon WB, Huschtscha L, Dent K, Hancock R, Paraskeva C, Mountford CE. Correlation of cellular differentiation in human colorectal carcinoma and adenoma cell lines with metabolite profiles determined by ¹H magnetic resonance spectroscopy. *Int J Cancer*. 1994 Oct 15;59(2):248-61.
69. Bezabeh T, Smith IC, Krupnik E, Somorjai RL, Kitchen DG, Bernstein CN, Pettigrew NM, Bird RP, Lewin KJ, Briere KM. Diagnostic potential for cancer via ¹H magnetic resonance spectroscopy of colon tissue. *Anticancer Res*. 1996 May-Jun;16(3B):1553-8.
70. Seierstad T, Røe K, Sitter B, Halgunset J, Flatmark K, Ree AH, Olsen DR, Gribbestad IS, Bathen TF. Principal component analysis for the comparison of metabolic profiles from human rectal cancer biopsies and colorectal xenografts using high-resolution magic angle spinning ¹H magnetic resonance spectroscopy. *Mol Cancer*. 2008 Apr 25;7:33.

CAPITOLO 4 – RICERCHE SPERIMENTALI CON ¹H MRS EX VIVO NEL TUMORE COLORETTALE

4.1 Obiettivi della ricerca

Come ho accennato nella introduzione e più diffusamente nel capitolo 3.1, l'imaging tradizionale con EUS, TC, MRI, PET-TC, fornisce scarse accuratèzze nella diagnosi e nella stadiazione del carcinoma del retto dopo trattamento neoadiuvante.

In particolare, le risposte cliniche complete sono diagnosticate con accuratezza solo nel 30% dei casi circa (1); si aggiunga che la presenza di minimal residual disease (TRG2-3 di Mandard e TRG3-2 di Dworak) è di impossibile diagnosi con le metodiche diagnostiche tradizionali.

La mancata certezza diagnostica pone la necessità di un intervento di asportazione del retto che nel 30% dei casi circa si realizza su un segmento intestinale ormai privo di neoplasia.

Questi malati potrebbero non essere sottoposti ad un intervento maggiore che modifica spesso la qualità di vita se la diagnosi di risposta clinica completa, con guarigione locale dopo trattamento neoadiuvante, fosse certa.

E' evidente l'interesse ad approcciare nuove strade diagnostiche non invasive come la MRS che in altri organi (cervello, prostata, mammella) sono ormai entrate o stanno entrando nella pratica clinica routinaria.

Numerosi studi sono stati realizzati su biopsie, su liquidi biologici, su linee cellulari coltivate o trapiantate nel ratto.

Finora, non sono presenti in letteratura ricerche con MRS eseguite su segmenti di intestino umano sede di adenocarcinoma.

L'idea che è alla base di questa ricerca di avere a disposizione un imaging metabolico non invasivo in vivo su retto umano dopo trattamento neoadiuvante è una prospettiva di studio più lontana ma di grande interesse e che potrebbe migliorare il destino clinico di molti malati .

4.2 Materiali e Metodi

Dal Marzo 2010 al Febbraio 2011 sono stati osservati e trattati presso la I Divisione Clinicizzata dell'Ospedale Civile Maggiore di B.Trento 157 casi di cancro coloretale. In 29 casi, presso la sezione di Anatomia Umana dell'Università di Verona, è stata eseguita l'analisi con ¹H MRS ex vivo sul pezzo operatorio asportato.

I pazienti arruolati nello studio erano di sesso maschile in 21casi ed di sesso femminile in 8 casi. L'età media dei pazienti era 68.6 anni (DS=13.2).

I carcinomi del colon erano 22, i carcinomi del retto erano 2 e in 5 casi i pazienti avevano un cancro del retto basso trattato con chemioradioterapia neoadiuvante.

La sede del tumore era il ceco (5 casi), il colon ascendente (4 casi), la flessura epatica (1 caso), il colon traverso (1 caso), il colon discendente (1 caso), il sigma (8 casi), la giunzione retto-sigma (2 casi) e il retto (7 casi).

In 11 casi è stata eseguita una emicolectomia destra, in 4 casi una emicolectomia sinistra, in 5 casi una resezione di sigma, in 7 casi una resezione anteriore bassa e in 2 casi una resezione addomino-perineale.

Il CEA medio era 7.13+-8.51. |

Lo stadio del tumore era: T1N0M0 (2 casi), T2N0M0 (4 casi), T3N0M0 (10 casi), T3N1M0 (3 casi), T3N2M0 (un caso), T3N2M1 (un caso), T4N0M0 (un caso), T4N2M0 (un caso) e T4N2M1 (un caso).

Lo stadio dei tumori del retto dopo trattamento neoadiuvante neoadiuvante erano: yp-T0N0M0 (un caso), yp-T1N0M0 (2 casi), yp-T2N0M0 (2 casi).

Età, BMI, CEA, Albumina, trigliceridi, colesterolo, proteinemia, istotipo (WHO), grado di differenziazione, infiltrazione perineurale, reazione linfocitaria, fronte di avanzamento, tumor budding, infiltrazione linfovaskolare intra ed extramurale, infiltrazione linfovaskolare intra ed extramurale, SUV e TNM patologico sono stati registrati per valutare le correlazioni con i risultati della ¹H MRS.

Per l'analisi spettroscopica è stato utilizzato un magnete Oxford (4.7 T) equipaggiato con hardware Bruker (Biospec System) e una bobina di volume di diametro 72 mm. Il pezzo operatorio è stato inserito in un contenitore cilindrico in plastica, riempito con soluzione salina che è stato inserito nella bobina di volume.

L'analisi spettroscopica sul pezzo chirurgico asportato è stata realizzata in 5 sedi: sul tumore, posizionando il voxel sull'area più omogenea; sulla parete viscerale in corrispondenza dello strato mucoso/sottomucoso, in una zona vicina al tumore e in un'area più lontana dal tumore; sul tessuto adiposo vicino e lontano dal tumore. Il volume del voxel in tutte le acquisizioni è stato di 4³-5³ mm³.

La scelta di eseguire acquisizioni sul tessuto adiposo vicino e lontano dal tumore derivava dalle osservazioni realizzate sui topi nudi in cui avevamo impiantate cellule HT29 a livello rettale. Nei topi lo sviluppo neoplastico era associato a metastasi linfonodali e il grasso vicino al tumore e ai linfonodi coinvolti da malattia presentava modificazioni anatomiche anche in rapporto al tempo intercorso tra l'impianto e il sacrificio dell'animale.

Questo fenomeno non è di facile comprensione; è probabile che il grasso subisca degli stimoli dal tumore che inducono delle trasformazioni (mesenchimalizzazione) o che l'organismo tenta di difendersi dall'aggressione neoplastica modificando l'area che circonda la neoplasia stessa (Sbarbati).

L'intervallo di tempo tra l'exeresi chirurgica e l'esame spettroscopico era di 4h e 15' con range di 3-5 h.

La parete viscerale vicina al tumore si trovava a una distanza media di 2,37±1,04 cm, la parete viscerale lontana dal tumore si trovava a una distanza media di 4,30±0,93 cm; il tessuto adiposo vicino al tumore era ad una distanza media di 1,91±

0,85cm, mentre il tessuto adiposo lontano dal tumore era ad una distanza media di 4,24 +/-0,92 cm.

Le distanze sono state misurate in rapporto alla posizione del voxel sul tumore e non dal margine della neoplasia.

Il voxel è stato accuratamente posizionato sul tumore tenendo conto della morfologia ed estensione dello stesso, scegliendo non solo la zona di maggiore omogeneità, ma anche priva di aria; mentre sulla parete viscerale vicino e lontano sono stati scelti gli strati mucoso e sottomucoso, posizionando il voxel tra i due.

Di seguito sono rappresentate le immagini di MRI e gli spettri ottenuti sul tumore e sulla parete viscerale sana.

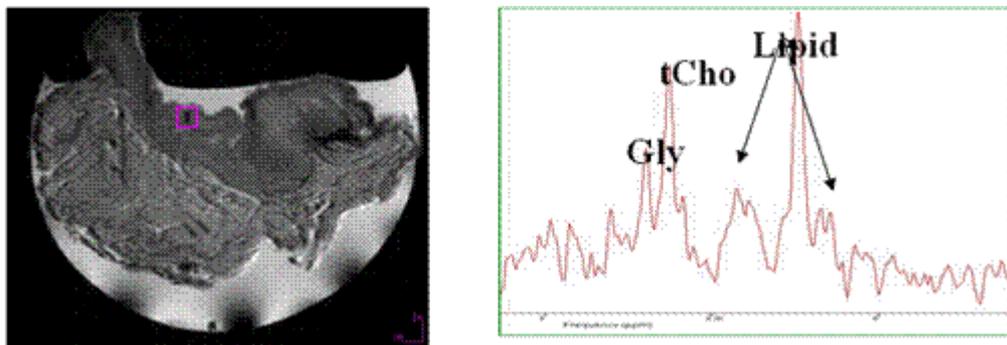


Fig. 1: Analisi spettroscopica sul tumore

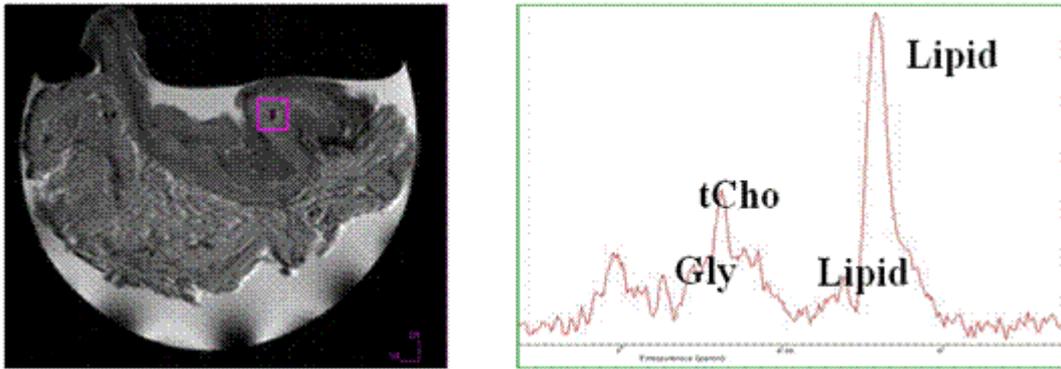


Fig. 2: Analisi spettroscopica su parete viscerale vicino al tumore

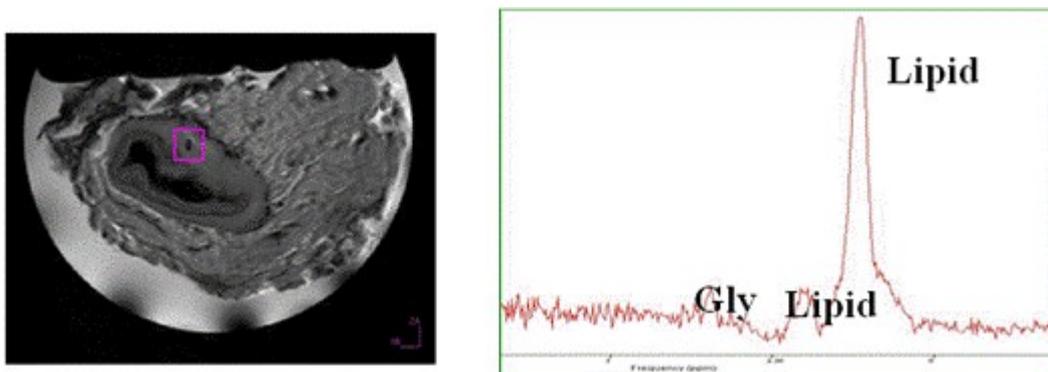


Fig. 3: Analisi spettroscopica su parete viscerale lontano dal tumore

Il tumore e la parete viscerale sana sono stati acquisiti con sequenze PRESS con soppressione dell'acqua (VAPOR) e senza soppressione dell'acqua, TR/TE (Repetition Time /Tempo di Eco) = 4000/22 ms, NEX (Number of Experiments) = 64 – 128, BW (Band Width) 20.03 ppm, numero di punti acquisiti 1024.

Sul tessuto adiposo sono state utilizzate 4 sequenze PRESS senza soppressione dell'acqua con TR/TE =4000/9, 22, 32, 52 ms in modo da ottenere una correzione in T2 sia per l'acqua non soppressa che per il segnale lipidico.

Il tumore, la parete viscerale sana vicina al tumore e quella lontana, il tessuto adiposo vicino e lontano dal tumore sono stati analizzati attraverso il software jMRUI (versione 4.0).

E' stato utilizzato per l'analisi l'algoritmo QUEST con un modello di 12 lorentziane (acqua non soppressa compresa) per il tessuto adiposo e un modello di 11 lorentziane per le componenti lipidiche più i picchi lorentziani per colina, taurina, glicina, PEG per il tumore e la parete viscerale sana.

Il tessuto adiposo è stato caratterizzato attraverso l'indice UI (indice di insaturazione) e PI (indice di polinsaturazione) che misurano rispettivamente, il numero medio di doppi legami e il numero di doppi legami coniugati nella catena del trigliceride.

In figura 4 è illustrata la formula del trigliceride e il relativo spettro protonico MRS (1) e quello ottenuto con NR-NMR(2). Con le lettere sono indicate le componenti chimiche dello spettro. Con le stesse lettere si indica anche la loro ampiezza (area sotto la curva che è proporzionale alla presenza chimica di quella parte del trigliceride) nel segnale spettroscopico.

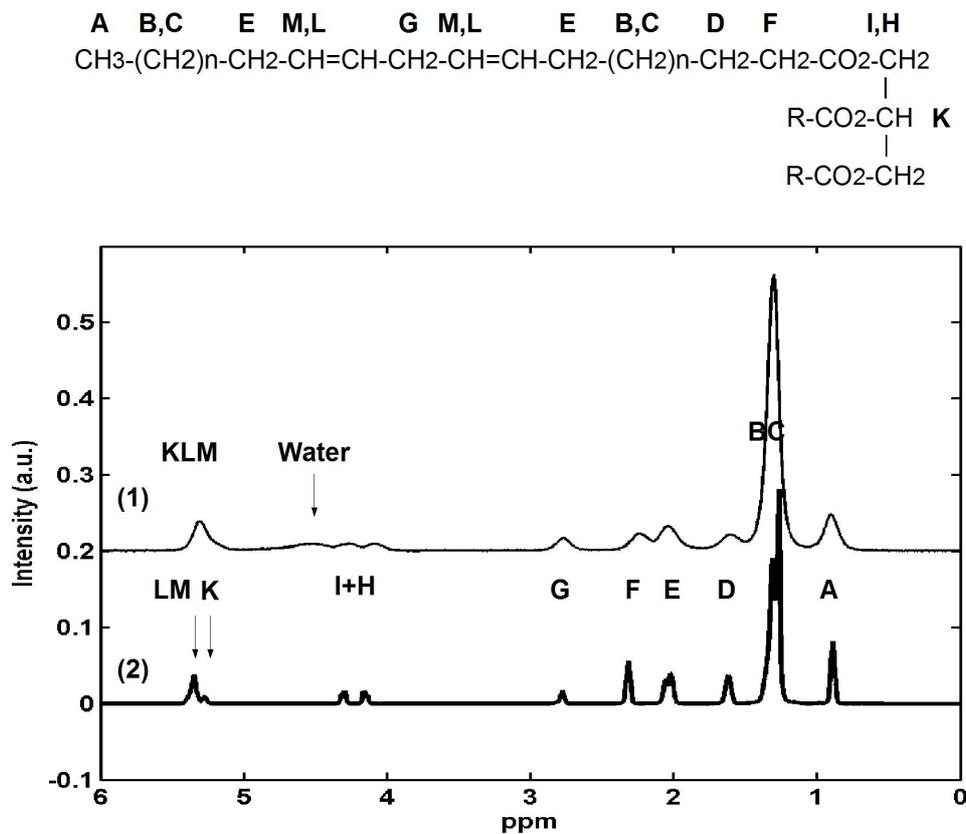


Fig. 4: formula del trigliceride e spettro protonico

I calcoli di UI e PI sono stati realizzati con le seguenti formule:

$$ui = LM / (2/3A)$$

$$[LM=LMK-1/9A]$$

$$pi = G / (2/3A)$$

Nelle formule riportate l'UI ed il PI sono ricavati dall'ampiezza di specifici segnali MRS del trigliceride (Fig. 4) e dai loro rapporti matematici.

Anche la quantità di acqua nel tessuto adiposo è stata valutata in termini di rapporto tra l'area sottostante il picco dell'acqua presente nel tessuto lipidico e quella del segnale lipidico, considerando le differenze nel rilassamento trasversale (T2) per il segnale del lipide e picco dell'acqua. La formula impiegata per il calcolo del rilassamento T2 è la seguente:

$$M_{TE} = M_0 [\exp (- TE/T_2)]$$

M_{TE} è l'ampiezza del segnale acquisito con un determinato TE e M_0 è l'ampiezza del segnale acquisito con TE = 0.

Dalle osservazioni di Chan è risultato che l'analisi spettroscopica con HR-MAS NMR protonica del carcinoma coloretale evidenziava sul tumore un aumento della colina, glicina e taurina e un decremento del segnale dei lipidi rispetto la parete viscerale sana.

Per questo motivo noi abbiamo considerato come marker di malignità il rapporto tra i segnali che risuonano tra 3.0 e 3.5 ppm ($A_{3.0 \text{ e } 3.5 \text{ ppm}}$), rappresentati da colina $[N(CH_3)_3]$ che risuona a 3.2 ppm, taurina (N-CH₂), che risuona a 3.24 ppm e la glicina (alfa CH₂) che risuona a 3.56 ppm e il segnale del principale componente del trigliceride (BC) che risuona a 1.3 ppm.

Questo marker M è espresso dalla seguente formula:

$$M = A_{3.0 \text{ e } 3.5 \text{ ppm}} / BC$$

Il valore ottenuto è stato confrontato con le caratteristiche istologiche del tumore, i dati clinici, laboratoristici e strumentali a disposizione.

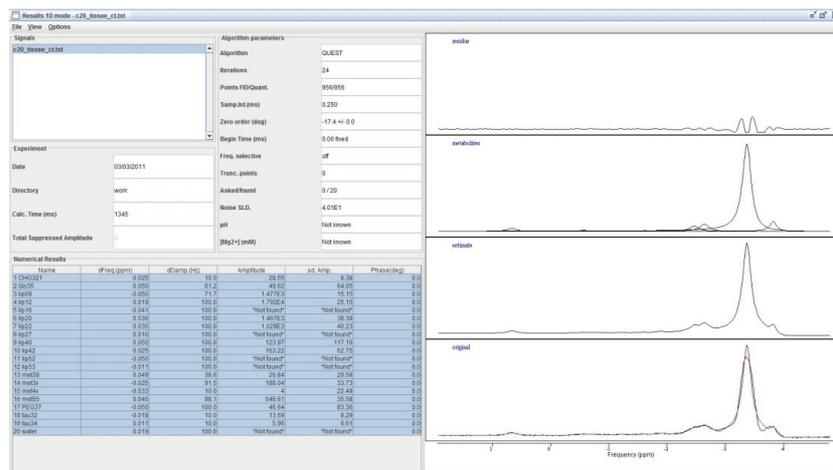


Fig. 5: Esempio di jMRUI prodotto dal tumore con picco di colina e glicina

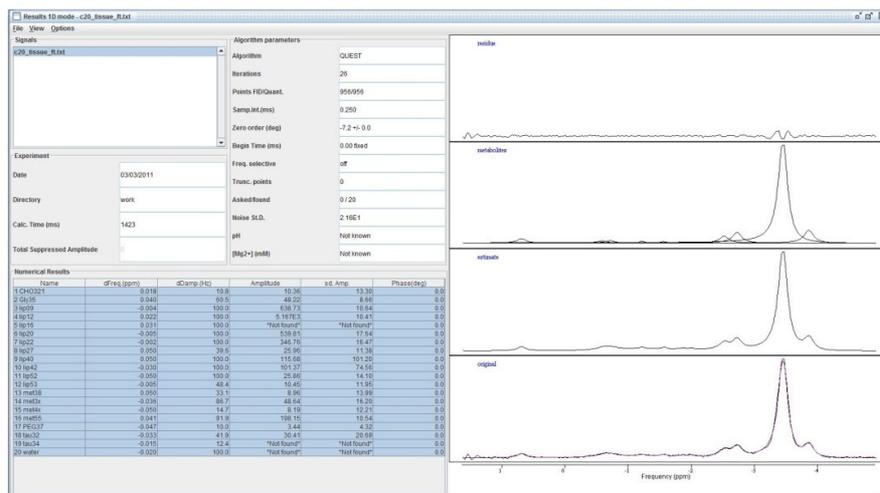


Fig. 6: Esempio di jMRUI prodotto dal tessuto viscerale sano vicino al tumore

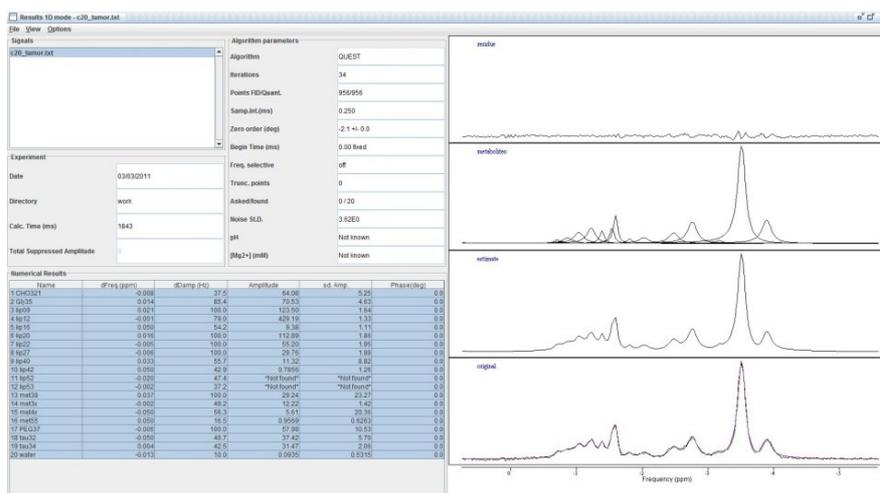


Fig. 7: Esempio di jMRUI prodotto dal tessuto viscerale sano lontano dal tumore

4.3 Risultati

Pazienti sottoposti a trattamento neoadiuvante

I tumori del retto sottoposti a trattamento neoadiuvante rappresentano un piccolo campione che consente di fare solo poche riflessioni.

Su 5 casi analizzati, in un caso è stata realizzata l'acquisizione solo sul tumore, in un caso il rapporto segnale/rumore non era sufficiente per l'analisi spettroscopica e nei restanti 3 casi sono state ottenute informazioni riguardo il tumore, parete viscerale sana vicina e lontana dal tumore e tessuto adiposo vicino e lontano dal tumore.

Nei 4 casi in cui è stato acquisito il tumore, in 3 casi l'M era > 0 e l'esame istologico documentava malattia residua e in un caso l'M era nullo.

In questo paziente, l'esame istologico documentava la presenza di malattia residua per cui le ipotesi formulate sono state due: l'acquisizione è stata realizzata nell'area di fibrosi e/o necrosi indotta dalla radioterapia o che la radioterapia aveva alterato il metabolismo della colina e /o degli altri marker neoplastici cellulari.

In fig. 8 è rappresentato il valore M con la stima dell'errore calcolata da QUEST

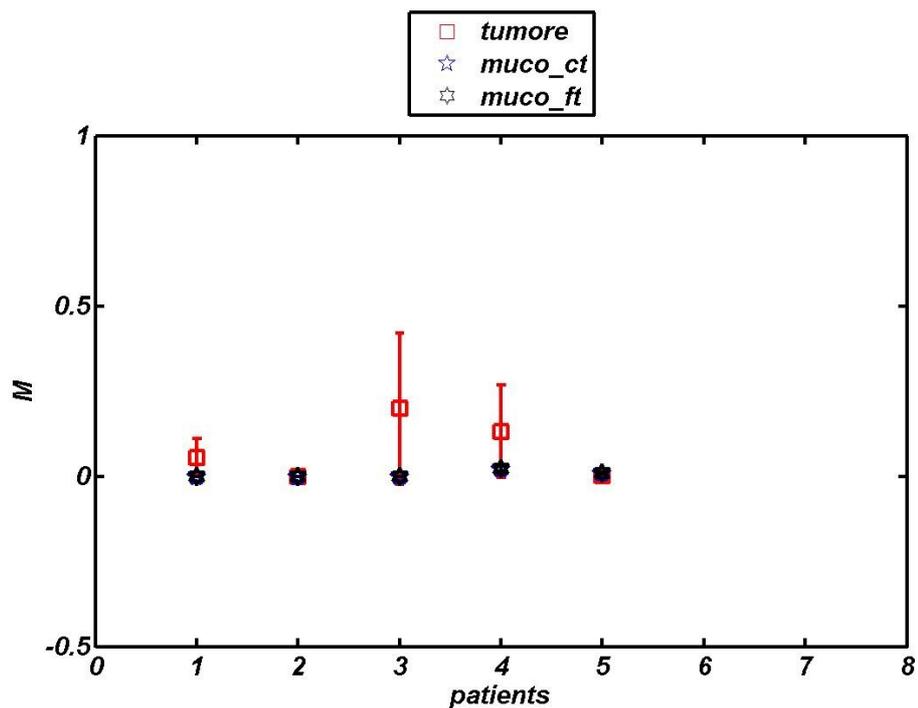


Fig. 8: Plot del valore di M ($M = A_{3.0 \text{ e } 3.5 \text{ ppm}} / BC$) del tumore e della parete viscerale sana (HT) distante e vicina rispetto al tumore. L'ordinata indica il valore di M mentre in ascissa sono disposti i singoli pazienti analizzati.

I valori di UI e PI in questi retti radiochemioterattati non avevano correlazione con nessun dato clinico.

Per confermare l'ipotesi che il trattamento radiante sia la causa delle modificazioni metaboliche evidenzibili sul tumore e sulla parete viscerale sana e per capire i meccanismi con cui questo si realizza, vi è la necessità di incrementare il campione in esame ed esaminare istologicamente la stessa area analizzata con spettroscopia.

Pazienti non sottoposti a trattamento neoadiuvante

L'analisi spettroscopica del tessuto neoplastico, della parete viscerale vicina e lontana dal tumore mostravano una grande variabilità, come risulta evidente dagli spettri di seguito riportati.

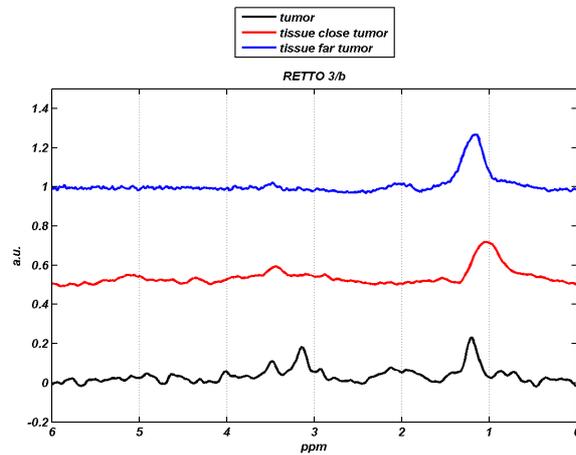


Fig. 9: Esempio di tumore del retto

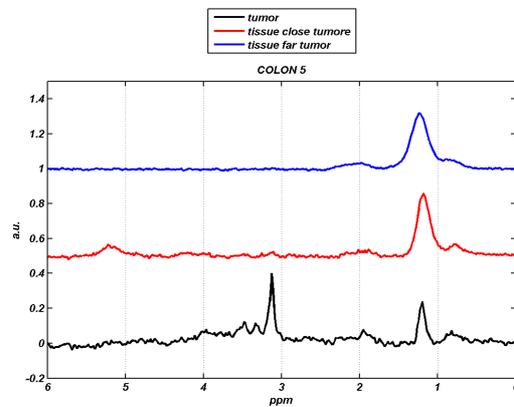


Fig.10: esempio di tumore del colon ascendente

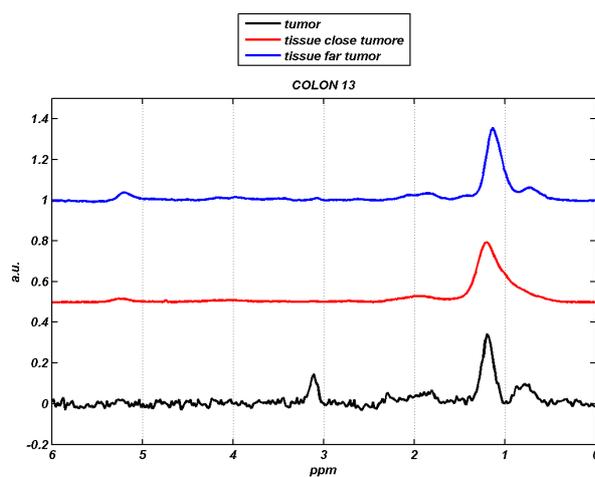


Fig. 11: esempio di tumore del colon discendente

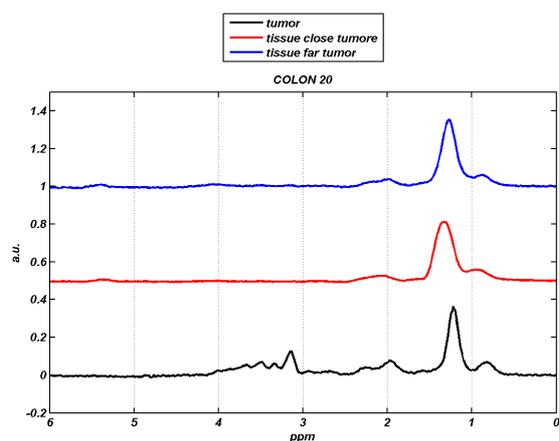


Fig. 12: esempio di tumore del sigma-retto

In fig. 13 è rappresentato il valore M con la stima dell'errore nei tumori colorettaali. In 18 casi su 25 il valore M era più alto nei tumori rispetto alla parete viscerale sana, in 3 casi M era più alto nel tessuto sano rispetto al tumore e nei restanti 4 casi nessuna informazione è stata ritenuta affidabile a causa del basso rapporto segnale/rumore o delle disomogeneità del segnale che non ha consentito una corretta analisi.

Questi 3 casi in cui M era più alto sulla parete sana si è ipotizzato che l'acquisizione sia stata realizzata su un' area della parete viscerale apparentemente sana

all'ispezione macroscopica e all'imaging, o che il contenuto di lipide nella parete sana era molto basso (aumento M).

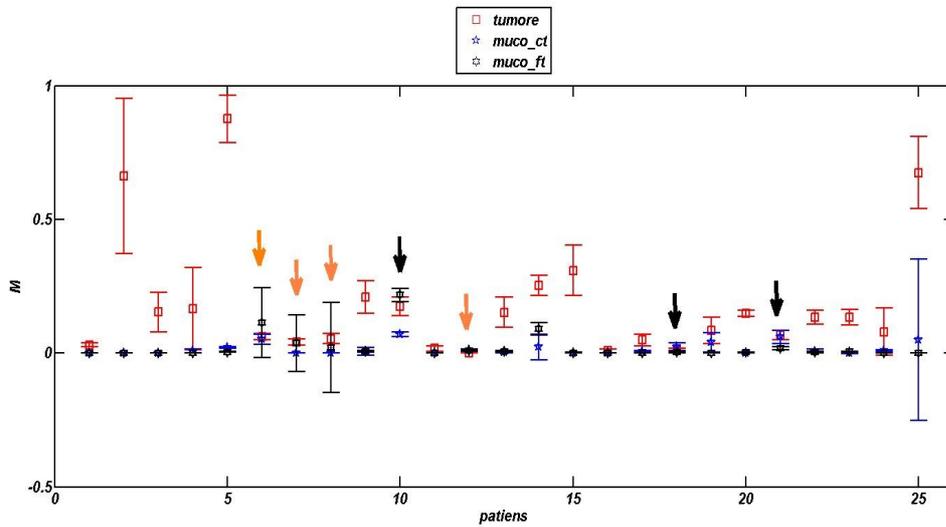


Fig 13: Plot del valore di M ($M = A_{3.0 \text{ e } 3.5 \text{ ppm}} / BC$) del tumore e della parete viscerale sana (HT) distante e vicina rispetto al tumore. L'ordinata indica il valore di M mentre in ascissa sono disposti i singoli pazienti analizzati. Le frecce nere indicano i casi in cui M era maggiore nella parete viscerale sana rispetto al tumore; le frecce arancioni indicano i casi non affidabili.

Un'interessante correlazione è stata trovata tra il valore di M e il SUV (Fig.14), considerando solo i casi il cui l'errore relativo sulla stima di M era <50% (18 casi)

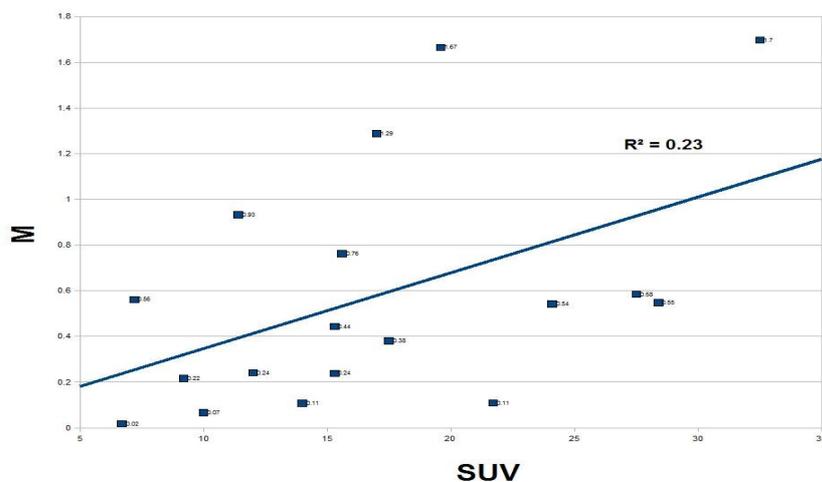


Fig.14 :Plot di correlazione tra il valore di SUV e M. Correlazione di Person $R^2 = 0.23$

Nessuna correlazione era evidente tra valore di M e stadio della neoplasia (T1,T2, T3, T4).

La concentrazione di acqua nel lipide variava dall'1% al 30%.

La media del contenuto di acqua nel tessuto adiposo era 0.14 ± 0.16 mentre in quello lontano era 0.12 ± 0.09 .

Non è stata osservata alcuna correlazione dell'UI e del PI con l'età (Fig. 15).

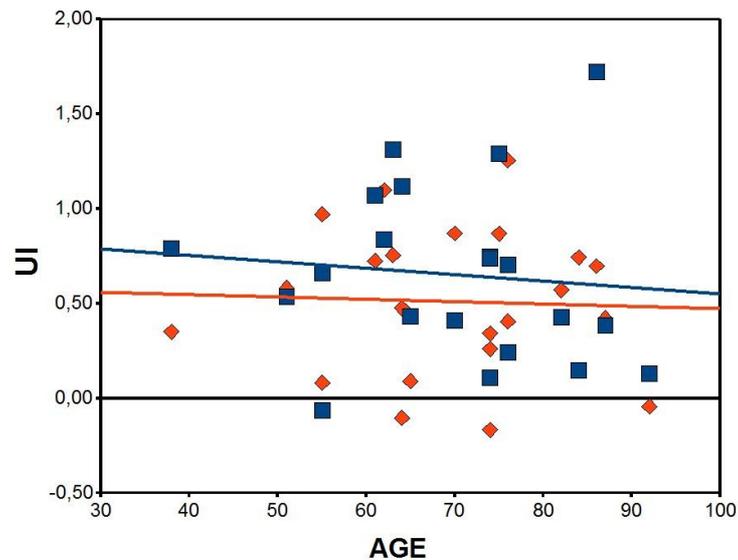


Fig. 15: Plot di correlazione tra l'età e l'indice di insaturazione (UI) del tessuto adiposo distante (blue) e vicino al tumore (rosso). La correlazione di Person rivela che l'UI del tessuto adiposo vicino e lontano dal tumore non è correlato con l'età.

Non è stata trovata alcuna correlazione tra UI e PI del tessuto adiposo vicino e lontano al tumore e trigliceridi , colesterolo e glicemia rilevati nel siero dei pazienti
Nel tessuto adiposo lontano dal tumore è risultato che l'UI era correlato con il BMI, in particolare decresceva al crescere del BMI: questa correlazione non esisteva nel grasso vicino (Fig.16).

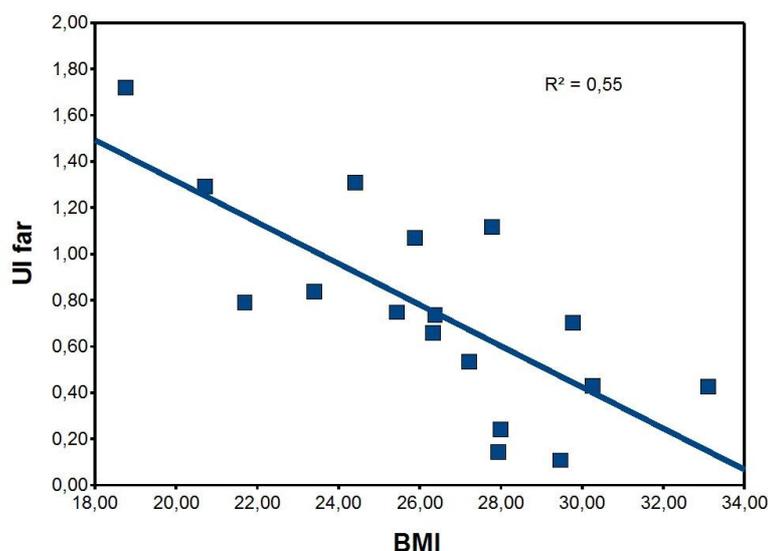


Fig 16: Plot di correlazione tra BMI e indice di insaturazione (UI) lipidico per il tessuto adiposo lontano dal tumore. Correlazione di Person $R^2=0.55$

I pazienti sottoposti a chemioterapia adiuvante con xelox (capecitabina+oxaliplatino) sono stati 8.

In 3 pazienti con malattia metastatica all'esordio, nonostante il trattamento chemioterapico, si è verificata progressione di malattia a livello epatico in un caso, epatico e polmonare in un altro caso e a livello del tessuto sottocutaneo gluteo e del braccio nel restante caso.

Due pazienti hanno presentato metastasi nel corso del follow-up: epatiche (un caso) e peritoneali (un caso).

In questi 5 casi non vi è alcuna relazione con M e in soli 2 casi era presente un SUV elevato (18.2 e 20.5).

Ad un follow-up medio di 7,6 mesi (range 1-12) un solo paziente è deceduto per progressione di malattia, mentre un'altra paziente è deceduta per scompenso cardiaco.

4.4 Conclusioni

Questa ricerca è il primo tentativo di eseguire una mappatura metabolica del carcinoma coloretale con MRS protonica su segmenti intestinali.

Le precedenti ricerche sono state eseguite su colture cellulari, su ratti in cui erano impiantate cellule di carcinoma coloretale e su prelievi biotici di tumore.

Esiste una sola ricerca di MRS protonica eseguita in vivo in pazienti affetti da carcinoma del retto (6 casi).

In 4 su 5 acquisizioni realizzate su retti neoadiuvati è stata documentato un valore di $M > 0$. I valori di M non presentavano nessuna correlazione con i dati clinici, di laboratorio, con tutte le indagini preoperatorie e con i risultati dell'esame istologico.

In un caso con malattia residua M era nullo (falso negativo).

I pazienti neoadiuvati, soprattutto quelli con risposta clinica completa, sono di difficile analisi perché la scelta del voxel risulta complessa per le modificazioni indotte dal trattamento sulla parete del viscere e sul tumore, la cui massa è ridotta o non è visibile macroscopicamente: il rischio di eseguire l'indagine sulla parete intestinale normale risulta evidente.

Si aggiunga che il campione preso in esame è estremamente scarso per numero e non consente riflessioni valide.

Pazienti senza trattamenti oncologici pregressi avevano tutti valori di $M > 0$.

Non si comprende la presenza di valori di M più elevati nella mucosa sana (3 casi) rispetto ai valori di M registrati sul tumore, se non ipotizzando la presenza di localizzazione a distanza da diffusione neoplastica sottomucosa longitudinale o di processi infiammatori transmurali a distanza dal tumore.

Ritengo che la correlazione tra i valori di M e SUV possa essere in rapporto all'attività metabolica del tumore: è ben noto che la velocità di crescita di un tumore è correlata strettamente con i valori di SUV.

Per quanto riguarda la spettroscopia realizzata su tessuto adiposo, pur essendo la nostra esperienza l'unica a valutare il tessuto adiposo peritumorale e periviscerale in soggetti affetti da carcinoma coloretale, confermano i risultati di ricerche sperimentali sul topo realizzate presso la nostra Università (2) riguardo la correlazione tra UI e PI con l'età e anche i risultati di studi condotti nel grasso del muscolo scheletrico dell'uomo per cui l'UI cresceva al crescere del BMI (3).

Non vi sono infine, correlazioni tra M e presenza o sviluppo post-operatorio di metastasi a distanza.

Una parte dei risultati insoddisfacenti derivano dall'analisi spettroscopica realizzata con H MRS che individua un numero limitato di metaboliti.

Un secondo limite è determinato dalla difficoltà nella scelta del voxel da analizzare soprattutto nei casi con assenza macroscopica di tumore all'ispezione o all'imaging:

in questa ricerca la scelta è stata indirizzata dalle informazioni fornite dall'imaging pre-operatorie e sul pezzo chirurgico asportato, non di rado poco accurata.

Ritengo che la spettroscopia ex vivo su pezzo operatorio debba essere associata a spettroscopia su biopsie del tumore o in caso di trattamento neoadiuvante su biopsie nell'area dove era originariamente presente tumore.

BIBLIOGRAFIA

1. Glynn-Jones R , Wallace M, Livingstone JIL, Meyrick-Thomas J. Complete Clinical Response after preoperative chemoradiation in rectal cancer: Is a “Wait and see” policy justified? *Dis Colon Rectum* 51: 10-20; 2008
2. Giarola M, Rossi B, Mosconi E, Fontanella M, Marzola P, Scambi I, Sbarbati A, Mariotto G. Fast and minimally invasive determination of the unsaturation degree of white fat depots by micro-Raman spectroscopy. Paper submitted to *Lipids*
3. Velan SS, Said N, Durst C, Frisbee S, Frisbee J, Raylman RR, Thomas MA, Rajendran VM, Spencer RG, Alway SE. Distinct patterns of fat metabolism in skeletal muscle of normal-weight, overweight, and obese humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 Oct;295(4):R1060-5. Epub 2008 Jul 30.