

IMAGING E SPETTROSCOPIA DI RISONANZA MAGNETICA *IN VIVO*: VALUTAZIONE DELLO SVILUPPO, DELLA PROGRESSIONE E DELL'EFFETTO DEL TRATTAMENTO IN TUMORI SPERIMENTALI

Rossella Canese, Franca Podo, Giulia Carpinelli

Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

La possibilità di caratterizzare *in vivo*, in modo non invasivo, alterazioni associate a processi di trasformazione neoplastica, progressione tumorale e risposta alla terapia, rappresenta un obiettivo avanzato della ricerca oncologica.

Le odierne metodologie di spettroscopia di risonanza magnetica (*Magnetic resonance spectroscopy*, MRS), unite alle più note tecniche d'immagine (*Magnetic resonance imaging*, MRI), si propongono di analizzare aspetti della biochimica dei tumori *in vitro* e *in vivo* associati al *grading* di malignità (1), nonché agli effetti metabolici della risposta alla terapia di differenti oncotipi tumorali (2).

La diagnostica per immagini è in continua evoluzione, tuttavia permane la difficoltà di ottenere una diagnosi non invasiva attendibile per esempio nei processi espansivi del sistema nervoso centrale, tanto da rendere essenziale un'accurata definizione delle caratteristiche biopatologiche attraverso l'effettuazione di procedure biottiche.

Le tecniche MRI ed MRS possono contribuire alla definizione dell'efficacia terapeutica di farmaci antiblastici convenzionali e innovativi, non solo mediante analisi morfologica ma anche grazie ad informazioni specifiche su i processi di crescita e progressione.

A questo scopo la MRI pesata in diffusione (*Diffusion-weighted imaging*, DWI) sta emergendo come tecnica particolarmente promettente. È, infatti, in grado di fornire un contrasto endogeno tra tessuto normale e tumorale, basato sulla diversa di capacità di diffusione dell'acqua nei diversi tessuti. Inoltre, attraverso la misura del coefficiente di diffusione apparente (*Apparent diffusion coefficient*, ADC) è possibile monitorare o predire la risposta a diversi trattamenti (3).

Importanti informazioni possono essere dedotte sia dal valore medio del parametro ADC sia dalla sua distribuzione. Infatti, regioni con elevato ADC corrispondono ad aree di necrosi, mentre la riduzione dell'ADC si ritiene dovuta alla riduzione dello spazio extracellulare e quindi alla presenza di edema citotossico. Da questo tipo di misure si può anche avere una stima della frazione vascolare (*Vascular signal fraction*, VSF) cioè la percentuale di segnale che proviene dall'acqua che sta fluendo dentro ai vasi rispetto all'acqua che diffonde nel tessuto. Si può quindi avere una stima della vascolarizzazione del tumore in studio.

Un altro importante strumento per lo studio dei tumori è la spettroscopia localizzata (MRS) *in vivo*, un insieme di quelle tecniche spettroscopiche che, mediante l'utilizzo di gradienti di campo magnetico statico, localizzano il volume di interesse all'interno dell'organismo, e sono in grado di fornire informazioni biochimiche di un particolare organo o distretto corporeo o addirittura di suddividere l'organo o la lesione in esame in tanti piccoli *voxel* dove effettuare le misure spettroscopiche con alta risoluzione spaziale (oggi si arriva fino al mm³). Questo tipo di

approccio è in grado di monitorare sia i livelli di diversi metaboliti sia parametri fisiologici come il pH intracellulare ed extracellulare.

La nostra ricerca in questi anni è stata rivolta alla valutazione della possibilità di correlare il *grading* di malignità di tumori o i differenti oncotipi e fenotipi ad alterazioni specifiche di parametri MRS e MRI in modelli sperimentali e alla identificazione degli effetti metabolici e morfologici indotti da farmaci convenzionali e innovativi.

Applicazioni di MRI e misure di ADC su modelli tumorali sperimentali

In questi anni sono stati studiati differenti modelli di tumori primitivi del sistema nervoso centrale, in particolare, modelli di astrocitomi maligni ottenuti mediante impianto stereotassico intracerebrale sia di linee cellulari umane in topi immunodepressi sia modelli singeneici nel ratto (4-6). Alcuni esempi sono mostrati in Figura 1. Questi modelli sono stati trattati con farmaci convenzionali (BCNU e gemcitabina) e non convenzionali quali gli antagonisti dei recettori metabotropici del glutammato, e peptidi con potenziali strategie terapeutiche innovative in grado di ridurre i livelli di espressione di CXCR4.

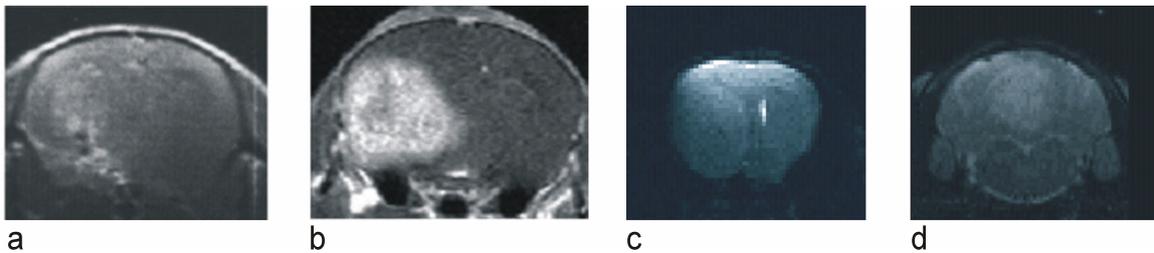


Figura 1. T1-W MRI MdC con Gadolinio, (a) rappresentativo di modello di glioblastoma ottenuto da inoculo di culture primarie di cellule umane (b) da inoculo di cellule U87 MG; T2-W MRI rappresentativo di un modello ottenuto da inoculo di cellule (c) staminali umane di glioblastoma e (d) da inoculo di cellule umane di medulloblastoma

La MRI *in vivo* ha permesso di evidenziare le differenti caratteristiche morfologiche dei vari modelli e di monitorare gli effetti del trattamento in alcuni casi anche in assenza di una riduzione dell'area tumorale (5, 6) (Figura 2). L'analisi quantitativa dell'ADC eseguita su modelli di tumori cerebrali ottenuti da cellule C6 impiantate in ratti Wistar, a 72 ore dopo il trattamento con gemcitabina, mostrava un aumento del 38% del valore medio rispetto a quelli non trattati. L'entità delle variazioni in ADC era coerente con l'indice apoptotico stimato con TUNEL. La percentuale di cellule apoptotiche in media nei trattati era del 20% rispetto al 7% del gruppo dei controlli.

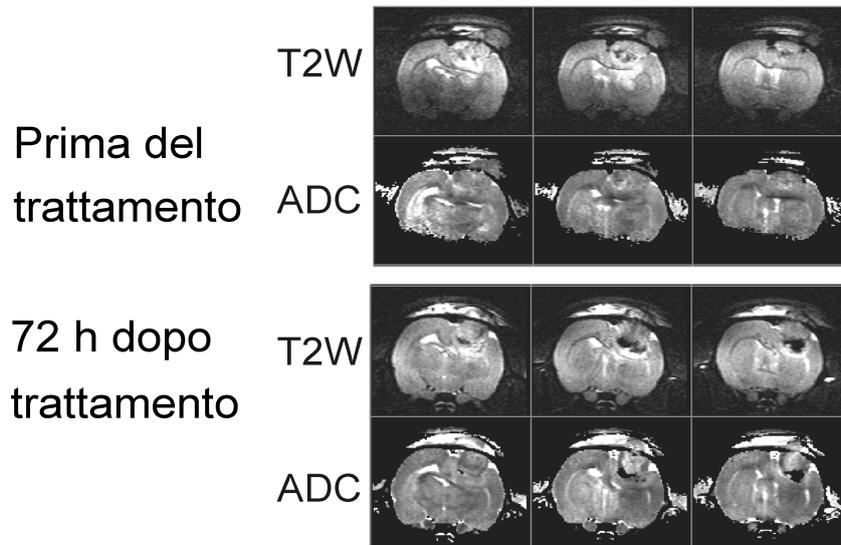


Figura 2. T2-W e ADC MRI di tumori C6 impiantati nel ratto prima e dopo trattamento con gemcitabina

Misure di DWI e di ADC sono state effettuate dal nostro gruppo su modelli di tumori ovarici derivati dall'inoculo sottocutaneo (s.c.) o intraperitoneale (i.p.) in topi immunocompromessi (SCID) di una linea cellulare umana, SKOV3.ip (7), dimostrando un buon accordo dei valori di ADC tra i due tipi di inoculi ($16,4 \pm 1,1$ per inoculi i.p. e $15,8 \pm 0,3 \times 10^{-4} \text{mm}^2/\text{s}$ per inoculi s.c.) e con i valori riportati in clinica nelle pazienti (8). Un esempio di mappa di ADC di un modello di tumore ovarico umano i.p. è mostrato in Figura 3a.

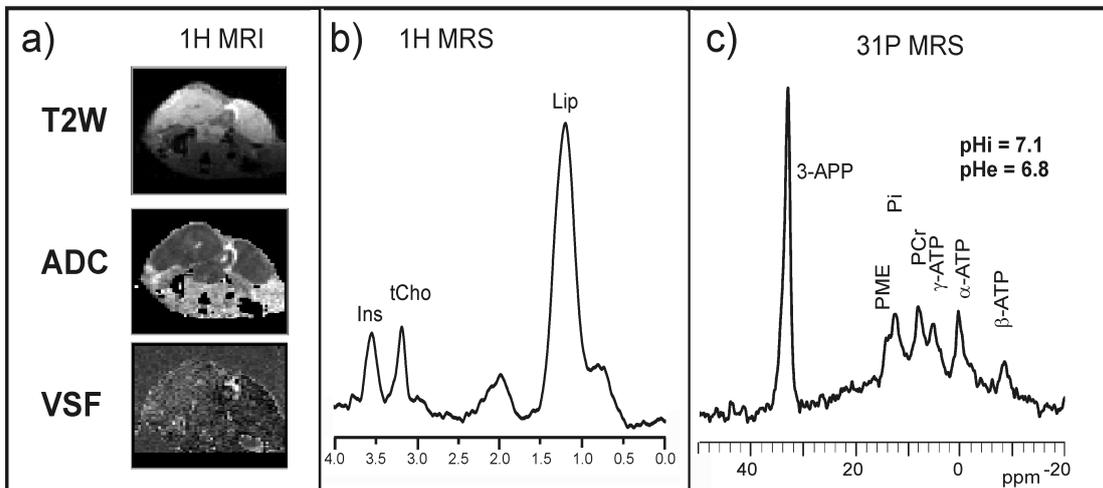


Figura 3. Immagini e spettri MR di modelli preclinici di tumore ovarico ottenuti da xenotrapianti di cellule umane in topi SCID. a) Immagini MR spin eco pesate in T2 (T2W), mappe di ADC e di VSF di xenotrapianti impiantato nel peritoneo. b) Tipico spettro protonico localizzato nel tumore, ottenuto con sequenza PRESS. c) Tipico spettro di fosforo localizzato nel tumore ottenuto con bobina superficiale

Analisi di ADC in due modelli di tumore ovarico ottenuti da cellule di tumore ovarico umano selezionate per la loro diversa attività glicolitica in topi SCID hanno consentito di monitorare la differente risposta indotta dal trattamento con un inibitore del fattore di crescita vascolare endoteliale (9). Si è osservato un aumento del valore dell'ADC nei tumori più glicolitici (ottenuti da cellule OC316), dovuto ad un aumento delle aree necrotiche e una riduzione dell'ADC nei tessuti tumorali con minore attività glicolitica (cellule IGROV1), attribuito alla possibile presenza di edema citotossico.

Applicazioni di ^1H MRS *in vivo* in modelli sperimentali di tumori umani

Per le analisi ^1H MRS è stato sviluppato nel nostro gruppo un robusto protocollo quantitativo che utilizza il segnale dell'acqua come riferimento interno di concentrazione protonica e corretto per il suo tempo di rilassamento T2, parametro il cui valore è soggetto a possibili variazioni durante la crescita tumorale (7, 10). I livelli dei metaboliti così misurati sono risultati in buon accordo con analisi *ex vivo* dimostrando la robustezza del protocollo. Inoltre la semplicità del metodo e la limitata durata di acquisizione ne garantiscono la trasferibilità alla clinica.

Spettri ^1H di tumori sperimentali ottenuti dall'inoculo sottocutaneo (s.c.) in topi SCID di cellule di carcinoma ovarico umane caratterizzate da diversa attività glicolitica (quali OC316, IGROV1 e SKOV3.ip) (7, 9) hanno mostrato come la MRS fosse in grado di discriminare fenotipi differenti. La maggiore attività glicolitica delle cellule OC316 rispetto alle altre linee è stata caratterizzata dalla presenza del segnale dell'acido lattico negli spettri protonici di xenograft derivati da queste cellule. Il segnale del lattico era presente solo in alcuni degli spettri di tumore derivati dalle altre linee cellulari e con minore intensità.

Profili spettrali differenti caratterizzano modelli sperimentali di carcinoma ovarico ottenuti da cellule con diversi livelli di espressione del recettore HER2 (quali OVCA432 e SKOV3.ip) (11). Gli spettri ^1H ottenuti da cellule OVCA432 sono caratterizzati da un alto segnale di derivati della colina, mentre quelli derivati dall'inoculo delle cellule SKOV3.ip, oltre al segnale della colina, hanno mostrato anche la presenza di un alto segnale di inositolo (Figura 3b). Queste evidenze, rafforzate da analisi *in vitro*, sostengono la validità dei modelli proposti, per una valutazione di variazioni del metabolismo in tumori ovarici in risposta a trattamenti mirati.

L'utilità della ^1H MRS nella diagnosi e valutazione della risposta al trattamento di tumori cerebrali è stato certamente il più documentato ma sono ancora in via di sviluppo procedure per la standardizzazione dell'acquisizione e delle tecniche di analisi.

Applicazioni di spettroscopia ^{31}P e misure di pH *in vivo* in modelli tumorali sperimentali

In tutti i tessuti umani la regolazione del pH intracellulare ed extracellulare è regolata da meccanismi complessi. Questi meccanismi però risultano alterati in molte patologie, tra cui i tumori. Metodi clinici per il controllo del bilancio acido-base sono limitati da monitoraggi sistemici e non possono verificare squilibri di pH che possono avvenire in particolari regioni. Negli ultimi anni sono stati sviluppati metodi non invasivi che fanno uso della risonanza

magnetica in grado di misurare il pH intracellulare ed extracellulare in particolari tessuti o distretti corporei.

Le misure di pH con tecniche spettroscopiche fanno uso di sonde esogene per i diversi nuclei, cioè sostanze non tossiche e quindi adatte a studi preclinici che non penetrano all'interno della cellula e che danno luogo a segnali spettrali dalla cui posizione nello spettro (*chemical shift*) si può calcolare il pH del tessuto in esame.

Il nucleo che risponde meglio a questi requisiti è il nucleo del fosforo (^{31}P). Infatti, la ^{31}P MRS ha il grande vantaggio di poter misurare simultaneamente il pH extracellulare (utilizzando la sonda 3-aminopropilfosfonato, 3-APP) e il pH intracellulare dalla posizione del segnale del fosfato inorganico che nei tumori con buona approssimazione si reputa che provenga dallo spazio intracellulare (12). Un esempio di spettro ^{31}P è mostrato in Figura 3c. Inoltre la ^{31}P MRS consente di osservare numerosi segnali provenienti da metaboliti sia ad alto contenuto energetico (fosfocreatina e ATP) sia basso contenuto energetico (intermedi metabolici del ciclo della fosfatidilcolina, fosfato inorganico, ecc.). Un'accurata analisi di questi segnali consente stime quantitative dei livelli di questi metaboliti, ma anche il monitoraggio nel tempo di variazioni di concentrazione nelle reazioni di interconversione.

La spettroscopia di protone (^1H MRS) ha invece l'enorme vantaggio dell'abbondanza di nuclei dell'idrogeno nei tessuti biologici che, unito all'alto rapporto giromagnetico, produce segnali con maggiore rapporto segnale/rumore (S/N). Questo si traduce in una maggiore risoluzione spaziale e maggiore sensibilità. In altre parole si è in grado di suddividere i tumori in piccoli voxel e misurare i parametri spettrali in ciascuno dei voxel di interesse. Anche per questi studi sono state sviluppate sonde esogene quali IEPA (acido 2-(imidazol-1-il)-3-etossicarbonil propionico) (13) e ISUCA (acido 2-(imidazolo-1-il)succinico) (14) per le misure di pH extracellulare.

Un altro approccio per la misura del pH è la spettroscopia del fluoro (^{19}F MRS). Con il vantaggio dell'assenza di metaboliti fluorurati nell'organismo lo spettro ottenuto è dovuto esclusivamente alle sostanze somministrate. Anche per il fluoro esiste una sonda che permette di misurare il pH extracellulare, l'acido ZK-150471 (3-[N-(4-fluo-2-trifluorometilfenil)-sulfamoil]-propionico, (15)) ma la ^{19}F MRS può anche applicata allo studio di *delivery* e *uptake* di farmaci fluorurati (16).

In questi ultimi anni sono state osservate modulazioni del pH *in vivo* con la ^{31}P MRS in melanomi umani (17), e murini (dati non pubblicati) a seguito di trattamenti con inibitori delle pompe protoniche, PPI (omeprazolo ed esomeprazolo). In questi studi abbiamo messo in evidenza una riduzione significativa del pH extracellulare fino a 6 ore dopo la somministrazione del PPI.

Conclusioni e prospettive future

La MRS *in vivo* non è ancora considerata uno strumento di routine clinica, ma è stata impiegata per la valutazione della crescita tumorale e per diagnostica differenziale in alcuni importanti centri di ricerca in ambito sia accademico che ospedaliero. Studi MRI ed MRS su modelli tumorali volti ad evidenziare i parametri di risonanza che meglio possono monitorare le risposte a trattamenti mirati restano tuttora di fondamentale importanza. A tal scopo saranno ampliati gli studi MRI ed MRS con approccio multiparametrico sia nel tumore ovarico che in modelli di carcinoma della mammella e di tumori cerebrali.

Infine, le misure di pH intra- ed extra-cellulare e le loro modulazioni a seguito di trattamenti saranno estese a tumori spontanei della mammella in topi transgenici (collaborazione con il dott.

Proietti e collaboratori, ISS e con la dott.ssa Serenella Pupa della Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori di Milano (18).

L'esperienza consolidata ci permetterà di seguire gli effetti di differenti trattamenti, sia nei modelli già noti, sia in altre patologie tumorali. Sono stati, infatti, avviati studi su un modello di carcinoma corticosurrenalico, con l'obiettivo di testare l'effetto di farmaci convenzionali come il mitotane, delle radiazioni ionizzanti, singolarmente e in associazione tra loro, e di un ligando selettivo del recettore GPR30, denominato G-1, che come è stato dimostrato, regola l'attivazione di una serie di segnali intracellulari (es. MAPK e PI3K) coinvolti nella proliferazione e migrazione cellulare. Questo lavoro finanziato da un progetto AIRC è frutto di una collaborazione con il prof. Pezzi dell'università della Calabria, Arcavacata di Rende (Cosenza) e il dott. Stigliano dell'Università La Sapienza di Roma.

Un aspetto innovativo a cui stiamo dedicando alcuni nostri studi è l'uso di nanoparticelle (NPs). In collaborazione con l'Istituto di Biologia e Patologia Molecolare del Consiglio Nazionale delle Ricerche, e l'Istituto Dermatologico dell'Immacolata-IRCCS di Roma studieremo in un modello di melanoma murino l'effetto di Ft-NPs (cioè particelle di magnetite all'interno di gusci formati dalle catene H della ferritina umana) nell'angiogenesi tumorale. Le analisi MRI insieme agli altri risultati di questo progetto parzialmente finanziato dall'AIIRC forniranno le informazioni necessarie per stabilire se le Ft-NPs siano dotate di sufficiente potenziale diagnostico e terapeutico per essere sottoposte ad ulteriori studi preclinici, tossicologici e clinici.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano la dott.ssa Silvana Canevari e la dott.ssa Delia Mezzanzanica (Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano); il dott. Stefano Indraccolo e coll. (Istituto Oncologico Veneto-IRCCS, Padova); il dott. Stefano Fais e il dott. Angelo De Milito (Dipartimento del Farmaco, ISS); il prof. Ferdinando Nicoletti e coll. (Università La Sapienza, Roma); il prof. Giuseppe Battaglia (Istituto Neuromed, Venafro, Isernia); il dott. Ruggero De Maria (Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, ISS); la dott.ssa Stefania Scala (Istituto Tumori Pascale, Napoli); il prof. Carmine Maria Carapella (Istituto Tumori Regina Elena, Roma) per la stimolante ed esperta collaborazione scientifica; il dott. Filippo Santoro per il contributo prestato in alcuni esperimenti di risonanza magnetica *in vivo* nei modelli di glioma; il dott. Egidio Iorio per l'esperto contributo nella sperimentazione *in vitro*; il dott. Alessandro Ricci e la dott.ssa Maria Elena Pisanu per il contributo alle analisi di risonanza magnetica *in vitro*; Massimo Spada, Albino Cesolini, Massimo Venditti e Emiliano Surrentino per assistenza nell'allestimento dei modelli preclinici.

Finanziamenti: Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC 2007-2009), Ministero della Salute (Programma Integrato Oncologia RO 06.5/N.ISS/Q; Programma Ordinario Oncologia OncOrd 37/07/N. ISS/70CF/4; Programma Speciale Alleanza Contro il Cancro 2006, ACC3-AC9/C e ACC3-AC5/D; Progetto Malattie Rare 7FR2).

Bibliografia

1. Carpinelli G, Carapella CM, Palombi L, Raus L, Caroli F, Podo F. Differentiation of glioblastoma multiforme from astrocytomas by *in vitro* 1H MRS analysis of human brain tumors. *Anticancer Res* 1996;16:1559-63.
2. Iorio E, Ricci A, Bagnoli M, Pisanu ME, Castellano G, Di Vito M, Venturini E, Glunde K, Bhujwala ZM, Mezzanzanica D, Canevari S, Podo F. Activation of phosphatidylcholine cycle enzymes in human epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2010;70:2126-35.
3. Koh DM, Collins DJ. Diffusion-weighted MRI in the body: applications and challenges in oncology. *AJR Am J Roentgenol* 2007;188:1622-35.

4. Arcella A, Carpinelli G, Battaglia G, D'Onofrio M, Santoro F, Ngomba RT, *et al.* Pharmacological blockade of group II metabotropic glutamate receptors reduces the growth of glioma cells *in vivo*. *Neuro Oncol* 2005;7:236-45.
5. Carpinelli G, Bucci B, D'Agnano I, Canese R, Caroli F, Raus L, Brunetti E, Giannarelli D, Podo F, Carapella CM. Gemcitabine treatment of experimental C6 glioma: the effects on cell cycle and apoptotic rate. *Anticancer Res* 2006;26:3017-24.
6. Ciceroni C, Arcella A, Mosillo P, Battaglia G, Mastrantonio E, Oliva MA, *et al.* Type-3 metabotropic glutamate receptors negatively modulate bone morphogenetic protein receptor signaling and support the tumorigenic potential of glioma-initiating cells. *Neuropharmacology* 2008;55:568-76.
7. Canese R, Pisanu ME, Mezzanzanica D, Ricci A, Paris L, Bagnoli M, Valeri B, Spada M, Venditti M, Cesolini A, Rodomonte A, Giannini M, Canevari S, Podo F, Iorio E. Characterization of *in vivo* ovarian cancer models by quantitative magnetic resonance imaging and spectroscopy. *NMR Biomedicine* 2012;25(4):632-42.
8. Sala E, Priest AN, Kataoka M, Graves MJ, McLean MA, Joubert I, Griffiths JR, Crawford RA, Jimenez-Linan M, Earl HM, Brenton JD, Lomas DJ. Apparent diffusion coefficient and vascular signal fraction measurements with magnetic resonance imaging: feasibility in metastatic ovarian cancer at 3 Tesla: technical development. *Eur Radiol* 2010;20:491-96.
9. Nardo G, Favaro E, Curtarello M, Moserle L, Zulato E, Persano L, *et al.* Glycolytic Phenotype and Amp Kinase Modify the Pathologic Response of Tumor Xenografts to Vegf Neutralization. *Cancer Res* 2011;71(12):4214-25.
10. Canese R, Iorio E, Ricci A, Pisanu ME, Giannini M, Podo F. Metabolite Quantification in Tumours by Magnetic Resonance Spectroscopy: Objectives, Results and Perspectives. *Current Medical Imaging Reviews* 2009;5:110-27.
11. Podo F, Sardanelli F, Iorio E, Canese R, Carpinelli G, Fausto A, Canevari S. Abnormal Choline Phospholipid Metabolism in Breast and Ovary Cancer: Molecular bases for Noninvasive Imaging Approaches. *Current Medical Imaging Reviews* 2007;3:123-37.
12. Raghunand N, He X, van Sluis R, Mahoney B, Baggett B, Taylor CW, Paine-Murrieta G, Roe D, Bhujwala ZM, Gillies RJ. Enhancement of chemotherapy by manipulation of tumour pH. *Br J Cancer* 1999;80:1005-11.
13. Garcia-Martin ML, Herigault G, Remy C, Farion R, Ballesteros P, Coles JA, Cerdan S, Ziegler A. Mapping extracellular pH in rat brain gliomas *in vivo* by 1H magnetic resonance spectroscopic imaging: comparison with maps of metabolites. *Cancer Res* 2001;61:6524-31.
14. Provent P, Benito M, Hiba B, Farion R, Lopez-Larrubia P, Ballesteros P, *et al.* Serial *in vivo* spectroscopic nuclear magnetic resonance imaging of lactate and extracellular pH in rat gliomas shows redistribution of protons away from sites of glycolysis. *Cancer Res* 2007;67:7638-45.
15. Ojugo AS, McSheehy PM, McIntyre DJ, McCoy C, Stubbs M, Leach MO, Judson IR, Griffiths JR. Measurement of the extracellular pH of solid tumours in mice by magnetic resonance spectroscopy: a comparison of exogenous (19)F and (31)P probes. *NMR Biomed* 1999;12:495-504.
16. McSheehy PM, Robinson SP, Ojugo AS, Aboagye EO, Cannell MB, Leach MO, Judson IR, Griffiths JR. Carbogen breathing increases 5-fluorouracil uptake and cytotoxicity in hypoxic murine RIF-1 tumors: a magnetic resonance study *in vivo*. *Cancer Res* 1998;58:1185-94.
17. De Milito A, Canese R, Marino ML, Borghi M, Iero M, Villa A, *et al.* pH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by inhibition of tumor acidity. *Int J Cancer* 2010;127(1):207-19.
18. Marchini C, Gabrielli F, Iezzi M, Zenobi S, Montani M, Pietrella L, *et al.* The Human Splice Variant Delta16HER2 Induces Rapid Tumor Onset in a Reporter Transgenic Mouse. *PLoS ONE* 2011;6:e18727.