

Università degli Studi di Firenze

DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOTECNOLOGIE ENDOCRINOLOGICHE,
MOLECOLARI E RIGENERATIVE

CICLO XXV

COORDINATORE Prof. Gianni Forti

(firma)

La Farmacogenetica
nel trattamento radioterapico del
carcinoma testa-collo

Settore Scientifico Disciplinare MED/13

Dottorando

Dott. Nicola Pratesi

(firma)

Tutore

Prof. Mario Pazzagli

(firma)

Anni 2008/2009-2011/2012

Al Prof. Claudio Orlando

E io a lui: «Poeta, io ti richeggio
per quello Dio che tu non conoscesti,
a ciò ch'io fugga questo male e peggio,

che tu mi meni là dov' or dicesti,
sì ch'io veggia la porta di san Pietro
e color cui tu fai cotanto mesti».

Allor si mosse, e io li tenni dietro.

DANTE ALIGHIERI, *La divina Commedia*, Inferno, I, 130-136.

Indice

1 . MECCANISMI MOLECOLARI DI CANCEROGENESI	5
2 . CARCINOMA SQUAMOSO DEL DISTRETTO TESTA-COLLO	12
2.1 Eziologia	13
2.2 Sintomatologia	15
2.3 Diagnosi	18
2.4 Chirurgia	23
2.5 Radioterapia	24
2.6 Effetti collaterali della radioterapia	26
2.7 Chemioterapia	30
2.8 Effetti collaterali della chemioterapia	31
3 . LA FARMACOGENETICA	38
3.1 Farmacogenetica in oncologia	41
3.2 . Citotossicità da radiazioni	45
3.2.1 Meccanismi di riparazione di danni diretti al DNA	47
3.2.2 XRCCI	48
3.2.3 Riparazione delle rotture su entrambi i filamenti del DNA	51
3.2.4 XRCC3	52
3.2.5 RAD51	54
3.2.6 Sistemi di protezione contro i ROS	56
3.2.7 GSTP-1	56
4 . HRM: RICERCA DI SNPs	59
5 . MATERIALI E METODI	68
5.1 Campioni	68
5.2 Protocollo sperimentale	69

5.3 Analisi statistica.....	70
6 . SCOPO DELLA TESI.....	72
7 . RISULTATI.....	76
7.1 Determinazione dei genotipi negli SNPs studiati tramite PCR-HRMA.....	76
7.1.1 Messa a punto del protocollo di PCR	76
7.1.2 Messa a punto del protocollo HRMA	77
7.2 Determinazione mediante HRMA dello SNP sul gene XRCC3	78
7.3 Determinazione mediante HRMA dello SNP sul gene XRCC1	82
7.4 Determinazione mediante HRMA dello SNP sul gene GSTP1	85
7.5 Determinazione mediante HRMA dello SNP sul gene RAD51	87
7.6 Notazioni cliniche dei pazienti SCCHN trattati con RT	89
7.6.1 Genotipi e frequenze alleliche.....	91
7.6.2 Associazione tra la variante di XRCC1 e la comparsa di mucosite acuta.....	92
7.6.3 Associazione tra la variante di RAD51 e la comparsa di disfagia acuta.....	96
7.6.4 Associazione tra lo status genotipico XRCC1 c.1196A>G/RAD51 c.-3429 G>C e lo sviluppo di effetti collaterali radio-indotti	99
8 . CONCLUSIONI	102
9 . BIBLIOGRAFIA	106
10 . RINGRAZIAMENTI.....	109

1 . MECCANISMI MOLECOLARI DI CANCEROGENESI

Il tumore, dal latino *tumor*, rigonfiamento, o neoplasia, dal greco *neo*, nuovo, *plasia*, formazione, è una patologia caratterizzata dalla proliferazione incontrollata da parte di cloni di cellule, che, in seguito all'esposizione più o meno prolungata a fattori ambientali di tipo cancerogeno (tumori sporadici) o per la presenza di fattori genetici predisponenti (tumori ereditari), subiscono danni al loro patrimonio genetico e cessano di rispondere ai meccanismi fisiologici di controllo cellulare.

La trasformazione avviene attraverso la formazione iniziale di lesioni precancerose che col tempo possono trasformarsi in tumori invasivi. Queste possono insorgere molti anni prima dalla comparsa del tumore vero e proprio. Le cellule cancerose, una volta trasformate, sviluppano la tendenza a diffondere nell'organismo, a formare metastasi prima ai linfonodi vicini e successivamente all'intero organismo.

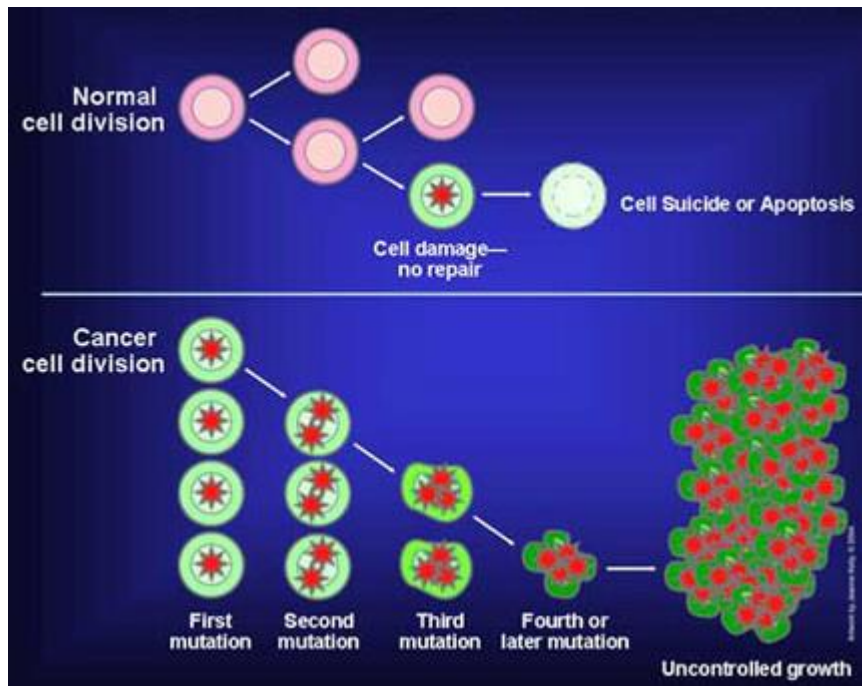


Figura 1. Differenza tra proliferazione cellulare normale e proliferazione neoplastica

Fino ad oggi il cancro è la seconda causa di morte nel mondo (1), dopo le patologie cardiovascolari, ma secondo l'OMS il cancro si avvia a diventare la prima causa di morte. L'Agenzia per la ricerca sul cancro dell'Oms, secondo cui i morti per tumore, fermi oggi a sette milioni l'anno in tutto il mondo, cresceranno dell'1% ogni anno, un'epidemia dovuta, nella sua crescita torrenziale, soprattutto all'aumento dell'uso di tabacco nei paesi in via di sviluppo, India e Cina in testa, dove ad oggi vive il 40 per cento di tutti i fumatori del mondo.

Molte importanti informazioni riguardo alla biologia cellulare del cancro sono pervenute a noi grazie all'impiego in laboratorio delle colture cellulari.

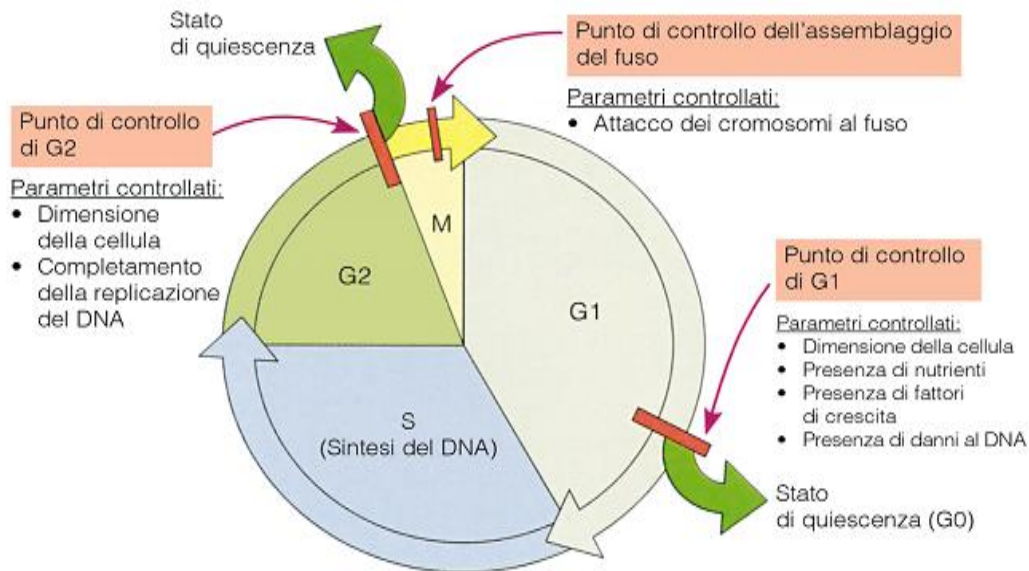


Figura 2. Le fasi del ciclo cellulare e i relativi check-point

Le cellule cancerose hanno delle caratteristiche fenotipiche particolari fra cui la perdita dell'inibizione da contatto: mentre le cellule normali cessano di moltiplicarsi quando hanno raggiunto la confluenza, le cellule trasformate continuano a dividersi, impilandosi una sull'altra. Inoltre le cellule cancerose, a differenza delle cellule normali (tranne quelle emopoietiche che crescono in sospensione) che hanno bisogno di aderire sulla superficie di un supporto solido per poter crescere e dividersi, sono spesso capaci di crescere in sospensione. Contrariamente alle cellule normali, le cellule trasformate sono indipendenti dai fattori di crescita perché sono capaci di secernere nel medium i propri fattori di crescita. Infine le cellule cancerose sono immortali, cioè sono capaci di dividersi all'infinito a differenza delle cellule normali che sono capaci di dividersi un numero limitato di volte.

I principali tipi di cancro sono:

- carcinomi: di origine epiteliale
- sarcomi: propri dei tessuti connettivi in genere (muscoli, ossa, pareti vasali, membrane sierose, tessuto adiposo), hanno una limitata incidenza in quanto rappresentano l'1% di tutti i tumori maligni
- ematologici: leucemie, linfomi e mielomi

Studi recenti hanno identificato tre gruppi di geni che risultano frequentemente mutati nelle neoplasie: gli oncogeni, i geni soppressori di tumori (oncosoppressori, TS), i geni mutatori.

Gli oncogeni sono geni che regolano positivamente il ciclo cellulare. Le versioni normalmente non mutate sono propriamente chiamate proto-oncogeni. Le versioni mutate sono attive in modo eccessivo o improprio. Un singolo allele mutante può influenzare il fenotipo dell'intera cellula, cioè le mutazioni che si verificano sono dominanti. Questo implica che si abbia il segnale di proliferazione cellulare, promosso dagli oncogeni, anche in assenza di uno stimolo esterno (per esempio una ferita) o interno (trasmesso da un fattore di crescita). In altri casi il segnale di proliferazione cellulare si ha in presenza di un stimolo, però sono alterati i meccanismi di spegnimento del segnale.

Attualmente si conosce il ruolo di molti proto-oncogeni cellulari. E' possibile distinguere cinque classi principali:

- fattori di crescita (ad esempio SIS)
- recettori sulla superficie cellulare (ad esempio ERBB, FMS)

- componenti di sistemi intercellulari di trasduzione del segnale (ad esempio la famiglia RAS, ABL)
- proteine nucleari che si legano al DNA, compresi i fattori di trascrizione (ad esempio MYC, JUN)
- componenti del circuito delle cicline, chinasi ciclina-dipendenti e inibitori delle chinasi che governano la progressione del ciclo cellulare (ad esempio PRAD1).

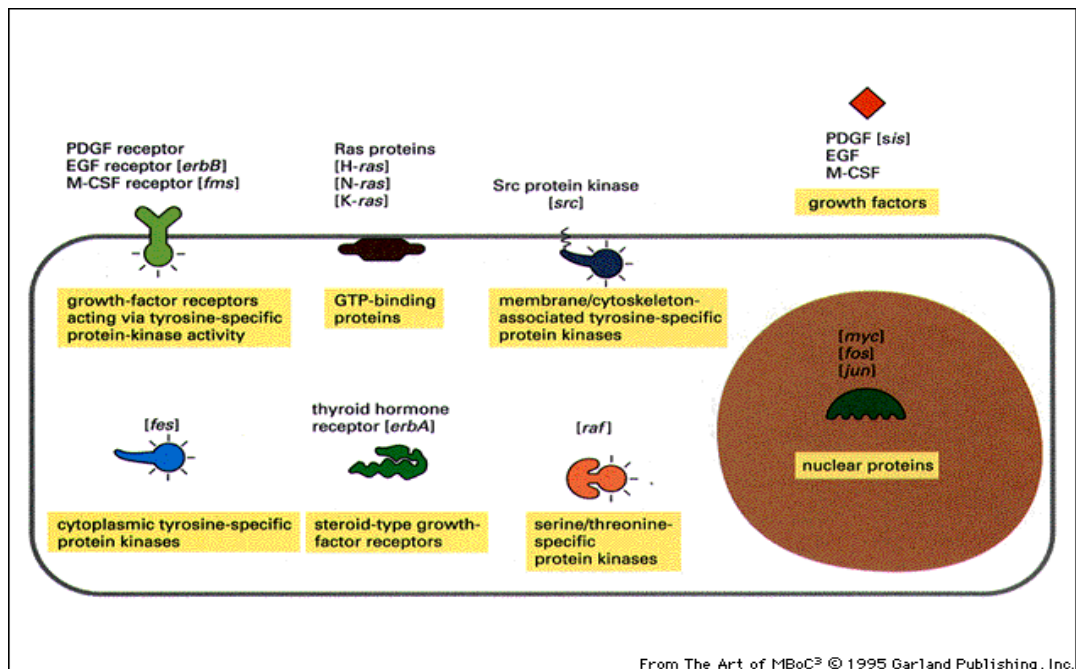


Figura 3. Alcuni proto-oncogeni umani.

L'attivazione dei proto-oncogeni implica un aumento della loro funzionalità. Questa può essere:

- quantitativa, quando si verifica un aumento nella produzione di un prodotto non modificato;

- qualitativa, quando si ha la produzione di un prodotto leggermente modificato in seguito ad una mutazione o alla formazione di un nuovo prodotto da un gene chimerico formato in seguito ad un riarrangiamento cromosomico.

L'attivazione di alcuni proto-oncogeni può avvenire in seguito ad amplificazione, in cui molte cellule cancerose contengono più copie di proto-oncogeni strutturalmente normali. Centinaia di copie sovranumerarie possono essere presenti o come piccoli cromosomi indipendenti (double minutes) o come inserzione nei cromosomi normali (HSRs - homogeneously staining regions). Alcuni proto-oncogeni sono attivati da mutazioni puntiformi, invece l'attivazione di altri proto-oncogeni è causata da traslocazioni cromosomiche. Tipicamente le cellule tumorali hanno cariotipi grossolanamente alterati, con aberrazioni cromosomiche strutturali o di numero. La maggior parte di queste alterazioni sono casuali e riflettono una generica instabilità del genoma, che è una componente caratterizzante la carcinogenesi. Infatti le cellule tumorali solitamente hanno cariotipi anomali, con molte delezioni, acquisizioni e riarrangiamenti di cromosomi, solo alcuni dei quali sembrano connessi in modo causale con il cancro.

Un'altra classe di geni che risultano mutati nelle neoplasie è costituita dai geni soppressori di tumore (TS) o oncosoppressori che codificano per prodotti proteici che inibiscono la proliferazione cellulare. Le versioni mutanti che si trovano nelle cellule tumorali hanno perso la loro funzionalità. Per cambiare il comportamento di una cellula devono essere inattivati entrambi gli alleli di un gene TS, perciò le mutazioni che si

verificano a carico di tali geni sono mutazioni recessive. Uno studio di Knudson (1971) arrivava alla conclusione che fossero necessarie due mutazioni successive, cioè due eventi, per trasformare una cellula normale in una cellula tumorale. In seguito un brillante studio di Cavenee et al. (1983), sulla forma familiare del retinoblastoma, ha dimostrato l'ipotesi di Knudson e ha stabilito il paradigma per tutti i successivi studi sui geni TS.

La terza classe di geni coinvolti nei tumori è formata dai geni mutatori i quali sono responsabili del mantenimento dell'integrità del genoma e della fedeltà nel trasferimento dell'informazione; la perdita di funzione di entrambi gli alleli espone la cellula a commettere errori nella replicazione o nella riparazione del DNA. Questi possono generare mutazioni ad esempio in oncogeni e geni TS. A differenza dei proto-oncogeni e dei geni TS, che sono direttamente coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, i geni mutatori che comunemente risultano mutati nelle cellule cancerose, non fanno parte di questo circuito.

2 . CARCINOMA SQUAMOSO DEL DISTRETTO TESTA-COLLO

I tumori della testa e del collo (o del distretto cervico-facciale) rappresentano il 5% di tutti i tumori.

Per tumori del distretto testa-collo si intendono una serie di tumori maligni che originano da:

- Cavità orale
- Faringe
- Seni paranasali
- Cavità nasali
- Laringe
- Ghiandole salivari

Nell'ambito delle sedi che costituiscono il distretto cervico-facciale la laringe è la sede di comparsa del tumore più frequente, seguita dal cavo orale e dalla faringe.

Il 90% dei tumori maligni della testa e del collo è rappresentato da carcinomi spinocellulari (o carcinomi a cellule squamose o epidermoidali), un altro 5% è rappresentato da melanomi, linfomi o sarcomi; il restante 5% da tumori con altra istologia, tra i quali i tumori delle ghiandole salivari.). Tuttavia, a fronte di un'apparente omogeneità, il comportamento biologico può essere estremamente variabile. A lungo sono stati considerati come un gruppo uniforme di tumori che si differenziavano solo per la sede anatomica; oggi grazie alle tecniche di genetica molecolare che hanno consentito una risoluzione più fine, i carcinomi a cellule squamose sono stati suddivisi in vari sottotipi che differiscono per i fattori di rischio, per la patogenesi e per il comportamento clinico.

L'età media di insorgenza è attorno ai 60 anni nel caso di tumori del cavo orale, della laringe o della faringe. Sono invece più giovani i pazienti portatori di sarcomi, di carcinomi delle ghiandole salivari e della tiroide.

2.1 Eziologia

In circa l'80% dei pazienti, la causa principale del tumore del distretto cervicofacciale consiste nell'esposizione al fumo di tabacco e nell'elevato consumo di bevande alcoliche, ancor più se associati. Il fumo di tabacco, in particolare, costituisce sicuramente il fattore di rischio più importante. La relazione tra il numero di sigarette fumate e il cancro è lineare: tanto è maggiore il numero di sigarette fumate e tanto più è prolungato il periodo di esposizione al fumo, tanto è maggiore il rischio di contrarre un tumore del

distretto cervicofacciale. Questo spiega anche il motivo per il quale il paziente tende a sviluppare una seconda neoplasia dopo la raggiunta guarigione del primo tumore: il fumo e l'alcol sinergicamente determinano un danno diretto su tutta la mucosa di rivestimento delle vie aereo-digestive, rendendo la mucosa "condannata" ad alterazioni che la rendono cancerosa. Tale trasformazione richiede generalmente anni, prima della sua manifestazione. I tumori del cavo orale possono derivare anche da una scarsa igiene orale, da un errato posizionamento di protesi dentarie, dalla presenza di denti scheggiati, dalla masticazione di tabacco e dal fumo di pipa; in India la causa principale è la masticazione della foglia del betel. Per il tumore del labbro, l'esposizione al sole è un possibile fattore favorente. Il virus di Epstein-Barr, invece, è in stretta relazione con il carcinoma del rinofaringe o nasofaringeo. La causa virale è responsabile invece dell'insorgenza di una minoranza dei tumori del distretto cervico-facciale, in particolare del tumore del distretto orofaringeo. È verosimile che la presenza del virus nei tessuti sani possa predisporre allo sviluppo del cancro, anche in assenza dell'abuso di tabacco ed alcool. Per quel che concerne il tumore dei seni paranasali, che comprendono il seno mascellare e l'etmoide, si segnala l'esposizione all'inalazione di polveri di legno e prodotti della lavorazione del cuoio. Infatti questi tumori sono riconosciuti fra le malattie da esposizione professionale. È stato documentato un eccesso di rischio anche nei lavoratori dell'industria tessile, metallurgica, metalmeccanica e chimica. Inoltre, i pazienti che hanno ricevuto piccole dosi di radioterapia nel passato per cause diverse (acne, ingrossamento del

timo o delle adenoidi) hanno una predisposizione allo sviluppo dei tumori della tiroide e delle ghiandole salivari in quanto costituiscono le sedi della pregressa irradiazione. Infine esiste una piccola quota di pazienti per i quali non è possibile identificare una causa ben precisa: rappresentano un piccolo gruppo di uomini e donne che, pur non avendo subito l'esposizione ai classici fattori di rischio (fumo, alcol e virus) e pur applicando uno stile di vita sano al loro vivere quotidiano, manifestano il cancro. Sono persone con spiccata ed imprevedibile fragilità genetica che favorisce l'insorgenza del tumore. Al momento, sfortunatamente, non esistono esami diagnostici che permettono di identificare i soggetti a rischio di sviluppare la malattia, all'interno della popolazione generale sana. Questi non meglio definiti fattori genetici che favoriscono l'insorgenza del tumore rivestono un grande interesse per gli studiosi.

2.2 Sintomatologia

In genere, i tumori del distretto testa – collo rimangono confinati alla sede di origine probabilmente per qualche mese; solo in un secondo tempo, la malattia infiltra i tessuti confinanti e poi dà origine al processo di “metastatizzazione”, cioè ad una diffusione della malattia ai linfonodi del collo.

Le metastasi a distanza sono rare e, quando presenti, sono associate in genere a tumori molto avanzati o alla recidiva del tumore. Ne consegue che anche i sintomi siano correlati alla sede di insorgenza della malattia. Talora la malattia tumorale si manifesta attraverso la comparsa di un nodulo o di

un gonfiore al collo, che altro non è che un linfonodo coinvolto dalla malattia.

Il tumore iniziale della laringe si manifesta più spesso con alterazioni della voce (disfonia), ma quando è più esteso può dare segno di sé anche per la comparsa di difficoltà e di dolore alla deglutizione, che può estendersi fino all'orecchio. Più raramente il tumore si manifesta con la mancanza di respiro: si possono avvertire senso di affanno durante la notte, sotto sforzo o, nel caso di un tumore di notevoli dimensioni, difficoltà respiratorie persino in condizioni di riposo. Il tumore della faringe può interessare una delle sue 3 porzioni: il rinofaringe (parte superiore), l'orofaringe (parte intermedia) e l'ipofaringe (parte inferiore).

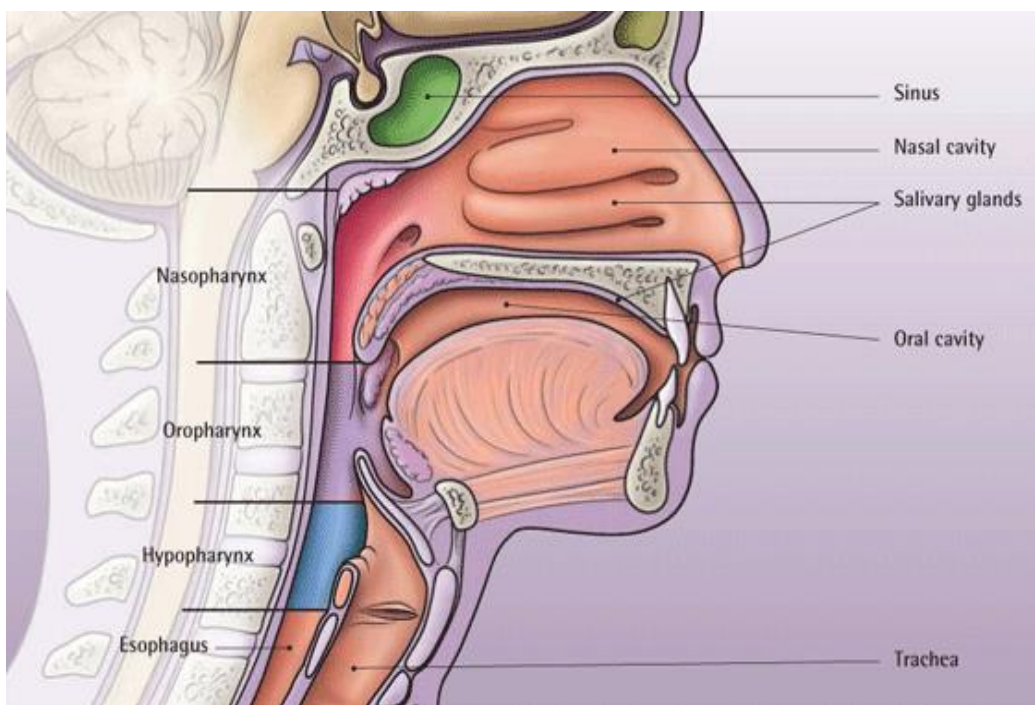


Figura 4. Il distretto testa-collo

Il tumore si accompagna ad una sensazione di fastidio, di corpo estraneo o di dolore alla gola, talvolta esteso all'orecchio per l'interessamento delle radici nervose, o per difficoltà a deglutire, alito fetido, voce nasale, abbondante produzione di saliva; oppure, come nella metà dei casi, esordisce con uno o più linfonodi del collo ingrossati. Il tumore del rinofaringe esordisce con una sintomatologia piuttosto subdola: nella fase iniziale della malattia, infatti, i sintomi sono di poco rilievo. A seconda della localizzazione, il paziente può avvertire sintomi auricolari quali calo dell'udito, ronzii, fischi, otiti recidivanti, sensazione di orecchie tappate. Spesso il primo segno di malattia è la comparsa di gonfiore al collo che indica l'interessamento linfonodale della malattia. Più raramente il paziente può accusare sintomi di ostruzione respiratoria nasale, con sensazione di naso chiuso, abbondanti secrezioni nasali, talvolta epistassi (perdite improvvise di sangue dal naso). Nei casi di malattia più avanzata, quando la malattia sconfinava dal rinofaringe andando ad interessare la parte più profonda, cioè l'endocranio, il paziente avverte cefalea (anche violenta e non rispondente ai comuni trattamenti), perdita dell'olfatto, calo della visione o visione doppia. Nel caso di tumore del cavo orale vengono interessati la lingua, le gengive, la superficie interna della guancia, il labbro, il pavimento della bocca, il palato o quella regione situata oltre i denti del giudizio. I sintomi sono spesso sfumati: il paziente può avvertire la presenza di una massa o di un gonfiore; può accusare modesti sanguinamenti o riferire la presenza di piccole vesciche, ulcere o ferite che non rimarginano. Nel caso di progressione della malattia vi può essere

dolore, incapacità a sporgere la lingua, deviazione della lingua o addirittura impossibilità ad aprire la bocca. Nei tumori dei seni paranasali (cavità nasali, seno mascellare, etmoide) prevale il senso di ostruzione nasale, raffreddore persistente, frequenti epistassi. Talora, la malattia si manifesta con dolore, alterazione della sensibilità della cute del volto o paralisi (irregolarità al viso, strabismo, deviazione della lingua...), poiché la malattia può invadere i nervi, i muscoli o le cartilagini vicine. La sintomatologia associata al tumore delle ghiandole salivari è scarsa o assente, nelle fasi iniziali; quando la malattia è estesa, i sintomi possono essere rappresentati da una massa indolente alla palpazione situata a livello della mandibola, ma anche al di sotto di essa, oppure masse all'interno del cavo orale, paralisi di metà del volto o difficoltà ad aprire la bocca.

2.3 Diagnosi

In presenza dei sintomi o dei segni sopra indicati, il paziente viene sottoposto ad un iter di accertamenti che iniziano con la visita clinica dallo specialista.

Procedure diagnostiche e di stadiazione più comuni.

Visita clinica: può essere eseguita con l'esplorazione del cavo orale, o, nel caso di strutture non accessibili ad occhio nudo, con l'impiego di un fibroscopio ottico. La visita con il fibroscopio è una tecnica endoscopica poiché consiste nell'impiego di un tubicino flessibile, dotato di illuminazione propria all'estremità, che viene introdotto nelle fosse nasali

per permettere di esplorare tutto il distretto otorinolaringoiatrico non valutabile all'esterno. È utile soprattutto per lo studio della faringe, della laringe e dei seni paranasali. L'impiego del fibroscopio permette anche di eseguire direttamente la biopsia. La visita clinica, inoltre, deve includere anche la palpazione della lesione sospetta, per valutare il grado di infiltrazione della malattia. È necessario infine un'accurata esplorazione delle stazioni linfonodali tramite la palpazione del collo, poiché permette di valutare l'eventuale estensione di malattia ai linfonodi.

Biopsia: consiste nel prelevare un piccolo frammento di tessuto "sospetto" che verrà inviato in laboratorio per farlo analizzare al microscopio; è una procedura diagnostica indispensabile per fare diagnosi di tumore ed inoltre precisa l'istologia della malattia.

Endoscopia in narcosi: qualora la malattia non sia facilmente esplorabile o il paziente non sia facilmente visitabile a causa dei riflessi scatenati dalle manovre eseguite dal medico in bocca, il prelievo bioptico deve essere eseguito con il paziente addormentato. In questo modo, si può effettuare anche una valutazione accurata dell'estensione della malattia ed eventualmente individuare la presenza di un secondo tumore.

Agoaspirato: Si tratta di un prelievo di tessuto effettuato mediante un ago sottile. Può essere eseguito anche sotto guida ecografica.

Una volta diagnosticata la presenza del tumore e una volta accertata la natura dello stesso, il paziente viene sottoposto ad ulteriori accertamenti per verificare l'estensione della malattia; l'insieme di tali esami prende il nome di "stadiazione".

Essa si avvale di:

Ecografia: può essere utile per lo studio dei linfonodi del collo. È un esame semplice, innocuo e di rapida esecuzione. I suoi limiti sono costituiti dal fatto che non è possibile una differenziazione accurata tra l'ipertrofia reattiva (cioè, una semplice infiammazione) e l'invasione tumorale del linfonodo.

TC (Tomografia Computerizzata) o RM (Risonanza Magnetica): entrambe con mezzo di contrasto, rappresentano una procedura fondamentale poiché permettono di valutare l'estensione della malattia, fornendo informazioni dettagliate riguardo l'infiltrazione in profondità e i linfonodi del collo.

Radiografia del torace: è fondamentale per escludere la presenza di metastasi nel polmone o per escludere la contemporanea presenza di un tumore polmonare (il più frequente nella popolazione maschile, specie se fumatrice); inoltre è utile per la valutazione preoperatoria del paziente.

Esofagogastroscoopia: dovrebbe essere eseguita routinariamente nei tumori

dell'ipofaringe, per l'elevata incidenza di seconde neoplasie situate contemporaneamente a livello dell'esofago.

PET (Tomografia ad Emissione di Positroni): l'introduzione di un radionuclide (un liquido radioattivo zuccherato, di cui sono avidi le cellule tumorali) viene effettuata tramite una vena del braccio. Tale metodica è molto utile perché permette di indagare tutti gli organi a distanza, consentendo di identificare eventuali sedi di malattia; essa, inoltre, permette la ricerca di neoplasie in presenza di metastasi ai linfonodi del collo in cui non sia rilevabile il tumore primitivo.

Analisi molecolari: per il momento solo alcuni tumori del distretto cervicofacciale possono beneficiare di alcune specifiche analisi molecolari.

La stadiazione della malattia, quindi, è costituita dalla successione di visite ed esami che permettono di definire lo stadio del tumore, cioè le sue dimensioni, l'invasione dei tessuti circostanti e la presenza di metastasi a carico dei linfonodi del collo e degli organi a distanza. Essa è indispensabile per definire la terapia più adeguata, che può variare profondamente a seconda dello stadio di malattia. La stadiazione di malattia può essere sintetizzata con il sistema TNM, che descrive separatamente le 3 componenti della malattia tumorale:

- T, indica il tumore primitivo;

- N, indica i linfonodi regionali;
- M, indica le metastasi a distanza.

Ne consegue che il tumore primitivo avrà differenti gradi di estensione locale; lo stesso vale per l'invasione linfonodale; per le metastasi a distanza si definisce la loro presenza ed eventualmente la loro sede.

La cura dei tumori della testa e del collo è oggi sempre più un trattamento multidisciplinare, in cui il chirurgo, il radioterapista e l'oncologo medico collaborano strettamente. Questo vale principalmente per i tumori più avanzati. Di questo gruppo multidisciplinare fanno parte anche altre figure professionali come il nutrizionista, il riabilitatore (logopedista), il terapeuta del dolore, il dentista, lo psicologo e l'assistente sociale. Tali specialisti formano un gruppo di lavoro per decidere insieme la terapia o la combinazione di terapie giudicate più appropriate per il paziente, arrivando ad una decisione clinica multidisciplinare (risultato, cioè, del confronto di più specialisti). Il trattamento combinato, quando indicato, permette al paziente una migliore possibilità di cura ed una maggiore probabilità di guarigione.

Per il tumore testa-collo esistono diverse terapie, che possono essere impiegate singolarmente o insieme. La scelta della cura più appropriata dipende da diversi fattori:

- la sede in cui è situato il tumore;
- l'estensione del tumore;
- la rapidità con cui si è diffuso;
- le condizioni di salute generale;
- i risultati estetici e funzionali;
- la preferenza del paziente.

2.4 Chirurgia

La chirurgia è una delle forme di trattamento possibile solo quando questa può essere radicale, cioè quando il tumore, in genere insieme con i linfonodi del collo, può essere asportato in modo completo. Solo in queste condizioni la chirurgia offre garanzie di guarigione. La presenza di metastasi linfonodali, palesi o occulte, sono particolarmente frequenti e condizionano la prognosi, poiché riducono di oltre il 50% le probabilità di guarigione della neoplasia, soprattutto quando coesiste la rottura della capsula linfonodale con l'invasione dei tessuti del collo attorno ai linfonodi. In queste circostanze al trattamento chirurgico dovrà seguire un trattamento combinato chemioradiante postoperatorio. Esistono oggi possibilità di evitare l'intervento chirurgico nel caso del tumore avanzato della laringe, dell'ipofaringe e dell'orofaringe con trattamenti combinati chemioradianti la cui applicazione consente probabilità di guarigione del tutto simili a quelle della chirurgia.

2.5 Radioterapia

La radioterapia è un trattamento che ha lo scopo di distruggere le cellule tumorali utilizzando delle radiazioni ionizzanti. Le tecniche più moderne permettono di concentrare le radiazioni solo nella zona tumorale, cercando sempre più di non coinvolgere i tessuti sani circostanti, anche se anche essi vengono inevitabilmente irradiati. La radioterapia può essere erogata da una macchina esterna all'organismo (radioterapia a fasci esterni) o la sostanza radioattiva può essere immessa direttamente nella lesione per mezzo di tubicini di plastica (brachiterapia o interstiziale). La radioterapia può essere impiegata:

- nel caso di tumori di piccole dimensioni;
- in associazione alla chemioterapia, con l'intento di evitare interventi chirurgici mutilanti e preservare la funzionalità d'organo;
- nel post-operatorio, per migliorare i risultati della chirurgia, laddove permangono i dubbi sulla radicalità della malattia o laddove il rischio di ripresa della malattia sia significativamente elevato (a causa di margini chirurgici infiltrati, della presenza di malattia microscopica residua, di tumori in fase avanzata o dell'interessamento cospicuo dei linfonodi del collo o della rottura della capsula linfonodale). Le dosi necessarie per il controllo della malattia microscopica variano con il tipo e la sede del tumore, ma sono inferiori a quelle necessarie per il controllo della malattia macroscopica; in associazione alla terapia a bersaglio molecolare:

l'associazione con Cetuximab (un anticorpo monoclonale) alla radioterapia è di recente introduzione; gli studi clinici dimostrano che utilizzando tale associazione il controllo loco regionale della malattia e la sopravvivenza dei pazienti sono migliori rispetto alla sola radioterapia; in pazienti con malattia localmente estesa, con finalità palliativa, non suscettibile ad intervento chirurgico;

- nel controllo delle lesioni metastatiche sintomatiche.

La tecnica utilizzata per il trattamento radioterapico dei tumori del distretto cervicofacciale è attualmente in una fase particolarmente dinamica e in continua evoluzione.

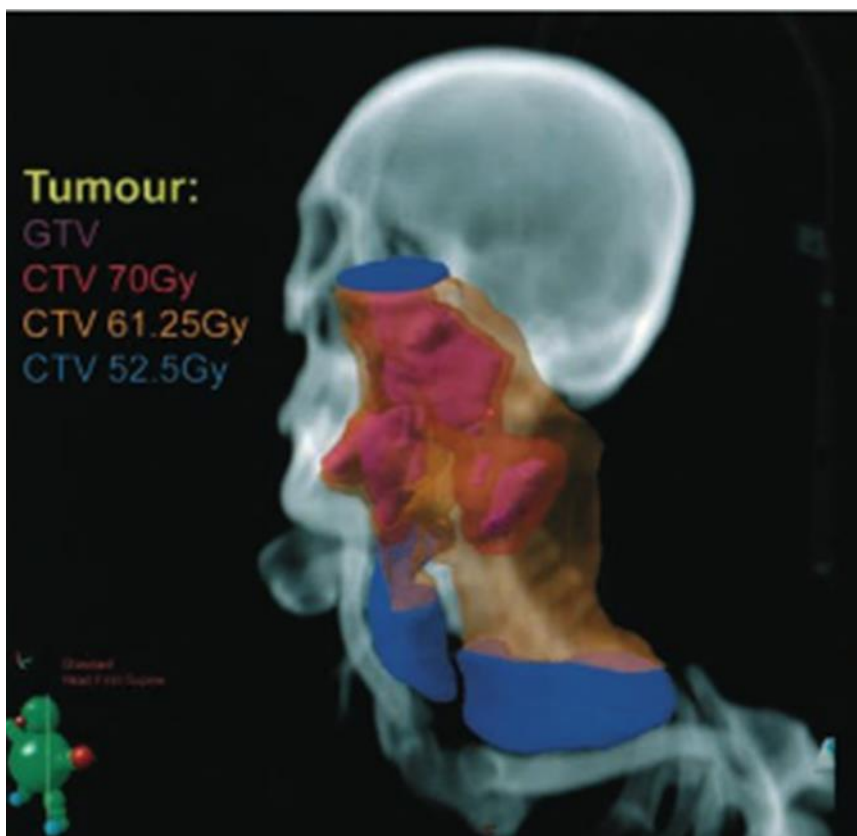


Figura 5. Volume di trattamento nel carcinoma del distretto testa-collo.



Figura 6. Organi a Rischio di danno radioindotto in seguito a trattamento radioterapico dei tumori testa collo).

2.6 Effetti collaterali della radioterapia

Gli effetti collaterali indotti dalla radioterapia possono essere distinti in acuti quindi immediati o a distanza quindi tardivi. L'entità di tutti gli effetti collaterali è sempre direttamente proporzionale all'estensione del volume di trattamento radioterapico, cioè agli organi e ai tessuti coinvolti dalla radioterapia.

a) Effetti collaterali acuti: Le tossicità acute dipendono dalle sedi tumorali irradiate e dalle tecniche di irradiazione scelte; esse compaiono generalmente dopo 2-3 settimane dall'avvio del trattamento.

- Mucosite: è un'inflammazione della bocca e della faringe, causata da un danno dei tessuti indotto dalla radioterapia: questo danno si manifesta con ulcerazioni ed erosioni con possibile sovrainfezione da parte di microorganismi (spesso funghi). In un secondo momento, segue la fase di riparazione completa del danno alla mucosa. Il tempo necessario per il ripristino dell'integrità dei tessuti dipende da determinati fattori di rischio, quali una cattiva igiene orale, la presenza di protesi dentarie inadeguate o di denti scheggiati, lo stato nutrizionale, la sede della neoplasia, il fumo e l'assunzione di alcol. Un'accurata igiene della bocca dopo i pasti e la bonifica della bocca prima dell'avvio della radioterapia, riduce il rischio di mucosite. Il rischio di mucosite, inoltre, è evidente nei pazienti che ricevono dosi cumulative di radioterapia maggiori di 50 Gy o che sono sottoposti ad un concomitante trattamento chemioterapico. I pazienti che sviluppano una mucosite severa sono anche a maggior rischio di ospedalizzazione. È poi severamente consigliata l'abolizione del fumo di sigaretta, poiché il fumo causa a sua volta irritazione delle mucose rendendo persino necessaria l'interruzione delle cure.

- Alterazioni cutanee: l'arrossamento cutaneo e l'iperpigmentazione (cioè, una pelle scura nella zona d'irradiazione) si manifestano acutamente con la desquamazione ed escoriazioni della cute. Le alterazioni cutanee sono destinate a risolversi completamente con il tempo.

- Disfagia: il termine “disfagia” indica la difficoltà ad alimentarsi per un difetto di deglutizione. La presenza di uno stato di malnutrizione, antecedente l’avvio delle cure, causato dalla malattia, o indotto dalla radioterapia, pregiudica l’efficacia della terapia antitumorale in atto. Per questo motivo, onde ottenere il massimo risultato possibile dai trattamenti in atto, il paziente deve essere adeguatamente nutrito. Pertanto, poiché è difficile risolvere il problema con semplici consigli dietetici, in caso di riconoscimento di uno stato di deperimento nutrizionale, il paziente deve essere aiutato con la nutrizione enterale che consente l’apporto di nutrienti simulando l’alimentazione per bocca; si avvale di specifici dispositivi, quali il sondino nasogastrico, la sonda gastrostomica percutanea e quella digiunale.
- Dolore: la deglutizione in presenza di mucosite è fonte di dolore per il paziente.
- Edema: il rigonfiamento di alcune strutture della laringe che può essere reversibile con l’impiego di cortisone o così imponente e refrattario alle cure mediche da rendere necessaria la tracheotomia.
- Xerostomia: la secchezza della bocca è un fenomeno frequente ed è attribuibile al danno indotto dalla radioterapia sulle ghiandole salivari; il paziente avverte una riduzione significativa della salivazione, con conseguente scarsa gratificazione gustativa all’introduzione degli alimenti, fino alla perdita permanente del gusto; l’accurata igiene della bocca e la rimozione della patina depositata permettono un miglioramento temporaneo del sintomo.

b) Effetti collaterali tardivi:

- Danni dentari: soprattutto se prima dell'avvio del trattamento radiante non si sia proceduto ad una adeguata bonifica dentaria.
- Fibrosi sottocutanea e telangectasia: la zona irradiata può diventare dura e grinzosa, fino ad assumere una colorazione grigiastra, con la comparsa in superficie di piccoli capillari, conseguenza di una dilatazione permanente dei vasi sanguigni. Talora i tessuti irradiati perdono a tal punto la loro elasticità che il paziente può accusare severe difficoltà a deglutire e, in qualche raro caso, persino a respirare, rendendo necessaria la tracheotomia.
- Necrosi da radiazione dei tessuti molli e dell'osso: in qualche raro caso la fibrosi indotta da radioterapia può sfociare in una necrosi, cioè la morte, del tessuto. In questi casi è possibile dover ricorrere ad un trattamento chirurgico.
- Ototossicità (riduzione dell'udito): questo è un rischio solo in alcuni casi cioè in caso di tumore rinofaringeo, soprattutto ove al trattamento radiante venga combinato quello con cisplatino.
- Ipotiroidismo: qualora nel campo di irradiazione vi sia ricompresa la tiroide è possibile che col tempo si sviluppi la carenza di ormoni tiroidei.

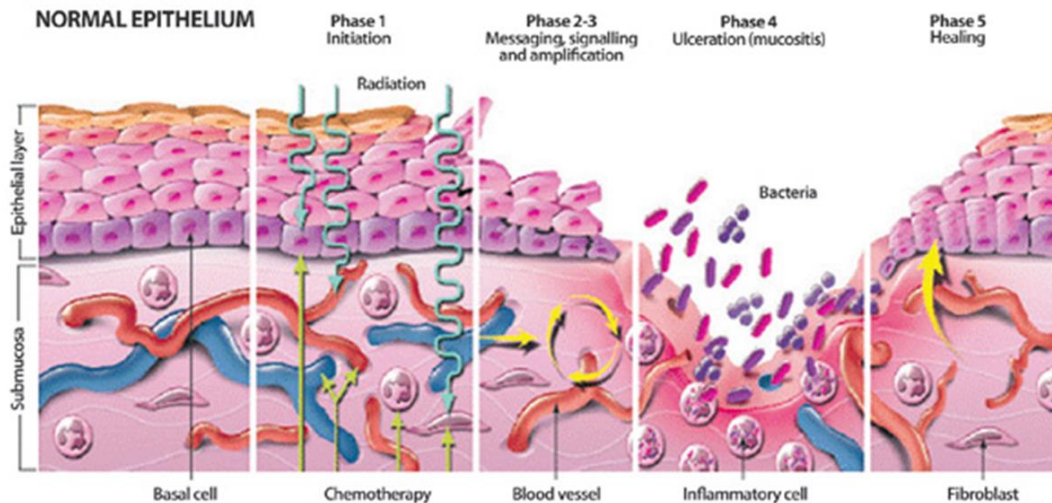


Figura 7. Effetti delle radiazioni ionizzanti sui tessuti normali

2.7 Chemioterapia

La chemioterapia è un trattamento sistemico perché il farmaco entra nella circolazione sanguigna e si diffonde nell'organismo, raggiungendo tutte le cellule tumorali presenti.

La chemioterapia può essere utilizzata:

Come neoadiuvante, definita anche di induzione, nel senso che precede la chirurgia o la radioterapia, allo scopo di ridurre le dimensioni del tumore, per poi asportarlo o irradiarlo più agevolmente.

In associazione alla radioterapia. La somministrazione simultanea di chemioterapici e della radioterapia sfrutta le proprietà radiosensibilizzanti di molti farmaci, soprattutto del cisplatino. Ne deriva che il trattamento chemioradioterapico migliora la sopravvivenza globale rispetto alla sola radioterapia.

Come adiuvante, cioè nel postoperatorio, per distruggere eventuali cellule residue e per migliorare la sopravvivenza dopo la chirurgia, in pazienti operati con intenti di radicalità, ma a rischio di ripresa di malattia; tale chemioterapia si associa alla radioterapia.

In fase palliativa, per ridurre i sintomi legati ad una malattia localmente estesa o alla presenza di metastasi, cioè in caso di malattia non più curabile con chirurgia e/o radioterapia.

I chemioterapici più frequentemente utilizzati e di sicura efficacia sono i derivati del Platino (Cisplatino e Carboplatino) e il 5-Fluorouracile, che possono essere usati da soli o in associazione. Ad essi, si affiancano altri chemioterapici come i taxani. I farmaci possono essere utilizzati da soli o in associazione; in caso di trattamento in fase palliativa le combinazioni di più farmaci offrono maggiori percentuali di risposta rispetto all'uso dei singoli agenti.

2.8 Effetti collaterali della chemioterapia

La chemioterapia può produrre un'ampia varietà di effetti tossici sulle cellule normali. Gli effetti collaterali più comuni sono:

a) Sintomi costituzionali.

- L'assenza di energia e l'affaticabilità nello svolgere le normali azioni quotidiane.

b) Tossicità dermatologica.

- Alopecia: consiste nella perdita completa dei peli e dei capelli, che comunque ricrescono dopo la fine della cura. Per quei regimi chemioterapici che non determinano la perdita completa dei capelli si può verificare comunque una spiccata diradazione ed un evidente assottigliamento dei capelli.
- Alterazioni delle unghie: le unghie possono diventare fragili, scagliarsi o solcarsi; esse riprenderanno il loro aspetto normale qualche mese dopo la conclusione del trattamento.
- Flebite: è una reazione irritante locale, dovuta allo stravasamento di chemioterapici (definiti “vescicanti”), che fuoriescono durante l’infusione, causando un danno dei tessuti, fino alla necrosi. L’inflammazione della vena durante la somministrazione del farmaco si può manifestare con bruciore, dolore, eritema, fino alla formazione di un cordone arrossato e dolente lungo il decorso della vena stessa.
- Eritrodistesia palmo-plantare: è una sindrome rara, caratterizzata da aree arrossate, molto dolenti, di desquamazione cutanea, localizzate al palmo delle mani e alle piante dei piedi; essa è dovuta alla carenza congenita di un enzima necessario per l’eliminazione del chemioterapico.

c) Tossicità gastrointestinale

- L'alterazione del gusto: la sensazione di sapore metallico in bocca, l'avversione verso particolari cibi o bevande, la perdita dell'appetito sono situazioni piuttosto comuni in corso di chemioterapia.
- Nausea e/o vomito: è una reazione spontanea messa in atto dall'organismo. Esistono 3 tipi diversi di nausea e vomito indotti dalla chemioterapia: 1. anticipatori: i sintomi subentrano prima di sottoporsi alla chemioterapia, generalmente scatenati dalla vista e dell'odore del luogo in cui avviene la somministrazione di chemioterapia; 2. acuti: i sintomi compaiono nelle prime 24 ore; 3. tardivi: i sintomi si manifestano da 2 a 5 giorni dalla fine del trattamento. Il rischio del vomito dipende dal tipo di chemioterapia e da alcuni fattori individuali: i pazienti sotto i 50 anni e le donne, soprattutto se hanno sofferto di nausea durante la gravidanza o se soffrono di mal d'auto, sono particolarmente esposte al vomito; gli alcolisti, invece, soffrono meno la nausea e il vomito indotti da chemioterapia. Per tali disturbi, esiste un'ampia gamma di antiemetici, cioè di farmaci antivomito, che verranno consigliati dal medico di riferimento.
- Mucosite orale (o stomatite): la mucosa che riveste la bocca può andare incontro ad un'inflammatione severa, che si manifesta con il rossore della bocca, la presenza di afte o la comparsa di chiazze biancastre (tipo "mughetto" dei bambini). Quando insorge, l'alimentazione diventa molto dolorosa; ecco perché si consiglia l'introduzione di un'alimentazione semiliquida, preferibilmente fredda, per consentire il supporto nutrizionale senza troppo dolore. Quando, poi, l'accurata igiene del cavo orale, gli sciacqui con collutori e anestetici locali non sono sufficienti, si rende

necessario avviare una terapia antidolorifica e, talvolta, anche antibiotica. La stomatite è comunque destinata a risolversi, una volta smaltita la tossicità indotta dalla chemioterapia stessa.

- Diarrea: il tratto gastrointestinale è formato da tessuti a rapida proliferazione; pertanto, è particolarmente sensibile all'azione dei chemioterapici, soprattutto se vengono impiegati farmaci specifici per il ciclo cellulare. Il trattamento di scelta è farmacologico, tuttavia, in caso di persistenza della diarrea, si rendono necessari un'adeguata idratazione e un giusto apporto calorico per ridurre il rischio di disidratazione, scompenso elettrolitico e perdita di peso.

- Stitichezza: il raro e difficoltoso passaggio di feci, dure e secche, può portare a dolore addominale e a senso di peso, tensione e malessere addominale. Sono molteplici i fattori che possono predisporre alla stitichezza: l'età avanzata, la ridotta attività fisica, l'uso di diuretici, gli antidepressivi e gli antidolorifici tipo oppioidi, il ridotto apporto di cibo per bocca, l'abuso di lassativi, l'impiego prolungato di farmaci antivomito e certi chemioterapici.

d) **Soppressione midollare**

Il midollo osseo è la fabbrica di produzione dei globuli bianchi, dei globuli rossi e delle piastrine. La chemioterapia determina un danno selettivo di queste linee cellulari. La diminuzione transitoria delle stesse si evidenzia da un semplice prelievo ematico. Ecco perché il paziente è tenuto a sottoporsi

periodicamente al controllo degli esami del sangue durante il trattamento, per poter intervenire in modo tempestivo in caso di necessità. Queste sono le situazioni ematologiche che si possono verificare:

- Anemia: la riduzione dell'emoglobina può essere asintomatica ed evidenziata unicamente agli esami ematici, oppure può essere sintomatica. In quest'ultimo caso, la stanchezza estrema e la ridotta tolleranza allo sforzo deteriorano in modo significativo la qualità di vita del paziente. Nella maggior parte dei casi, l'anemia regredisce spontaneamente; ma, in una piccola percentuale di casi, si rende necessario la trasfusione di sangue o l'impiego di eritropoietina.

- Leucopenia: un deficit severo della produzione dei globuli bianchi predispone il paziente a infezioni, soprattutto del tratto respiratorio. Le infezioni sono molto frequenti soprattutto nel corso di trattamenti chemioterapici effettuati in concomitanza alla radioterapia. Esse hanno cause e prognosi diverse a seconda della gravità e delle condizioni generali:

- l'interruzione della barriera mucosa indotta dalla radioterapia lacera la normale barriera fisica e chimica protettiva tra l'organismo e l'ambiente esterno; questo favorisce il sovrapporsi di infezioni.
- le alterazioni deglutitorie che si apprezzano durante il trattamento radiante o secondarie ad un pregresso intervento chirurgico e/o radiante possono determinare inalazione di cibo a livello delle vie respiratorie con conseguente "polmonite da inalazione" o "ab ingestis".
- l'uso frequente di cortisone per antagonizzare la nausea, per stimolare l'appetito o per ridurre il gonfiore della bocca porta ad una riduzione delle funzioni immunitarie, con

conseguente aumentato rischio infettivo. • l'uso di cateteri venosi centrali può portare ad un'infezione locale o sistemica, cioè generalizzata a tutto l'organismo.

- Piastrinopenia: la riduzione delle piastrine deve essere attentamente monitorata nel tempo; nel caso di deficit importanti, si possono apprezzare sanguinamenti di entità lieve (come a livello delle gengive durante l'igiene orale o dal naso in modo spontaneo) e di entità severa, fino a mettere a rischio di vita del paziente stesso per l'insorgenza di emorragie massive. In questi casi si rendono necessari l'ospedalizzazione e la trasfusione di piastrine.

e) **Tossicità neurologica**

Il paziente può lamentare una sensazione di puntura di spilli in corrispondenza delle punte delle mani e dei piedi, accompagnata da formicolii, perdita della sensibilità o ipersensibilità. I sintomi possono essere lievi e transitori oppure gravi e responsabili di disfunzioni significative. Il grado di tossicità è in funzione della dose, dei cicli e del tipo di chemioterapia somministrata. Nei casi più gravi, le alterazioni della sensibilità possono compromettere in modo significativo le capacità funzionali del paziente e il suo benessere. Quando i sintomi si manifestano, è opportuno sospendere il trattamento; ma i sintomi possono manifestarsi e permanere anche per mesi o per anni dopo le cure.

f) **Tossicità renale e vescicale**

I principali fattori di rischio per lo sviluppo della tossicità renale sono rappresentati dall'impiego di certi chemioterapici (soprattutto i platinanti), dall'età, dallo stato nutrizionale, da disfunzioni renali preesistenti. Cicli ripetuti di chemioterapia, soprattutto con farmaci nefrotossici, possono causare alterazioni della funzionalità renale, che si evidenziano dagli esami del sangue.

g) **Tossicità gonadica**

I trattamenti chemioterapici possono indurre disfunzione dell'apparato genitale: nell'uomo, tale disfunzione si può manifestare con una riduzione degli spermatozoi; nella donna, con menopausa anticipata.

3 . LA FARMACOGENETICA

I farmaci sono uno dei fattori che hanno migliorato l'aspettativa di vita e la qualità della vita dell'uomo nel corso della storia.

Negli USA, ad esempio, la spesa sanitaria rispetto al PIL era nel 1950 poco superiore al 5%, mentre all'inizio del terzo millennio la percentuale della spesa sanitaria è intorno al 16%. Uno dei fattori alla base dell'incremento della spesa sanitaria è il progresso tecnologico: procedure, medicinali e strumenti sempre più avanzati e più costosi sono utilizzati per la tutela della salute. Sempre nello stesso periodo negli USA l'aspettativa di vita alla nascita è passata da circa 68 anni a circa 77 anni (2).

La farmacogenetica, in generale, studia l'impatto di specifiche varianti del DNA nella risposta a determinati trattamenti farmacologici.

La personalizzazione della terapia si può fare in base alle caratteristiche genetiche del tumore oppure in base alle caratteristiche genetiche del paziente. Il presupposto comune a questi 2 diversi modi di personalizzare la terapia è che in un certo senso definisce la farmacogenetica è la variabilità genetica nella risposta alla terapia alla stessa dose che riguarda in un caso il tumore e in un caso il paziente e che è determinata da variabili genetiche come le mutazioni somatiche in un caso e i polimorfismi e/o mutazioni germinali nell'altro caso (al netto di fattori fisiologici, patologici e ambientali).

In ambito oncologico il dosaggio del farmaco basato sulla sola valutazione della superficie corporea può determinare in alcuni pazienti una sovrastima del suo effetto terapeutico o una sottostima del suo effetto collaterale e quindi non permette di definire la massima dose di farmaco antitumorale tollerata dai pazienti

Gli effetti avversi ai farmaci che è un problema drammatico tanto che nei paesi occidentali le ADR A farmaci correttamente prescritti e somministrati quarta causa di morte dopo malattie cardiovascolari, tumori e ictus (3). I farmaci infatti mostrano 2 facce della stessa medaglia: l'efficacia e gli effetti collaterali.

Alcuni hanno un range terapeutico talmente ampio che la dose da somministrare non è così importante.

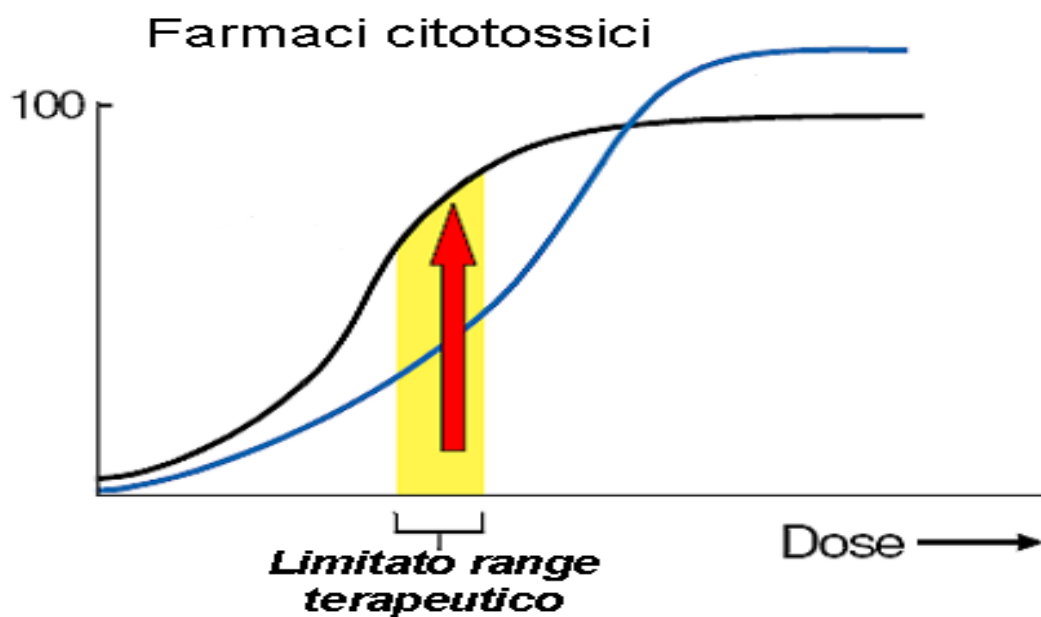


Figura 8. Curva dose-effetto. In blu l'effetto collaterale, in nero l'effetto terapeutico.

Altri invece, come i farmaci anticancro, hanno un ristretto range terapeutico, perciò è importante stabilire la dose giusta, anche perché da un certo punto in poi la curva della tossicità supera quella dell'efficacia. Quando un medico somministra un farmaco per una determinata patologia deve tener conto sia dell'efficacia sia degli eventuali effetti collaterali. Però non tutte le persone rispondono in maniera simile al trattamento con un farmaco; questa differenza è data da interazioni complesse fra componenti fisiologiche, ambientali e fattori genetici individuali. Mentre le prime (stato di salute, dieta, etc.) possono cambiare, la componente genetica è immutata. La variabilità nella risposta al trattamento farmacologico fra paziente e paziente costituisce da sempre uno dei problemi più rilevanti nella pratica clinica. Le risposte individuali ai farmaci, infatti, variano molto e si possono osservare in alcuni pazienti rispetto ad altri effetti terapeutici ridotti o assenti oppure reazioni avverse, nonostante sia stato somministrato lo stesso farmaco alla stessa posologia.

L'obiettivo primario della farmacogenetica è quello di identificare i fattori genetici che influenzano la risposta ai farmaci e sviluppare test genetici predittivi, riducendo così gli effetti collaterali e aumentando i benefici. Le reazioni avverse ai farmaci rappresentano un problema clinico ed economico importante; uno studio prospettico condotto nel Regno Unito e pubblicato sulla rivista BMJ nel 2004, ha dimostrato che circa il 6,5% dei ricoveri ospedalieri è da imputare a questi fenomeni (1).

La farmacogenetica studia le variazioni inter-individuali nella sequenza del DNA in relazione alla risposta ai farmaci. Quindi l'obiettivo della ricerca

in questo campo è trovare “il farmaco giusto per ogni paziente”. I test di farmacogenetica mettono il medico nelle condizioni di sapere a priori se un particolare medicinale sarà meglio tollerato dal paziente.

3.1 Farmacogenetica in oncologia

Il problema della variabilità individuale della risposta ai farmaci è particolarmente importante nella terapia dei tumori in cui vengono impiegati farmaci con un indice terapeutico molto ristretto, con variazione minima fra la dose efficace e quella tossica. Le terapie citotossiche convenzionali, come la chemioterapia e la radioterapia, sono efficaci modalità di trattamento ma hanno poca specificità per il tumore rispetto ai tessuti normali provocando così un danno alle cellule sane. Un'alterazione anche minima del metabolismo di un chemioterapico dovuta a variazioni genetiche può dare cambiamenti anche importanti nell'efficacia o nella tossicità. L'obiettivo della farmacogenetica applicata all'oncologia è, di individuare per ciascun paziente e sulla base delle sue caratteristiche genetiche, la massima dose tollerabile in maniera tale da ottimizzare l'indice terapeutico. In definitiva, l'obiettivo della farmacogenetica è quello di migliorare la prognosi, partendo dall'ipotesi che per quanto riguarda le terapie citotossiche tradizionali, l'identificazione prima del trattamento dei pazienti a rischio tossicità potrebbe portare ad un aumento della TCP (tumor control probability) e degli effetti collaterali, mentre per quanto riguarda i farmaci biologici, l'identificazione prima del trattamento dei

pazienti a rischio inefficacia possa portare ad un aumento della TCP e degli effetti collaterali.

In ultima analisi, la farmacogenetica è lo studio di come varianti del DNA possano influenzare la risposta ai farmaci e di come la conoscenza di tale variabilità genetica possa essere utilizzata ai fini della personalizzazione della terapia. Si differenzia quindi dalla quasi sinonima farmacogenomica che corrisponde invece allo studio dell'identificazione di differenze genetiche utili per lo sviluppo di nuovi farmaci.

Che la risposta dell'organismo umano ai farmaci abbia una base genetica è un fatto noto oramai da tempo. Distinguiamo quindi 2 fasi storiche fondamentali: l'era pre-genomica, vale a dire prima del progetto genoma umano e dei suoi sviluppi, in cui gli unici dati che dimostravano il concetto di variabilità biologica erano quelli provenienti dagli studi sui gemelli. Secondo uno studio condotto nel 1968, si mette in evidenza come i tempi di dimezzamento dei parametri farmacocinetici dell'antipirina sono molto più concordanti nei gemelli monozigoti che nei dizigotici (4); in seguito agli sviluppi del progetto genoma umano e di tecnologie come ad esempio il Pyrosequencing, l'High Resolution Melt e la Next Generation Sequencing, lo studio della variabilità biologica ha subito un grosso impulso che ha portato appunto alla nascita della farmacogenetica.

Circa la metà di tutti i pazienti oncologici ricevono un qualche tipo di radioterapia, la quale è un efficace modalità di trattamento delle neoplasie, ma lo sviluppo di reazioni avverse da parte del tessuto normale presente nel campo di irradiazione limita le potenzialità di questa modalità di

trattamento (dovuto alla bassa selettività per le cellule tumorali). Un gray di radiazioni ionizzanti a livello di DNA produce circa 1000 rotture a livello di basi azotate e di rotture singole e circa 40 rotture doppie (5). In effetti se torniamo alla figura 8 e confrontiamo le curve dose-risposta di un farmaco citotossico rispetto a un comune antibiotico come la penicillina, esso mostra un assai ridotto intervallo terapeutico causato dalla bassa selettività dei farmaci antitumorali in quanto citotossici per tutte le cellule in duplicazione, sia tumorali che normali (epiteliali, midollari, bulbi piliferi) che fa sì che il livello di concentrazione tossico sia molto vicino a quello terapeutico.

In questo caso è evidente che la dose corretta si prescrive molto difficilmente e il paziente può assumere dosi che sono fuori dall'intervallo terapeutico. La variabilità nella risposta ad un farmaco è tanto maggiore quanto più è basso il range terapeutico del farmaco. L'indice terapeutico deve essere perciò ottimizzato perché attualmente possiamo avere 3 risultati (6):

- Highly. Pazienti che sviluppano reazioni avverse
- Normally. Pazienti che non sviluppano reazioni avverse alla radioterapia, ma anche che non traggono alcun beneficio dal trattamento con radioterapia.
- Highly-normally. Attualmente la situazione auspicabile, e cioè quella di efficacia senza reazioni avverse, è solo una delle 4 possibili situazioni cui il paziente sottoposto a terapia citotossica può andare

incontro e quindi è evidente che l'indice terapeutico deve essere ottimizzato.

3.1.1 - Polimorfismo genetico

Nel uomo si ritiene che la maggioranza dei geni contenga variazioni casuali della sequenza nucleotidica fra i diversi individui sviluppatesi nel corso dell'evoluzione. Quando tali variazioni si trovano a livello di una sequenza codificante o regolatoria possono portare all'inserimento di un aminoacido diverso nella proteina, quindi a conseguenti modificazioni della sua funzione e a variazioni del meccanismo di traduzione o trascrizione. Le variazioni della sequenza del DNA che hanno una frequenza di almeno l'1% nella popolazione sono dette polimorfismi. Tali polimorfismi, se localizzati all'interno di domini funzionali di un gene, possono dar luogo a enzimi con diversi livelli di attività metabolica o a recettori con diversa affinità per il farmaco, modificando così la risposta farmacologica dell'individuo. Circa il 90% di tutti i polimorfismi sono sostituzioni di un singolo nucleotide e sono dette SNPs (single nucleotide polymorphisms) (6).

La maggior parte di essi ha un modesto significato clinico, ma in seguito all'esposizione ad un determinato fattore ambientale, un farmaco (come ad esempio la radioterapia) alcuni possono indurre un migliore o peggiore adattamento ad esse e quindi essere molto importanti.

3.2 . Citotossicità da radiazioni

La risposta alla radioterapia nei tumori del distretto testa-collo è nella maggior parte dei casi un evento che si verifica a livello cellulare, addirittura potremmo dire nucleare, e che ruota attorno al meccanismo di riparazione del DNA. L'ipotesi è che in alcuni pazienti il sistema cellulare di riparazione del DNA sia particolarmente efficiente per cui la riparazione prevale sul meccanismo infiammatorio ed apoptotico (questi pazienti sono anche quelli in cui la radioterapia non è efficace perché anche il loro tumore ripara bene il suo DNA e quindi le cellule tumorali non muoiono), mentre in altri, a seguito di un'alterazione genetica come può essere quella provocata da uno SNPs, il sistema di riparazione del DNA è più debole (uno di questi tre tipi di molecole viene meno si può avere un incremento della radiosensibilità) portando la cellula all'attivazione dei check-points e all'apoptosi oppure generando una serie di segnali infiammatori che portano ad una reazione avversa e tossica per il paziente che può diventare inaccettabile. Ma le radiazioni ionizzanti eliminano le cellule non solo interagendo direttamente con il DNA, ma anche con le altre molecole portando alla produzione di specie reattive dell'ossigeno, quindi anche un'alterazione a questo livello può portare un sovraccarico di lavoro per il DNA repair che quindi funziona peggio. È chiaro che questo meccanismo secondo meccanismo è altrettanto importante. Il danno cellulare indotto dalle radiazioni è quindi casuale e aspecifico con effetti complessi sul DNA. L'efficacia della terapia dipende dal danno cellulare che va oltre la normale capacità di riparazione. I meccanismi di riparazione del tessuto normale sono più efficaci di

quelli del tumore, consentendo una differenziale citotossicità. Inoltre sono oggetto di studio alcuni polimorfismi su geni implicati in un modo o nell'altro nella riparazione dei danni causati da radiazioni che potrebbero aumentare o diminuire l'efficacia dei sistemi di riparazione del DNA. Perciò se nel tumore i meccanismi di riparazione sono meno efficienti la radioterapia sarà più efficace.

Allo stesso modo, la perdita di efficienza nei meccanismi cellulari di riparazione del DNA può portare ad un aumento dello sviluppo di tossicità a carico del tessuto normale presente nel campo di irradiazione.

Essenzialmente i danni provocati da radiazioni sono di due tipi:

- danni diretti al DNA, quindi rotture del singolo o del doppio filamento;
- danni alla cellula provocati dalla iper-produzione di ROS (specie reattive dell'ossigeno) e quindi da un aumento dello stress ossidativo che portano alla morte cellulare.

Le cellule hanno sviluppato due strategie per rispondere al danno del DNA, o andando in apoptosi e attivando meccanismi infiammatori determinati dalla produzione di citochine o tentando di riparare il danno.

L'identificazione prima del trattamento dei pazienti "normalmente radiosensibili" potrebbe far aumentare la dose di radiazioni e di conseguenza la TCP. Individuare altresì i pazienti a rischio tossicità potrebbe portare ad una diminuzione significativa degli effetti collaterali; è presumibile che le probabilità di controllo della malattia non vengano alterate dalla riduzione della dose dal momento che anche il tessuto tumorale potrebbe essere altrettanto radiosensibile in questi pazienti (5).

In uno studio pubblicato sulla rivista *Radiotherapy and Oncology* (7), a ciascuno dei 10000 pazienti in oggetto con tumore testa-collo era assegnato random un valore di tossicità, espressa come SF2, frazione di sopravvivenza di cellule clonogeniche dopo una dose di 2 Gy, secondo una distribuzione normale di possibili valori e in ciascun paziente la dose veniva aggiustata sulla base dei valori di SF2 utilizzando la curva dose-risposta. I risultati mostravano che le dosi erano aumentate per tutti i pazienti con una radiosensibilità sopra il quinto percentile della distribuzione SF2. La personalizzazione della dose porterebbe quindi ad aumento della tumor control probability (senza un contemporaneo aumento nella probabilità di sviluppare reazioni avverse) del 35% in questi pazienti, che è una percentuale significativa per un miglioramento della prognosi. Questo incoraggiante lavoro è il risultato solo di un modello teorico, induttivo, che non è stato mai verificato empiricamente.

3.2.1 Meccanismi di riparazione di danni diretti al DNA

In base al tipo di danno prodotto sul DNA la cellula attua diversi tipi di riparazione.

Quando la rottura è presente sul singolo filamento: principalmente la cellula utilizza meccanismi di riparazione per escissione che rimuovono il nucleotide sostituendolo con uno non danneggiato complementare al nucleotide presente sul filamento non danneggiato. Questi meccanismi sono essenzialmente tre:

1. BER (base excision repair);
2. NER (nucleotide excision repair);
3. MMR (mismatch repair).

Prendiamo in considerazione il primo meccanismo. Riparazione per escissione di base.

Esso ripara un danno su un singolo nucleotide, si tratta di un meccanismo enzimatico:

- attivazione di una DNA-glicosilasi che riconosce il la base alterata e rompe il legame N-glicosidico;
- una AP-endonucleasi rimuove la base lasciando il fosfato e il deossiribosio, che poi vengono eliminati da una liasi;
- aggiunta del nuovo nucleotide da parte di una DNA-polimerasi;
- definitiva incorporazione del nucleotide nel filamento grazie ad una ligasi.

3.2.2 XRCC1

XRCC1 è un gene che codifica per una proteina implicata nella riparazione delle rotture del singolo filamento, più precisamente nel meccanismo del base excision repair (8). È localizzato sul cromosoma 19.

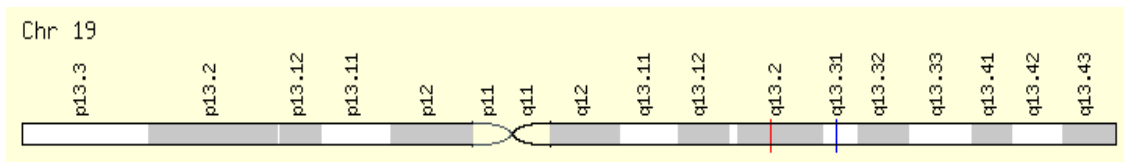


Figura 9. Localizzazione cromosomica del gene *XRCC1*

La rottura generalmente coinvolge un singolo nucleotide, causato da ossidazione, alchilazione, idrolisi, oppure deaminazione che sono i danni causati dai ROS; il meccanismo consiste in una vera e propria escissione operata da parte della DNA-glicosidasi che riconosce la base alterata e rompe il legame N-glicosidico, poi una AP-endonucleasi 1 (AP: sito apurinico) rompe il legame fosfodiesterico, lasciando il fosfato e il deossiribosio; (ancora, una liasi toglie fosfato e zucchero) così che una DNA-polimerasi legghi il nuovo nucleotide e la ligasi lo incorpori nel filamento. Il BER quindi può riparare la de-aminazione della Citosina in Uracile o la trasformazione della Guanina in 8-oxo-guanina, analogo dell'adenina.

XRCC1 è quindi reclutato al sito del danno al DNA e coordina l'intero processo, regolando lo scambio della glicosidasi con la DNA polimerasi, attivando la DNA polimerasi stessa e il processo di ligazione definiti. Un altro indice che rivela quanto una proteina sia importante in un processo è il numero di proteine con cui esse interagisce; *XRCC1* è la proteina del BER che riesce ad interagire col più alto numero di proteine del BER stesso (9).

Sono stati identificati diversi polimorfismi con potenziale ruolo biologico in *XRCC1*; Il polimorfismo sul codone 399, che determina una sostituzione di

una guanina con un un'adenina e quindi di un'arginina con glutammina, oltre ad essere molto frequente, è localizzato in un dominio centrale di XRCC1, il quale contiene un sito di legame per PARP (poliADP ribosio polimerasi durante il BER ha il compito di legare le estremità libere di DNA e di proteggerlo dalla degradazione) (10) ed è conservato in numerose proteine coinvolte nella riparazione del danno al DNA, nel meccanismo di ricombinazione e nel controllo del ciclo cellulare. Se PARP non funziona perché c'è una perdita di affinità con XRCC1, allora il BER invece che riparare, degrada il DNA, attivando meccanismi apoptotici e di attivazione di citochine proinfiammatorie. XRCC1 p.Arg399Gln aumenta la sensibilità ai mutageni. Dato per certo che questo polimorfismo determina un cambiamento nella sequenza aminoacidica e vista la positività dei test in vitro sull'attività della proteina, uno studio del 2003 (11) correla i vari genotipi di XRCC1 con il danno cromosomico (rotture, riarrangiamenti, delezioni, duplicazioni, inversioni) in vitro causato da clastogeni (nella fattispecie, bleomicina). È stato prelevato 1 ml di sangue da 524 controlli sani caucasici, messo in coltura, bloccate le cellule in metafase mitotica, fissate e colorate con Giemsa e contato il numero di rotture cromosomiche per cellula. I risultati di questo studio evidenziano l'associazione tra il fenotipo DNA repair e i 2 due polimorfismi in XRCC1 (il 194 nell'esone 6 e il 399 nell'esone 10). L'associazione era più evidente nella bleomicina rispetto al benzopirene e questo è biologicamente plausibile dato che si sa che il danno da bleomicina viene riparato dal BER, mentre il danno causato da idrocarburi policiclici aromatici viene riparato mediante un altro

meccanismo di riparazione che non è BER-mediato. Il ruolo di XRCC1 p.Arg399Gln nell'aumento del il rischio di danno al DNA è stato evidenziato anche da numerosi studi sullo scambio di materiale genetico tra cromatidi fratelli (12). Evitare la tossicità può essere importante per 2 motivi:

- evitare sofferenze al paziente
- subottimale riparazione del DNA a livello tumorale può portare ad un maggiore accumulo di mutazioni e di conseguenza renda lo stesso tumore più aggressivo;

In effetti, se nel tessuto sano, il deficit nella riparazione del DNA determina la tossicità, nel tessuto tumorale, anziché aumentare il potere citotossico degli stessi farmaci, potrebbe portare ad un maggiore accumulo di mutazioni e di conseguenza potrebbe rendere lo stesso tumore più aggressivo. In alcuni studi si è visto, ad esempio, che il genotipo 399 Gln/Gln è associato ad una più alta frequenza di mutazioni a livello di p53, il guardiano del genoma (13). Tale proteina p53 è fondamentale nel meccanismo dell'apoptosi, fenomeno indotto anche dagli addotti platino-DNA

3.2.3 Riparazione delle rotture su entrambi i filamenti del DNA

Benchè siano più infrequenti delle rotture a singolo filamento, il più dannoso effetto biologico esercitato dalle radiazioni ionizzanti sulla cellula, in termini di danno cromosomico e sopravvivenza cellulare, è rappresentato

dalle rotture della doppia elica del DNA, le quali, interessano dai 16 ai 50 locus di un genoma per ogni GRAY di radiazione assorbita da una cellula. Uno dei principali processi attraverso il quale la cellula ripara i DSB è il processo di ricombinazione omologa. Il macchinario enzimatico responsabile per questo processo è praticamente identico al macchinario responsabile del crossing-over nelle cellule germinali durante la meiosi. In questo caso la riparazione non può essere effettuata utilizzando l'altro filamento come stampo di correzione poiché anch'esso presenta la rottura e quindi viene effettuato dal cromosoma omologo che quindi è lo stampo per la riparazione della rottura. Il DSB (double strand breaks) è quindi un danno al DNA particolarmente dannoso per le cellule, i meccanismi di riparazione sono due:

- 1- Non-homologous end-joining (saldatura delle estremità non omologhe);
- 2- Riparazione per ricombinazione omologa.

RAD51 e uno dei suoi paraloghi XRCC3 sono una famiglia di recombinasi che hanno un ruolo centrale nel coordinare l'intero processo, in particolare l'invasione del filamento stampo sul DNA interessato dalla double break.

.

3.2.4 XRCC3

Il gene *XRCC3* si trova sul braccio lungo del cromosoma 14 nella regione 32.2.

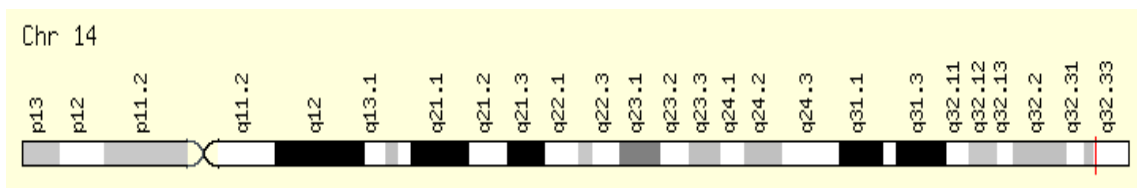


Figura 10. Localizzazione cromosomica del gene XRCC3.

La proteina codificata è implicata nella ricombinazione omologa, un processo fondamentale nelle cellule capace di mantenere la stabilità dei cromosomi e coinvolto nella riparazione delle rotture a carico del doppio filamento (14). Sul polimorfismo XRCC3 thr241met si sa abbastanza poco; è ovviamente un cambiamento non conservativo, ma non risiede nei domini di legame con l'ATP, che sono gli unici domini funzionali identificati nella proteina fino ad ora. Addirittura non esiste gene ortologo nel topo. L'impatto di tale polimorfismo sul fenotipo è stato studiato in 80 soggetti sani (15). L'allele di XRCC3 241 met è associato ad un incremento significativo di delezioni cromosomiche in linfociti estratti da sangue esposti a raggi x ($p < 0.05$). La delezione cromosomica è specifica per una riparazione anormale del DNA danneggiato da raggi x. La frequenza di cellule con la variante non è più significativa rispetto a quelle con il genotipo wild-type. D'altra parte la variante genotipica non ha effetti sulla riparazione del DNA danneggiato da luce ultravioletta. Questi risultati suggeriscono che XRCC3 241 met allele potrebbe essere coinvolto nella riparazione delle rotture del doppio filamento ma non nella riparazione dell'escissione di un nucleotide.

Il ruolo di questo SNPs XRCCC3 c.C722T p.Thr241Met era stato analizzato anche in un uno studio effettuato su 308 controlli sani in cui si osservava un aumento significativo del numero di addotti al DNA nei portatori della variante a prescindere dallo smoking status (cioè sia nei non fumatori, che negli ex fumatori, che nei fumatori in corso). (12, 16).

3.2.5 *RAD51*

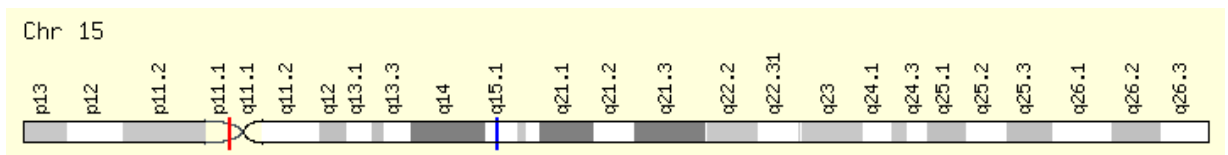


Figura 11. Localizzazione cromosomica del gene *RAD51*.

La proteina codificata da questo gene è un membro della famiglia di *RAD51* implicata nella riparazione delle rotture sul doppio filamento di DNA, più precisamente nel processo di ricombinazione omologa (17). SNPs su geni implicati nella riparazione dei danni al DNA potrebbero interferire con la loro funzione e perciò sono i candidati ideali per capire se ci può essere un'associazione fra la componente genetica e le reazioni tossiche acute sui pazienti trattati con radioterapia (18). Non ci sono varianti nella coding region di *RAD51*, però sono stati individuati 2 SNPs nella regione al 5'UTR, di cui il c.-3392 G>T pare non abbia alcun effetto. Per il polimorfismo *RAD51* c.-3429 G>C si è creato grande interesse dal momento che interagisce coi prodotti genici di *BRCA1* e *BRCA2*, 2 ormai

noti geni di suscettibilità del carcinoma mammario e ovarico. In particolare questa meta-analisi in cui sono stati poolate 8512 portatrici di mutazioni a carico dei geni BRCA1 e BRCA2 mostra che il genotipo CC di RAD51 in queste donne determina un incremento della probabilità di sviluppare carcinoma della mammella (19). Il meccanismo molecolare mediante il quale questo SNPs determina un incrementato rischio di carcinoma mammario non è tuttavia del tutto chiaro. Sono stati quantificati mediante real time PCR gli mRNA di RAD51 in linee cellulari linfoblastoidi isolate dai tre diversi genotipi e sono state individuate 2 isoforme di trascritto di RAD51, vale a dire che alcuni mRNA hanno un 5'UTR più corto del 5'UTR del trascritto full-length e la variante RAD51 c.-3429 G>C è localizzata proprio in corrispondenza del sito di splicing alternativo presente al 5'UTR. Gli esperimenti erano eseguiti da 2 laboratori che utilizzavano geni housekeeping diversi per la normalizzazione dei dati. Il risultato mostrava che per quanto riguarda l'isoforma 1 non c'erano differenze di espressione tra i 3 genotipi, ma quando si considera la quantità di trascritto dell'isoforma 2, questa era particolarmente bassa nei genotipi CC rispetto ai genotipi GC e GG, con una risultati veramente molto simili tra i 2 laboratori. Le 2 isoforme sono state individuate anche in altre linee cellulari, comprese quelle di carcinoma mammario.

Un'altra scoperta molto interessante è che l'isoforma 2 ha un'elevata efficienza di traduzione. Infatti quei 104 nt che vengono a mancare, hanno un particolarmente elevato contenuto in GC (77%) che sono responsabili

della formazione di strutture secondarie (anse, stem-loop) che inibiscono il legame alla RNA polimerasi.

Quindi l'effetto della variante è solo a carico dell'isoforma 2, ma essendo questa isoforma molto più tradotta della prima, l'effetto complessivo è quello di un forte decremento dell'espressione della proteina RAD51. Dal punto vista biochimico questa alterazione potrebbe ricadere nel cosiddetto gruppo di varianti nel promotore che rimuovono o alterano siti di legame per fattori di trascrizione avendo effetto sulla quantità del prodotto proteico, e cioè una maggiore o minore efficienza di trascrizione.

3.2.6 Sistemi di protezione contro i ROS

Le cellule del nostro organismo possiedono un efficiente e complesso sistema di difesa nei confronti dei ROS a cui prendono parte componenti sia di origine esogena che endogena, ed entrambi concorrono alla protezione del danno.

3.2.7 *GSTP-1*

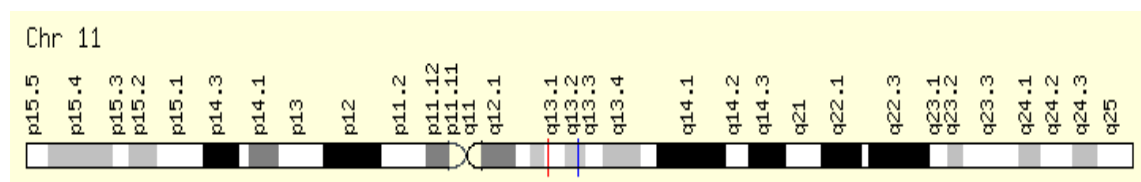


Figura 12. Localizzazione cromosomica del gene *GSTP-1*.

La famiglia di enzimi dimerici glutatione S-tranferasi ha un ruolo cruciale nella detossificazione di un grande numero di composti tossici, tra i quali vari agenti chemioterapici e in particolare nel sistema di protezione dallo stress ossidativo. Essi catalizzano la reazione di coniugazione di molti prodotti del metabolismo cellulare (inattivazione) (es. radicali liberi) con glutatione. Precisamente, la reazione tra GSH ed elettrofilo porta alla formazione di coniugati fortemente idrofilici, generalmente privi di significativa attività biologica, escreti rapidamente dall'organismo. Tali enzimi sono codificati da geni polimorfici comprendente 5 classi: *alpha*, *Pi*, *Mi*, *Theta* e *Zeta* (20). Tra questi, l'enzima codificato dal gene *GSTP1* sembra quello maggiormente implicato nella detossificazione di chemioterapici derivati dal platino.

E' noto oramai che la deplezione del GSH è uno dei meccanismi con cui si esplica la tossicità di alcuni farmaci come ad esempio il paracetamolo. Oltre al ruolo fisiologico di detossificazione da xenobiotici tossici, è stato dimostrato attraverso studi di transfezione e di farmacocinetica che molti agenti chemioterapici (come melfalan, ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina ed altri) possono essere substrato del *GSTP1*.

Il glutatione è uno dei più forti antiossidanti presenti nel nostro organismo.

Le GST costituiscono fino al 10% delle proteine cellulari e le *GSTP1* sono le isoforme di GST più abbondanti espresse nella cavità orale e nella faringe perché sono coinvolte nella detossificazione dei carcinogeni derivanti dal tabacco. La concentrazione di glutatione nel fegato è elevatissima: 10 mM (21). Le GST costituiscono fino al 10% delle proteine

cellulari totali e le GSTP1 sono le isoforme di GST più espresse nella cavità orale e nella faringe. La resistenza a xenobiotici tossici (chemioter.) è spesso associata a over-espressione della GST.

Recentemente, un comune polimorfismo del gene *GSTP1* è stato associato ad una probabilità maggiore sopravvivenza in pazienti con stadio avanzato di cancro colon-rettale dopo trattamento chemioterapico con 5-FU/oxaliplatino. Questo polimorfismo, denominato ILE105VAL, è caratterizzato da una singola sostituzione A>G a livello del nucleotide 1578 e determina a livello della proteina una sostituzione aminoacidica isoleucina>valina in posizione 105, con conseguente diminuzione dell'attività enzimatica. Il residuo 105 si trova nel sito H dell'enzima risultando così essenziale nell'interazione di quest'ultimo con i substrati elettrofili. La variante GSTP1 105Val ha una frequenza del 33% tra la popolazione Caucasica con un 14% di omozigoti. In questo studio è stato dimostrato che, i pazienti omozigoti AA hanno una probabilità di sopravvivenza a 18 mesi del 5%, mentre negli eterozigoti AG questa probabilità aumenta al 33% e raggiunge il 71% nei pazienti omozigoti GG. Questa riduzione di rischio in soggetti omozigoti GG risulta essere inoltre indipendente da marker prognostici noti quali stadio di differenziazione e localizzazione del tumore.

L'analisi del polimorfismo 313 A>G del gene *GSTP1* può dunque essere utile da un punto di vista clinico per individuare e selezionare quei pazienti che possono beneficiare maggiormente della chemioterapia con derivati del platino e della radioterapia.

4 . HRM: RICERCA DI SNPs

La metodica “gold-standard” per la ricerca e la caratterizzazione dei polimorfismi a singolo nucleotide con la maggiore specificità è tutt’oggi il sequenziamento.

Il metodo Sanger o metodo enzimatico prevede un protocollo che segue:

- 1- purificazione di un prodotto di PCR;
- 2- processo di polimerizzazione al termociclatore con primer, desossinucleotidi e dideossinucleotidi marcati in fluorescenza (ognuna delle quattro basi con un fluorocromo differente) capaci di interrompere la polimerizzazione. Si creeranno così tanti frammenti di lunghezza progressivamente diversa terminanti con un nucleotide marcato.
- 3- Questi frammenti vengono poi analizzati dal sequenziatore che attraverso un’elettroforesi capillare e l’utilizzo di laser individua la fluorescenza dei vari fluorocromi.
- 4- In seguito all’allineamento dei vari frammenti in base al peso molecolare lo strumento costruisce un elettroferogramma che ci da la sequenza esatta del nostro frammento di DNA.

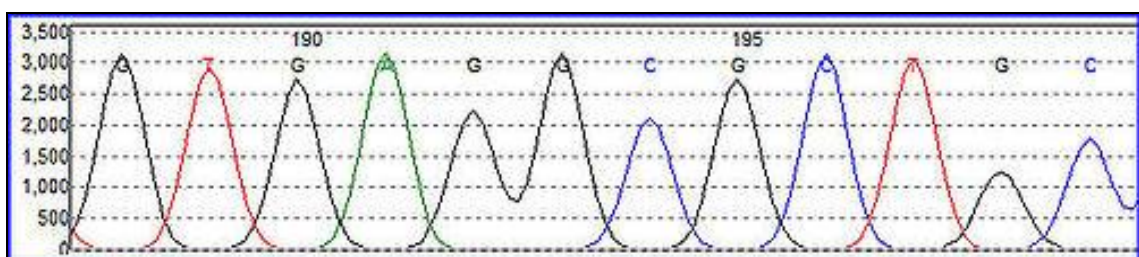


Figura 13. Tipico elettroferogramma di una sequenza di DNA.

Conoscendo la sequenza corretta del gene che viene analizzato per i polimorfismi in omozigosi, cioè presenti in entrambi gli alleli, si vedrà un picco di colore diverso nella posizione dello SNP. Mentre se è in eterozigosi, cioè ognuno degli alleli ha nucleotide diverso nella stessa posizione, vedremo un doppio picco.

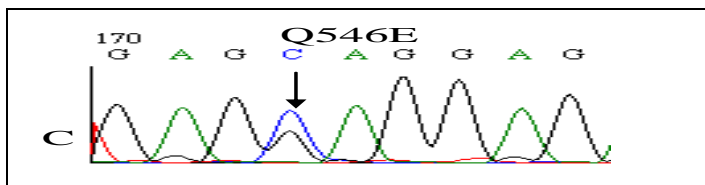


Figura 14. Tipico elettroferogramma di uno SNP in eterozigosi.

L'High Resolution Melt (22,23) è una nuova tecnologia che rappresenta un'applicazione del processo di denaturazione del DNA. La denaturazione è un processo per cui il DNA a doppio filamento si separa e le due eliche si separano in singoli filamenti per la rottura dei legami a idrogeno.

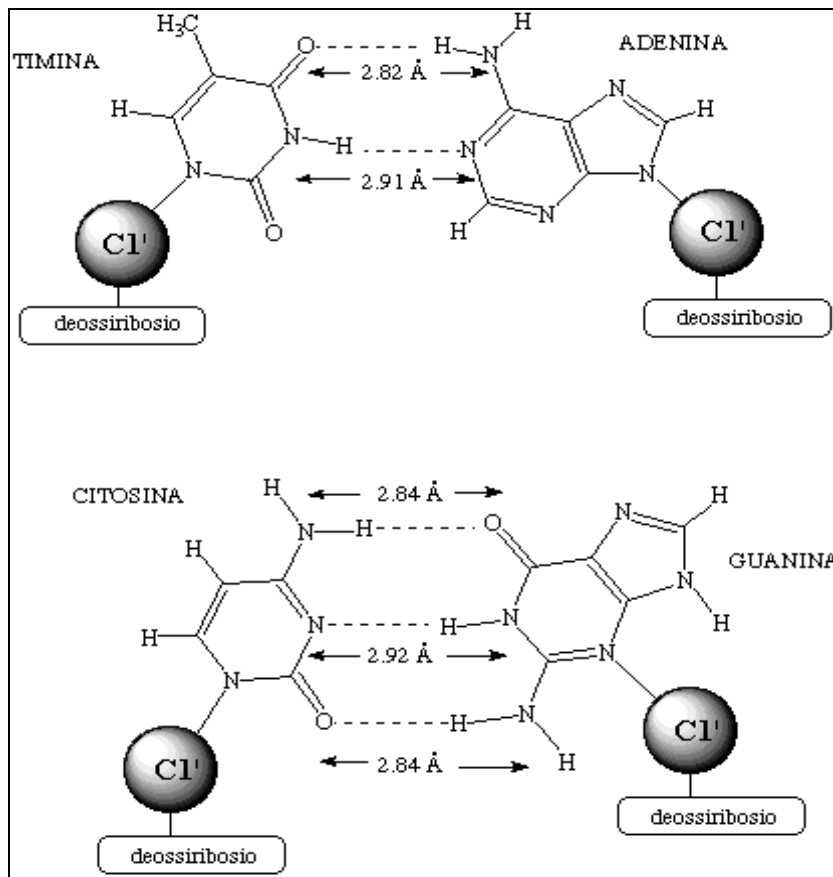


Figura 15. I legami idrogeno sono coinvolti nella stabilizzazione della doppia elica di DNA.

La doppia elica fisiologicamente è piuttosto stabile ma normalmente subisce il processo di denaturazione in determinate situazioni, ad esempio durante la replicazione del DNA stesso o per la trascrizione in RNA messaggero. La denaturazione può essere riprodotta in vitro e varie sono le metodiche affinché ciò avvenga; nel nostro caso l'energia usata è quella termica, cioè si sottopone il campione ad elevate temperature.

Quindi il passaggio fondamentale nell'HRM è la transizione del DNAds (doppio filamento) a DNAss (singolo filamento) che viene ottenuto esponendo il campione a temperature crescenti.

Per ottenere un risultato rilevabile occorre partire da una grande quantità di campione e ciò si ottiene facendo una PCR preliminare che prevede l'aggiunta alla miscela di reazione di una quantità saturante di un intercalante fluorescente.

I fluorocromi utilizzati oggi a questo scopo sono detti "di terza generazione" ed hanno il vantaggio rispetto a quelli usati precedentemente di essere meno tossici e quindi possono essere usati in quantità saturanti. Ciò permette alla molecola fluorescente di intercalarsi in maniera omogenea; inoltre esso si lega preferenzialmente al DNAds emettendo fluorescenza solo quando è legato, cioè quando il DNA non è denaturato.

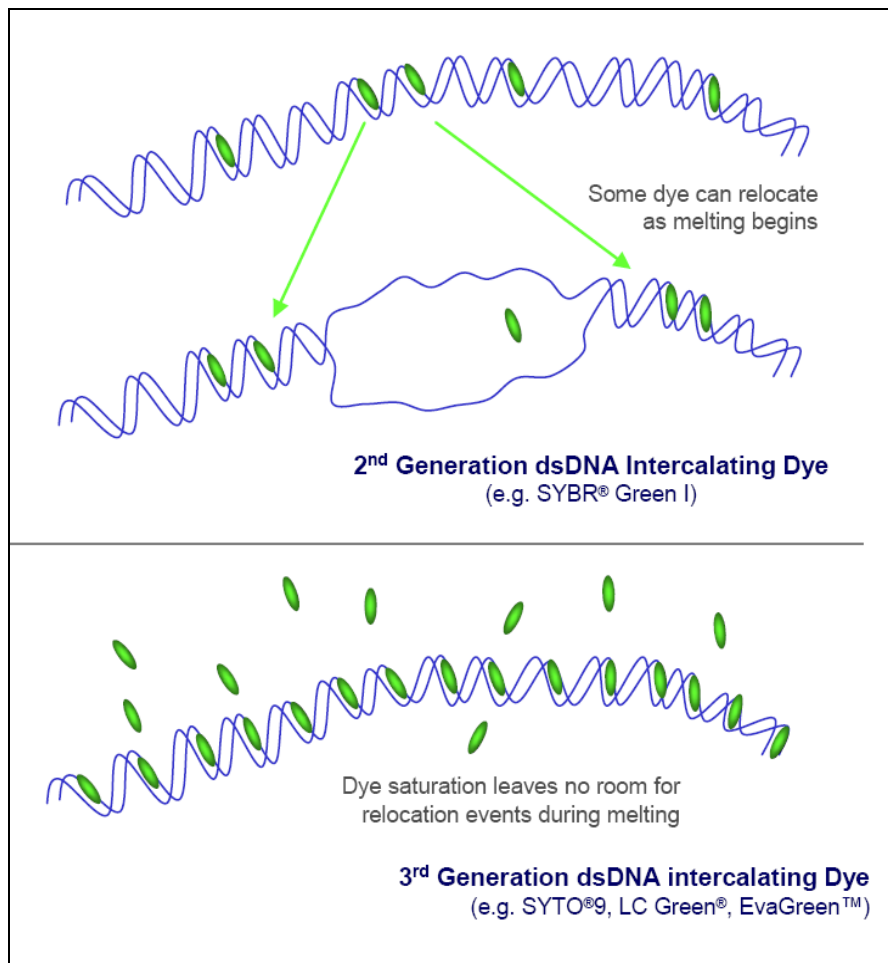


Figura 16. Gli intercalanti di terza generazione non si ridistribuiscono durante l'HRM nelle regioni non denaturate poiché l'intercalante satura tutti i siti di accesso nella doppia elica.

La fluorescenza inizialmente rilevata dal laser nel corso di un'analisi HRM è alta, in quanto il campione è costituito da un amplicone di DNAdS. Con l'aumentare della temperatura il segnale di fluorescenza diminuisce perché il DNA inizia a denaturarsi.

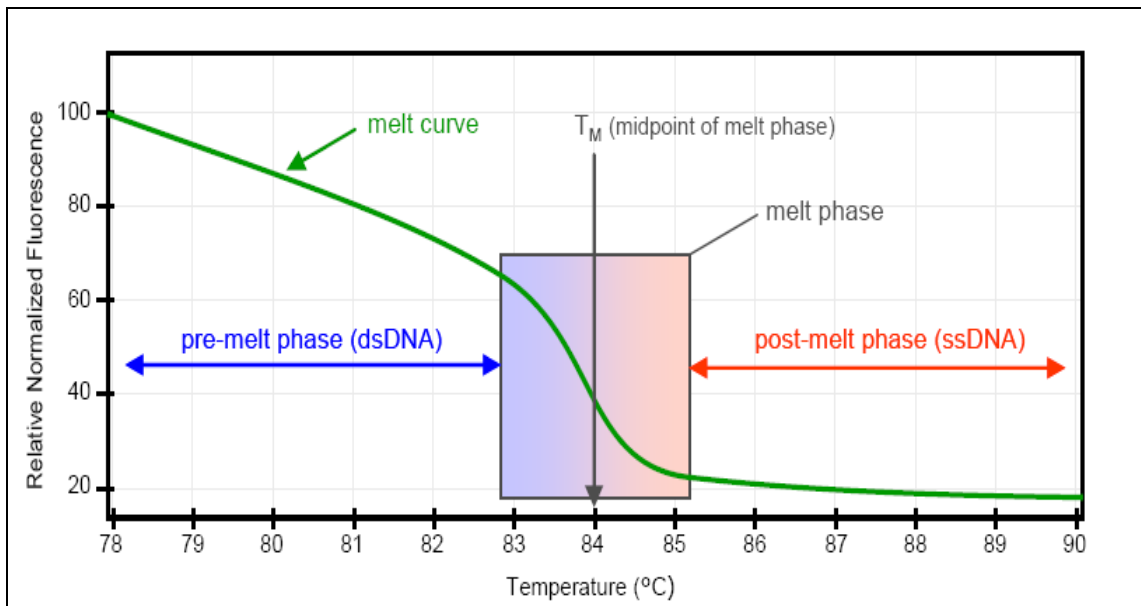


Figura 17. Tipico plot HRM.

Come si vede dalla figura, ad una determinata temperatura, tipica di ogni amplicone, la curva ha un flesso che rappresenta la temperatura di melting, cioè la temperatura alla quale la metà del DNA è denaturato. Il profilo di melting e quindi la temperatura di melting di ogni diverso amplicone può dipendere da vari fattori:

- lunghezza della sequenza;
- contenuto in GC;
- complementarietà intrasequenza che, durante la dissociazione, può portare ad una riassociazione in DNAs o alla formazione di strutture secondarie.

L'analisi effettuata dal software viene eseguita considerando l'intervallo di melt (figura 17).

Al di fuori di questo intervallo a temperature superiori, il DNA va a denaturarsi completamente, perciò il segnale di fluorescenza tenderà a zero,

in quanto, come detto in precedenza, il fluorocromo è in grado di emettere solo se intercalato nel double strand. L'HRM può essere utilizzata per discriminare da un punto di vista qualitativo e quantitativo una piccola proporzione di una variante del DNA in un pool di sequenza wild-type con una sensibilità di approccio pari al 5%.

L'HRM è stata sviluppata per numerose applicazioni fra cui:

- identificazione di geni candidati alla predisposizione delle malattie
- studi di associazione (studi retrospettivi o caso-controllo)
- determinazione di una prevalenza allelica in una popolazione o in un sottogruppo
- screening della perdita di eterozigotità
- DNA fingerprinting
- caratterizzazione degli aplotipi
- analisi della metilazione del DNA
- mappatura del DNA
- identificazione delle specie
- ricerca di mutazioni non note
- tipizzazione HLA

Nel nostro lavoro utilizzeremo questa tecnologia per la ricerca di polimorfismi.

In un tipico plot HRM normalizzato per le analisi di SNPs, le varianti alleliche in omozigosi sono caratterizzate da curve uguali ma “shiftate” sull'asse delle x, cioè l'asse della temperatura. Quando invece le varianti sono in eterozigosi, esse sono caratterizzate dal cambiamento della forma

della curva di melt. Ciò è il risultato dell'annealing fra filamento wild-type e filamento mutato che determina una molecola più instabile e la cui dissociazione è più precoce.

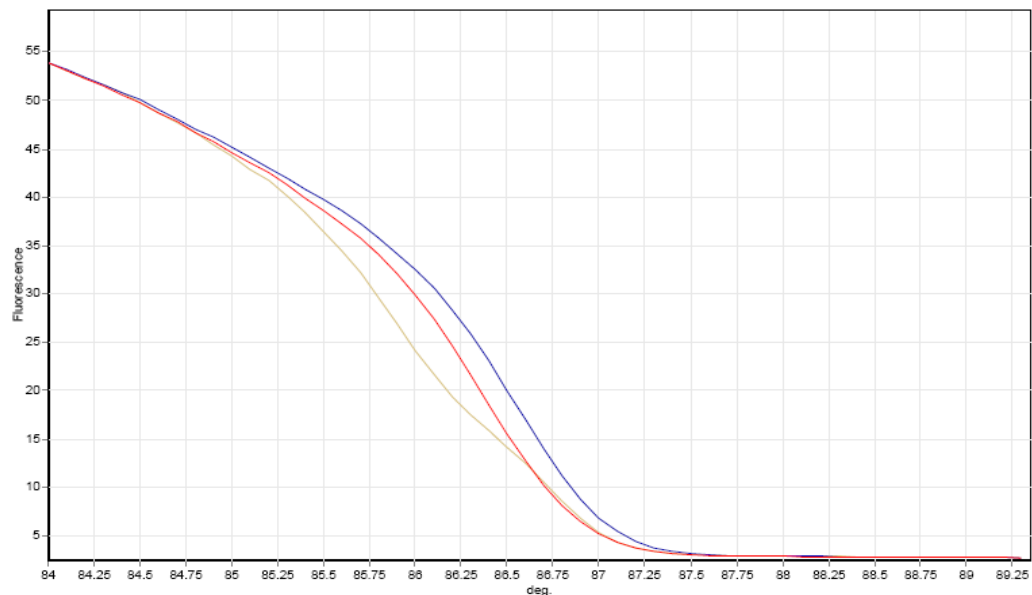


Figura 18. Plot di HRM normalizzato. La curva rossa e la curva blu rappresentano le varianti in omozigosi, la curva gialla è invece la variante in eterozigosi.

Inoltre ai fini di ottimizzare i risultati è stato necessario prestare delle accortezze sono necessarie delle accortezze, di cui le più importanti sotto elencate:

- fare particolare attenzione alla sequenza sotto analisi dato che alcune strutture secondarie possono compromettere il risultato determinando così domini di melting accessori;

- gli ampliconi da analizzare non dovrebbero essere più grandi di 250 bp altrimenti ciò comporterebbe una diminuzione della risoluzione; infatti una singola sostituzione nucleotidica modifica il comportamento dissociativo di un amplicone di 100 bp maggiormente rispetto ad un amplicone di 500 bp;
- il prodotto di PCR deve avere un'elevata purezza, i campioni contaminati da artefatti di sintesi come i dimeri di primer, nucleotidi non incorporati, residui enzimatici o di buffer e infine prodotti non specifici possono rendere i risultati di difficile interpretazione;
- il prodotto di PCR deve essere sufficientemente rappresentato;
- tutti i campioni devono avere lo stesso volume ed avere la stessa quantità di intercalante;
- la concentrazione salina del buffer, del magnesio e di altri sali influenzano il comportamento dissociativo del DNA e quindi le loro concentrazioni dovrebbero essere attentamente calcolate;
- l'intervallo di temperatura entro il quale si fanno correre i campioni non deve essere inferiore a dieci gradi e deve essere impostato attorno alla temperatura di melting prevista per l'amplicone in analisi e calcolata in base al contenuto di purine e pirimidine e quindi tenendo conto dei diversi legami a idrogeno che esse formano (a seconda di due o tre).

5 . MATERIALI E METODI

5.1 Campioni

Lo studio è stato condotto su un campione di 101 pazienti con tumori testa-collo, provenienti dalle Unità di Radioterapia di Firenze, Brescia e Prato, trattati con radioterapia e 110 controlli sani. Il trattamento consiste in dosi di radiazioni che vanno da 50 a 70 Gy (Gray, unità di misura della dose assorbita di radiazione) o con IMRT (intensity- modulated radiation therapy). Alcuni di questi pazienti sono stati trattati anche con chemioterapia : derivati del platino, 5-fluorouracile, taxani e/o cetuximab. Durante il trattamento è stata monitorata la tossicità sviluppata a seguito dell'esposizione a radiazioni. E sono stati assegnati dei punteggi in termini di severità ai vari effetti tossici acuti riscontrati. I gradi di tossicità sono stati assegnati utilizzando il Common Terminology Criteria for adverse effects (CTCAE) dell'NIH.

Gli effetti tossici analizzati sono stati:

- mucosite orale;
- xerostomia acuta;
- eritema;
- disfagia.

Ciascuna reazione acuta alla radioterapia è stata valutata in relazione al BED (biologically effective dose) (24, 25)che permette di normalizzare la

dose di radiazioni assorbita da ciascun paziente rispetto alle differenze di frazionamento e al tempo complessivo di trattamento.

5.2 Protocollo sperimentale

1- Estrazione del DNA dal sangue intero. Sono stati utilizzati 3 ml di sangue dal quale abbiamo estratto e purificato il DNA con il kit GENTRA DNA BLOOD (Qiagen, Hilden, Germany).

2- PCR. 100 ng di DNA sono amplificati in un volume finale di 10 μ l, il protocollo utilizzato prevede una miscela di reazione composta da: 1,25 μ l di Buffer (Life Technology, Italy), 1,5 mM di $MgCl_2$ (Life Technology, Italy), 300 nM di ciascun primer, 1,5 μ M intercalante fluorescente SYTO[®]9 Dye (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA) e 1,25 U di Taq Gold Polimerase (Life Technology, Italy). I primers utilizzati sono: *Xrcc1* 5'-CCCCAAGTACAGCCAGGTC-3' (Forw) and

5'-CAGTCTGACTCCCCTCCAGA-3' (Rev); *Xrcc3* - 5'-

CCATTCCGCTGTGAATTTG-3' (Forw) and 5'-

CCGCATCCTGGCTAAAAATA-3' (Rev); *Rad51* - 5'-

GCTGGGAAGTCAACTCATCT-3' (Forw) and 5'-

GCAGCGCTCCTCTCTCCAGC-3' (Rev); *Gstp1* - 5'-

CTCTATGGGAAGGACCAGCA-3' (Forw) and 5'-

GAAGCCCCTTTCTTTGTTCA-3' (Rev). La fase di amplificazione nel

termociclatore prevede una denaturazione iniziale a 95°C per 10 min.

seguita da 35 cicli composti da tre step: 60 sec a 95°C, 60 sec a 60°C e 60 sec a 72°C. Infine un'estensione finale a 72°C per 20 min.

3- High Resolution Melting Analysis. L'analisi è stata fatta utilizzando lo strumento Corbett 6000 (Corbett Research Diatech, Italia) è stata effettuata sottoponendo inizialmente i campioni a 95°C per 5 minuti e poi a 40°C per 1 minuto. Il profilo di denaturazione è stato ottimizzato da 75°C a 90°C per tutti gli amplificati analizzati.

4- Sequenziamento. Dopo aver fatto la polimerizzazione con i di-deossinucleotidi marcati in fluorescenza al termociclatore e le varie purificazioni dei prodotti, i campioni vengono analizzati dal sequenziatore ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Ciò ci ha permesso di confrontare il risultato ottenuto con l'analisi HRM, cioè di confermare la presenza o l'assenza di polimorfismi.

5.3 Analisi statistica

Ciascun polimorfismo è stato analizzato per la deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg confrontando le sequenze genotipiche osservate e attese con il test χ^2 . L'effetto del trattamento chemioterapico sullo sviluppo di reazioni avverse è stato valutato suddividendo i pazienti in base al loro grado di tossicità e in accordo alla presenza o meno di chemioterapia utilizzando il test del χ^2 .

L'associazione fra un alto grado di tossicità clinica (end-point) e i genotipi a livello dei suddetti SNPs è stata valutata in termini di odds ratio (OR) con

un intervallo di confidenza del 95%. Il grado di significatività è stato calcolato usando il test χ^2 , salvo in caso di campioni di piccole dimensioni (<5), è stato utilizzato il test di Fischer. Un valore di p inferiore o uguale a 0,05 è stato considerato statisticamente significativo. La relazione fra il parametro di dose, espresso come BED medio (BED_{mean}), e le reazioni avverse alle radiazioni è stata testata con il Mann-Whitney U test.

La probabilità di non sviluppare reazioni severe acute ($CTC \geq 2$) è stata analizzata in relazione ai valori di BED usando il metodo Kaplan- Meier (26). Il confronto delle curve del BED è stato effettuato usando il log-rank test.

I valori di Hazard ratios (HRs) e il suo intervallo di confidenza sono stati determinati usando il modello proporzionale di Cox (27-28). Un livello di probabilità inferiore o uguale a 0,05 è stato utilizzato come criterio di significatività. Tutte le analisi sono state effettuate utilizzando il pacchetto software SPSS 17.0 (SPSS INC, Chicago, IL).

6 . SCOPO DELLA TESI

Individuare fattori genetici predittivi di radiosensibilità nei pazienti oncologici potrebbe rappresentare un'importante potenzialità ai fini dell'ottimizzazione dell'intervallo terapeutico. Quest'ultimo è particolarmente esiguo nel caso delle terapie citotossiche in cui la bassa selettività per le cellule tumorali fa sì che l'effetto terapeutico sia molto vicino a quello tossico. La prescrizione della dose corretta di terapia è in questi casi difficilmente individuabile sulla base della sola valutazione della superficie corporea del paziente.

La radioterapia costituisce un efficace modalità di trattamento in circa il 50% dei pazienti oncologici, ma lo sviluppo di reazioni avverse da parte del tessuto normale presente nel campo di irradiazione limita l'utilizzo di questa modalità di trattamento. I pazienti meno radiosensibili potrebbero ricevere una dose maggiore di radioterapia, senza un contemporaneo aumento nella probabilità di sviluppo della tossicità e con vantaggi in termini di aumento della tumor control probability (TCP). I pazienti più radiosensibili potrebbero invece ricevere una dose minore di radioterapia, con i vantaggi di una diminuita tossicità. È presumibile che le probabilità di controllo della malattia rimangano immutate, dal momento che anche il tumore potrebbe essere altrettanto radiosensibile in quest'ultimi pazienti. La tossicità che si sviluppa in seguito al trattamento con RT ha delle

conseguenze drammatiche per il paziente che sono legate alla comparsa sia di effetti acuti che di effetti tardivi o addirittura cronici per cui si rende necessario in molti casi interrompere la terapia e quindi la possibilità di cura. Oltre a questo, la tossicità in un paziente con un deficit di riparazione del DNA, potrebbe portare ad un aumento del numero di mutazioni somatiche e quindi rendere il tumore stesso più aggressivo, peggiorando in tal modo la prognosi.

Nel 70% dei casi di SCCHN, la radiosensibilità è essenzialmente un evento cellulare piuttosto che sistemico in cui tutto ruota attorno al meccanismo di riparazione del DNA. Nei pazienti meno radiosensibili è ipotizzabile che il meccanismo di riparazione del DNA prevalga su quello infiammatorio ed apoptotico, determinando un continuo self-renewal delle cellule che fa sì che il paziente non sviluppi tossicità. Nella maggior parte di questi pazienti per lo più, la radioterapia è poco efficace. Ciò porta a considerare che i tumori non siano entità radiosensibili in assoluto e che la loro sensibilità alle radiazioni possa dipendere anche dal contesto germinale in cui essi si sviluppano. Allo stesso modo, i pazienti più radiosensibili sono proprio coloro in cui la radioterapia è più efficace. In essi il meccanismo apoptotico e pro infiammatorio potrebbe avere la meglio su quello di riparazione del DNA per cui questi pazienti sviluppano facilmente reazioni conseguenti alla perdita di cellule (es. mucositi, desquamazione nei tessuti epiteliali, depressione sistema emopoietico) e reazioni di tipo infiammatorio (variazioni della permeabilità delle cellule e di rilascio di istamina, es. l'eritema). E' importante capire se tale equilibrio tra riparazione da un lato

ed apoptosi ed infiammazione dall'altro viene regolato da fattori genetici, come ad esempio polimorfismi a livello del genoma dell'individuo.

Le radiazioni eliminano le cellule attraverso due principali meccanismi: uno diretto, mediante il quale l'energia che si libera da esse interagisce a livello di DNA, portando alla generazione di rotture (breaks) e all'attivazione delle pathway proapoptotiche; uno indiretto, in cui l'energia proveniente dalle radiazioni viene assorbita dalle molecole che sono presenti all'interno della cellula (nella maggior parte dei casi molecole di acqua), portando ad un aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) che possono a loro volta causare vari tipi di danno al DNA. E' ipotizzabile quindi che un deficit nei meccanismi cellulari di protezione nei confronti dello stress ossidativo possa portare ad un aumento dei ROS all'interno della cellula e conseguentemente ad un aumento della tossicità. Allo stesso modo un gain nella protezione contro i ROS potrebbe rendere queste cellule troppo insensibili alle radiazioni e determinare una scarsa efficacia della radioterapia.

Il 90% dei polimorfismi del DNA sono rappresentati da polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs). Solo l'1% di essi ha significato biologico, nella maggior parte dei casi di modesto significato dal punto di vista clinico. Tuttavia, in seguito all'esposizione più o meno prolungata ad un determinato fattore ambientale (come ad esempio la radioterapia), alcuni SNPs in specifici geni possono indurre un migliore o peggiore adattamento ad esso e quindi essere alla base della variabilità biologica nella risposta a tale stress.

Obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare in una coorte di 101 pazienti affetti da carcinoma squamoso del distretto testa-collo, l'eventuale associazione tra SNPs in geni del DNA repair (XRCC1 c.1196 A>G p.Arg399Gln, XRCC3 c.722 C>T p.Thr241Met, RAD 51 c.-3429 G>C, RAD 51 c.-3392 G>T) e del meccanismo di protezione nei confronti dello stress ossidativo (GSTP1 c.313 A>G p.Ile105Val) e lo sviluppo di reazioni acute avverse alla radioterapia, in termini di mucosite, eritema, xerostomia e disfagia.

In letteratura sono presenti molti studi che documentano il significato di questi 4 SNPs; è infatti dimostrato il loro ruolo biologico (genotipo-fenotipo, studi *in vivo*), in silico è accertata la loro funzione predittiva, così come a livello epidemiologico (studi caso-controllo di rischio di cancro). Ci sono inoltre dati a sostegno dell'associazione con malattia, prognosi, e dell'attività differenziale delle varianti.

Tuttavia non è ancora chiaro il loro significato clinico e predittivo di risposta alle terapie citotossiche; il carcinoma squamoso del distretto testa-collo potrebbe rappresentare da questo punto di vista un modello di studio, visto l'impiego di una radioterapia localizzata e l'ampio spettro di effetti collaterali riscontrabili.

7 . RISULTATI

7.1 Determinazione dei genotipi negli SNPs studiati tramite PCR-HRMA

Protocolli di PCR-HRMA sono stati ottimizzati per i geni *XRCC1*, *XRCC3* e *GSTP1* mettendo a punto così un metodo valido, sensibile e rapido per lo screening degli SNPs presenti su questi geni. Per quanto riguarda il polimorfismo del gene *RAD51*, data la compresenza di un altro SNP appena 30 nucleotidi a valle, è stata utilizzata la PCR convenzionale, seguita dal sequenziamento diretto.

7.1.1 Messa a punto del protocollo di PCR

I primer sono stati scelti utilizzando il software Primer3 disponibile on-line (29) La temperatura di annealing di ciascun primer è stata fornita dalla ditta dalla quale sono stati acquistati, essa dipende dal contenuto in GC e dalla lunghezza dell'innesco.

GENI	PRIMER	T _A
XRCC3	5'- CCATTCGCTGTGAATTTG- 3' (Forw)	58°C
	5'- CCGCATCCTGGCTAAAAATA-3' (Rev)	
XRCC1	5'- CCCCAAGTACAGCCAGGTC- 3'(Forw)	60°C
	5'- CAGTCTGACTCCCCTCCAGA-3'(Rev)	
GSTP1	5'- CTCTATGGGAAGGACCAGCA- 3'(Forw)	60°C
	5'- GAAGCCCCTTTCTTTGTTCA-3' (Rev)	
RAD51	5'- GCTGGGAACTGCAACTCATCT-3'(Forw)	58-59°C
	5'- GCAGCGCTCCTCTCTCCAGC-3' (Rev)	

Tabella 1. Sequenze nucleotidiche dei primer usati nello studio.

Un'altra problematica affrontata per tutti e quattro i geni è stata quella della tendenza del DNA a formare strutture secondarie; per ovviare a questo problema abbiamo inserito del glicerolo al 1% nel volume finale di reazione. Ciò ha permesso di discriminare con un maggior grado di accuratezza e precisione i profili HRMA dei vari genotipi analizzati.

7.1.2 Messa a punto del protocollo HRMA

È stato inizialmente necessario trovare la temperatura di Melting (T_m) di ciascun amplicone la quale è stata individuata in maniera empirica osservando la curva di dissociazione. Inizialmente è stata scelta una finestra ampia (65c°- 90C°) di temperatura nella quale analizzare i campioni; successivamente, osservato il plot e identificata la T_m situata nel punto di flesso della curva è stata definita la finestra adeguata per l'analisi di ciascun

campione. Questo range di temperatura si trova intorno è generalmente di circa dieci gradi ed è centrato sulla T_m .

GENI	T_m	Intervallo di T_m
XRCC1	86 - 87.5	80 - 95
XRCC3	88.9 - 89.6	81 - 97
GSTP1	90.5 - 92	81 - 95
RAD51	89 - 92	84 - 99

Tabella 2. Caratteristiche termiche degli ampliconi esaminati.

In tabella la T_m è espressa con un intervallo perché per lo stesso gene varia a seconda del polimorfismo presente.

Una fase molto importante durante il processo di ottimizzazione dell'HRMA è quella della individuazione del cosiddetto "ramping degree" ottimale; questo indice rappresenta l'intervallo infinitesimale nel quale viene acquisito il segnale di fluorescenza. Esso dipende dalla grandezza del prodotto di PCR da analizzare e poiché esso è variabile per ogni coppia di primer, il valore di ramping degree deve essere individuato per ogni corsa.

7.2 Determinazione mediante HRMA dello SNP sul gene XRCC3

Il polimorfismo indagato su questo gene è il seguente: C722T (Thr241Met). Quindi avremo un genotipo più frequente omozigote (CC) quando in

posizione 722 ci sarà una citosina su entrambi gli alleli. Le varianti sono quindi due: un omozigosi TT oppure un eterozigosi CT.

Sotto è riportata la normalizzazione delle curve di Melt, ottenuta tramite un'elaborazione del software che mette in evidenza i tre genotipi. Possiamo osservare i due omozigoti come due curve con lo stesso profilo ma shiftate sull'asse delle x, e le curve degli eterozigoti con un profilo del tutto diverso.

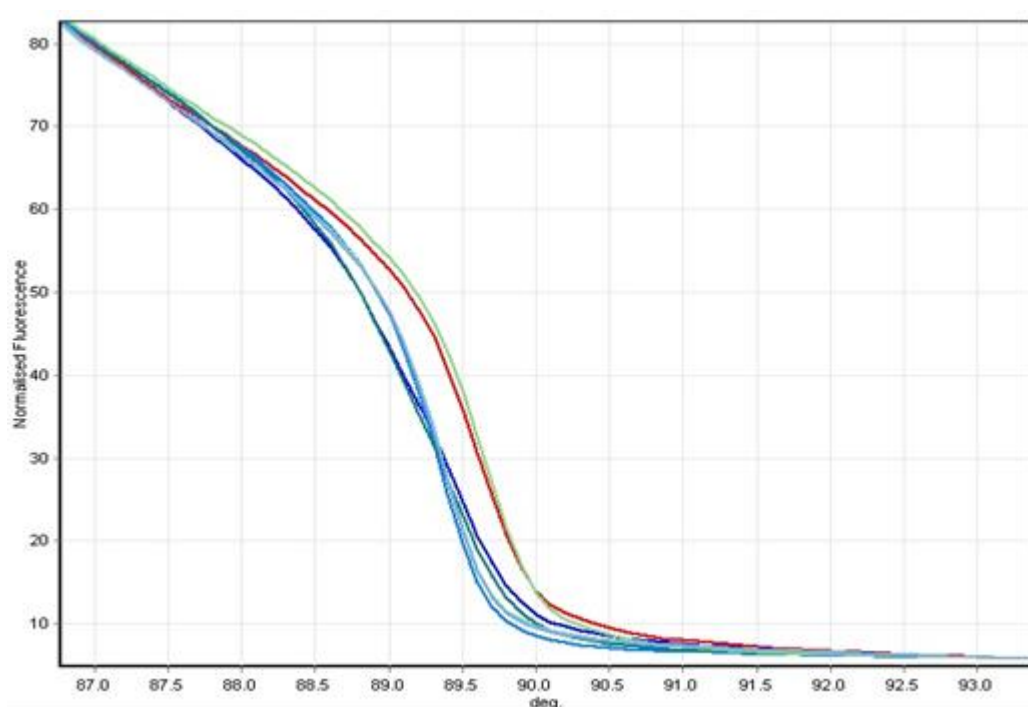


Figura 19. Curve normalizzate del prodotto di PCR di XRCC3.

Di seguito sono riportate curve di Melt ottenute facendo un'analisi HRM su ampliconi di XRCC3. Ognuna delle curve presenta un profilo dissociativo caratteristico. Vediamo come l'insieme delle curve risultanti si divida in tre gruppi, ognuna dei quali presenta un profilo diverso. Si distinguono due gruppi di curve che presentano un singolo picco (omozigoti), che si

differenziano per un shift della curva sull'asse delle ascisse (della temperatura); questo sta a significare che le curve spostate verso destra sono date da campioni contenenti ampliconi che si dissociano ad una temperatura più alta. Questi saranno i campioni con genotipo CC, in quanto le citosine formano tre legami ad idrogeno rispetto alle timine che ne formano solo due. Per quanto riguarda la componente eterozigote, CT, è rappresentata dalle curve con il caratteristico doppio picco che evidenzia la presenza di due differenti domini di denaturazione uno relativo agli omoduplex e uno all'eteroduplex.

L'eteroduplex è dato dall'associazione tra il filamento con polimorfismo e il filamento con l'allele più frequente; per questo motivo, esso è più instabile e dissocia prima rispetto all'omoduplex.

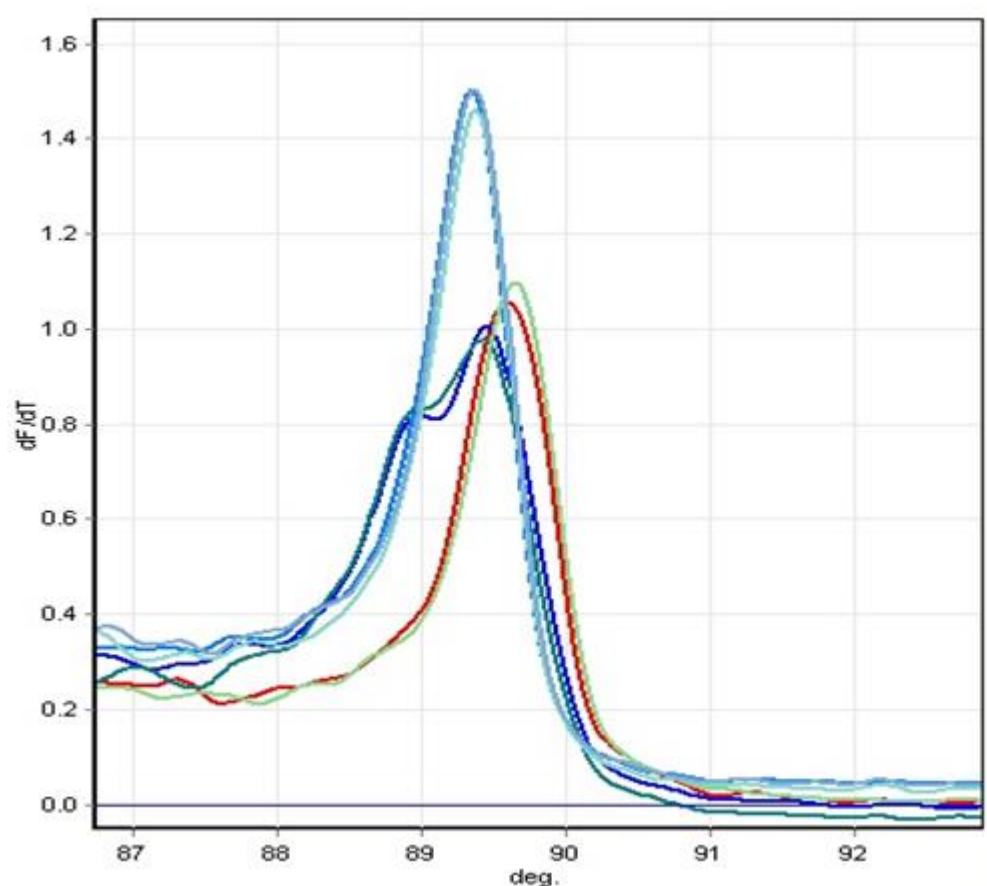


Figura 20 Curve di Melt, XRCC3.

Un'ulteriore analisi del software è data dal plot differenziale che indica il valore di fluorescenza dei due genotipi rispetto al valore di fluorescenza del terzo, scelto di riferimento come zero. Il plot sotto riportato è differenziale rispetto al genotipo TT, quindi le curve che si posizionano sull'asse delle ascisse sono quelle dei campioni omozigoti TT, quelle che presentano un picco unico sono gli omozigoti CC e quelle invece che hanno due picchi uno sopra l'asse delle x e uno al di sotto sono gli eterozigoti CT.

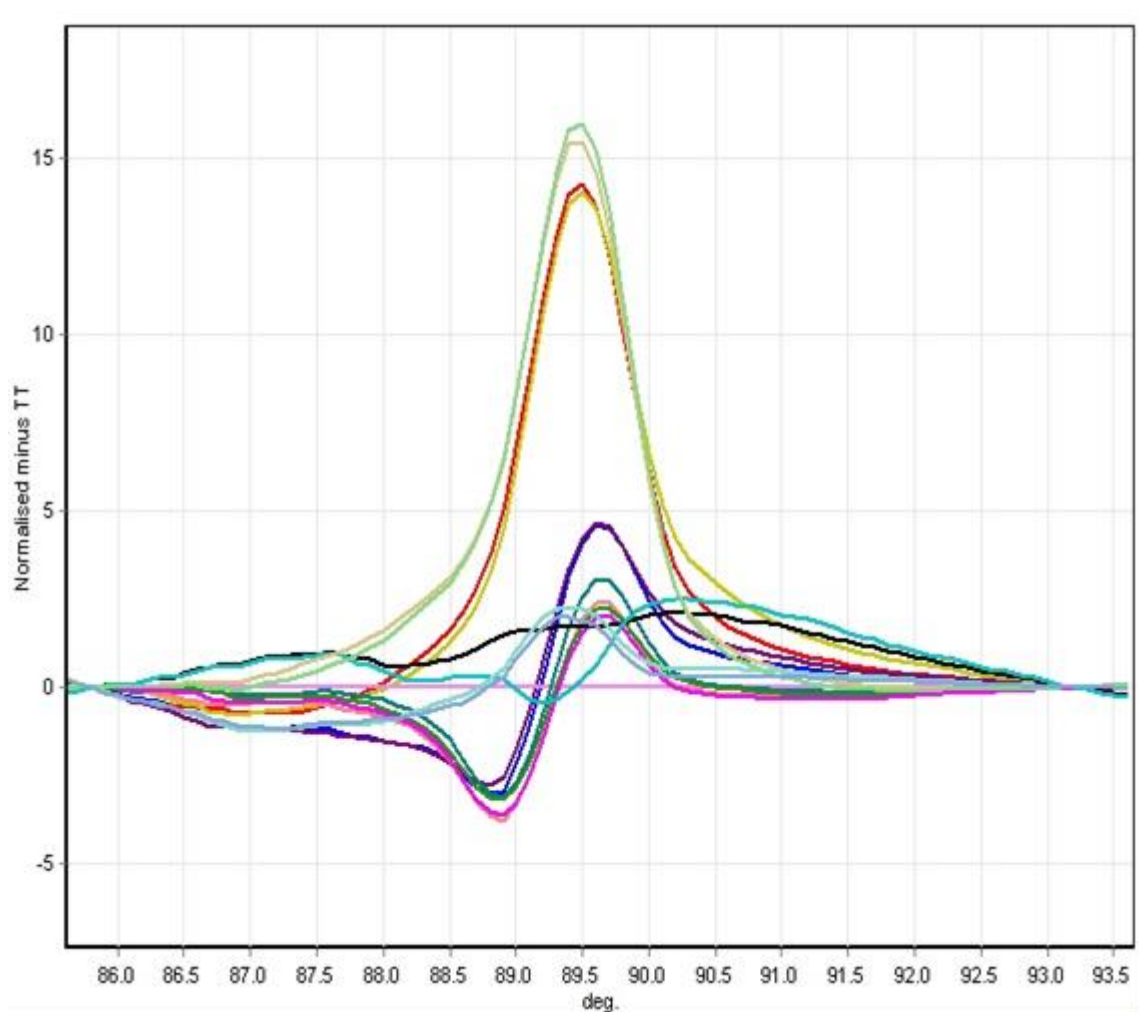


Figura 21 Plot differenziale del prodotto di PCR di XRCC3rispetto a TT.

7.3 Determinazione mediante HRMA dello SNP sul gene *XRCC1*

Il polimorfismo studiato su questo gene è il seguente: G1196A (Arg399 Gln). L'allele più frequente è l'omozigote GG e le varianti polimorfiche sono GA e AA. L'interpretazione dei plot HRM è uguale a quella dello SNP su XRCC3 e a quello su GSTP1, in quanto in tutti i casi siamo in presenza di sostituzioni che portano ad un cambiamento della stabilità della

doppia elica; in questo caso, così come nel caso dello SNP su XRCC3, si ha una diminuzione della stabilità perché un triplo legame ad idrogeno diventa un doppio legame. La curva data dalla variante omozigote AA sarà spostata verso sinistra rispetto a quella data dal GG. Sotto sono proposti alcuni esempi.

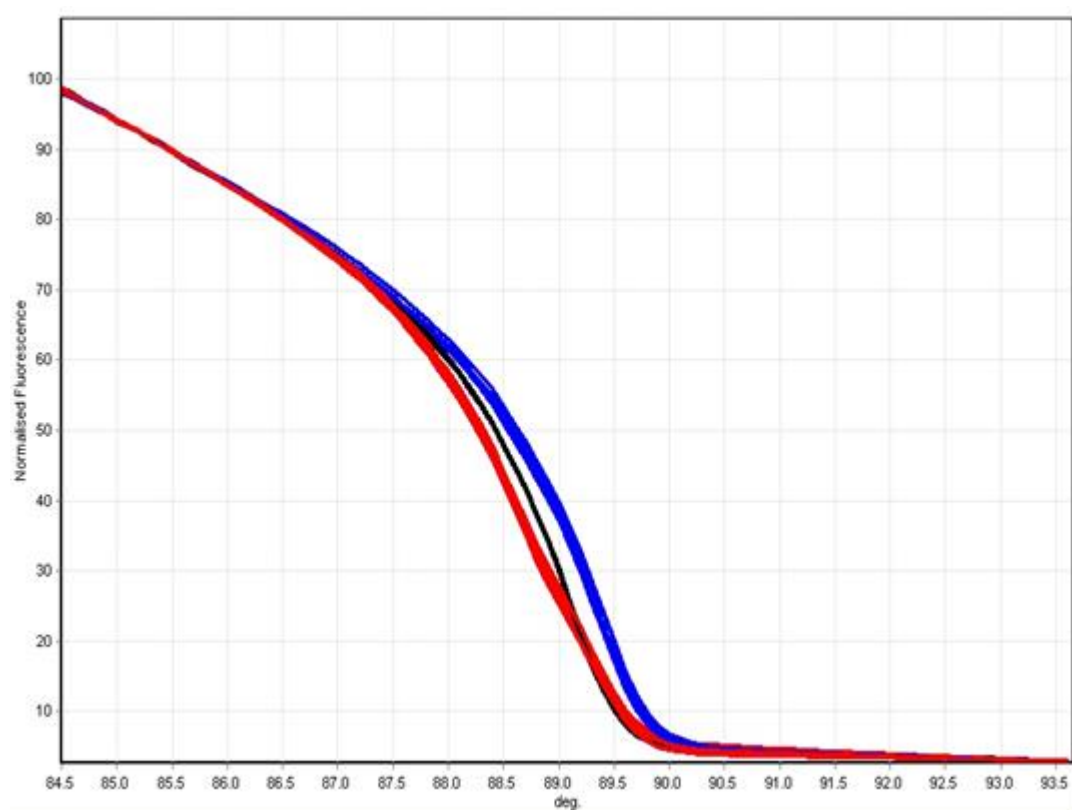


Figura 22. Plot HRM normalizzato per l'analisi di XRCC1 c.1196 A>G.

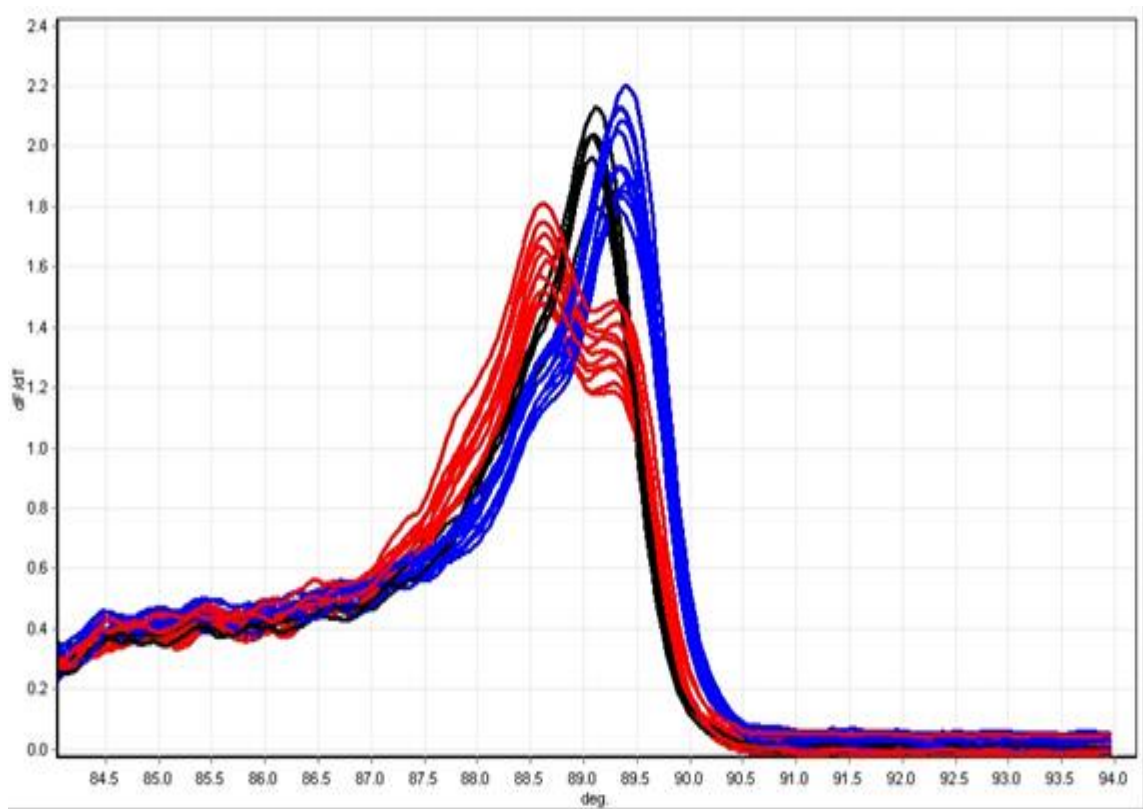


Figura 23. Plot di Melt per l'analisi di XRCC1 c.1196 A>G.

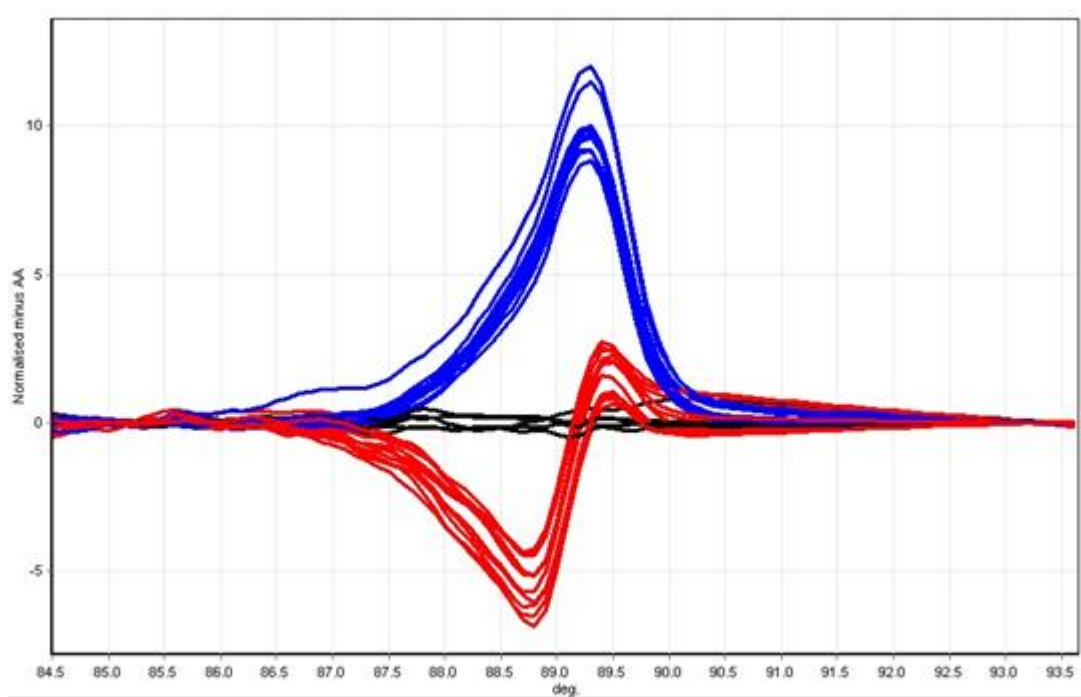


Figura 24. Plot differenziale per l'analisi di XRCC1 c.1196 A>G.

7.4 Determinazione mediante HRMA dello SNP sul gene *GSTP1*

Lo SNP indagato su questo gene è stato il seguente: A313G (Ile105Val). Trattandosi di una sostituzione di un'adenina con una guanina, la variante omozigote GG presenta una curva di dissociazione "shiftata" verso destra in quanto la guanina forma tre legami a H con la citosina e quindi si dissocia a temperature maggiori. Alcuni plot sono sotto riportati.

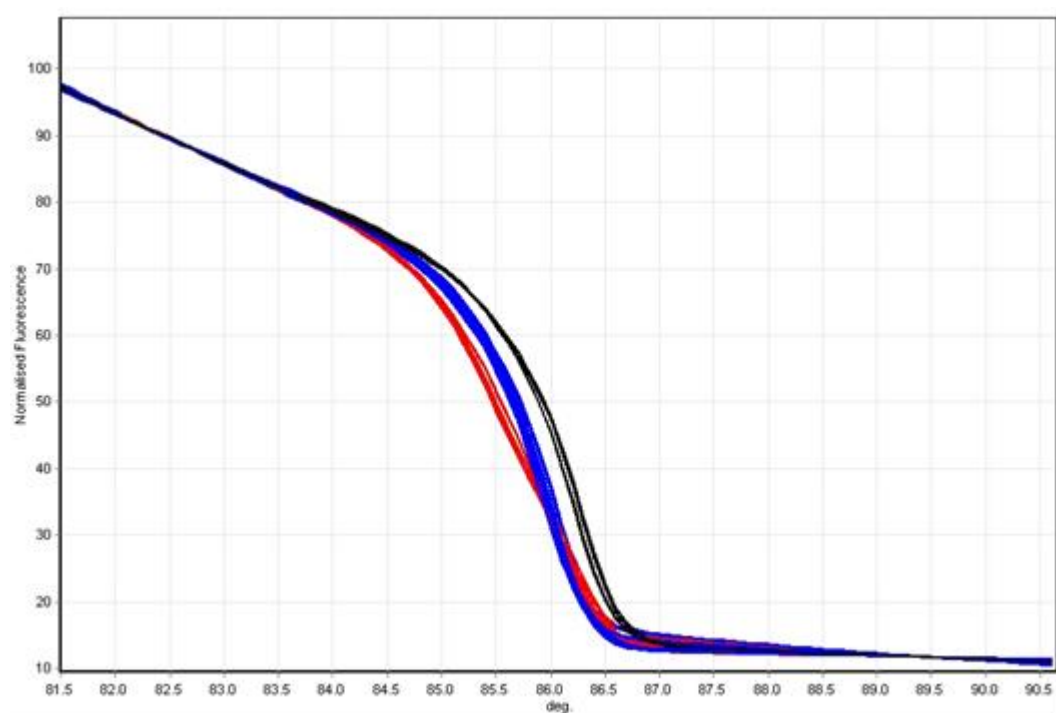


Figura 25. Plot HRM normalizzato per l'analisi di GSTP1 c.313 A>G.

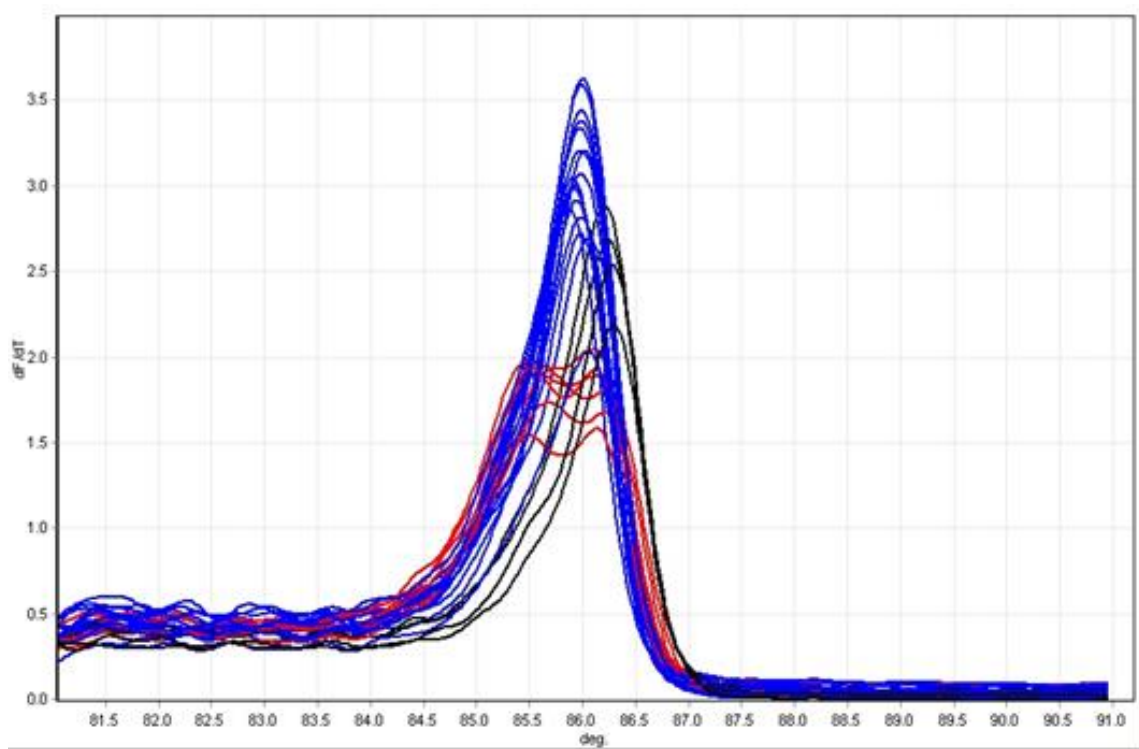


Figura 26. Plot di Melt per l'analisi di GSTP1 c.313 A>G.

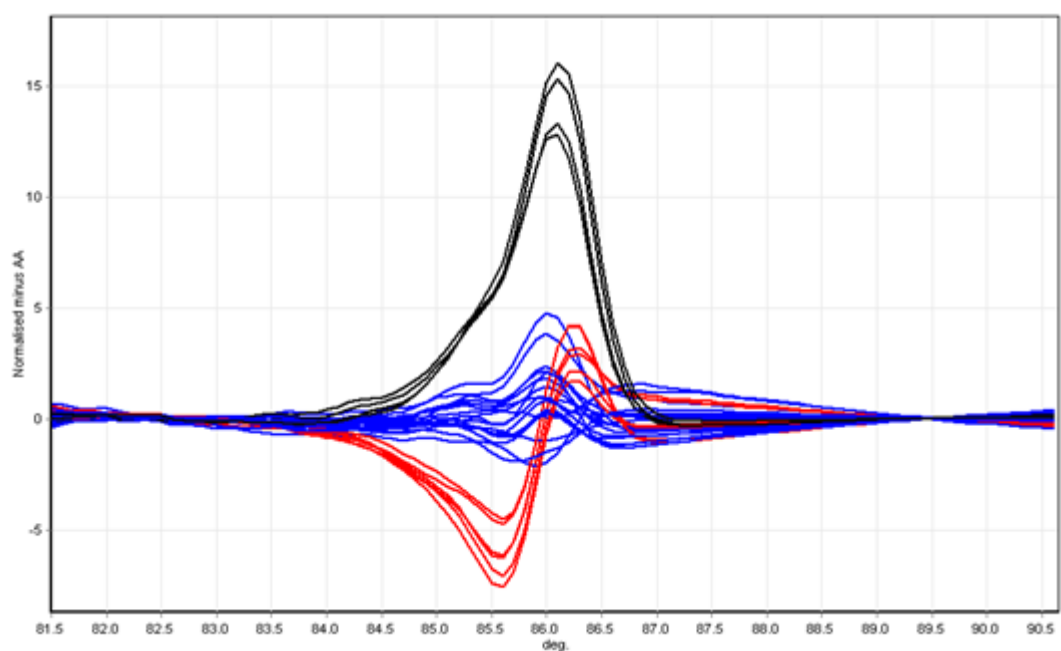
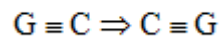


Figura 27. Plot differenziale per l'analisi di GSTP1 c.313 A>G.

7.5 Determinazione mediante HRMA dello SNP sul gene *RAD51*

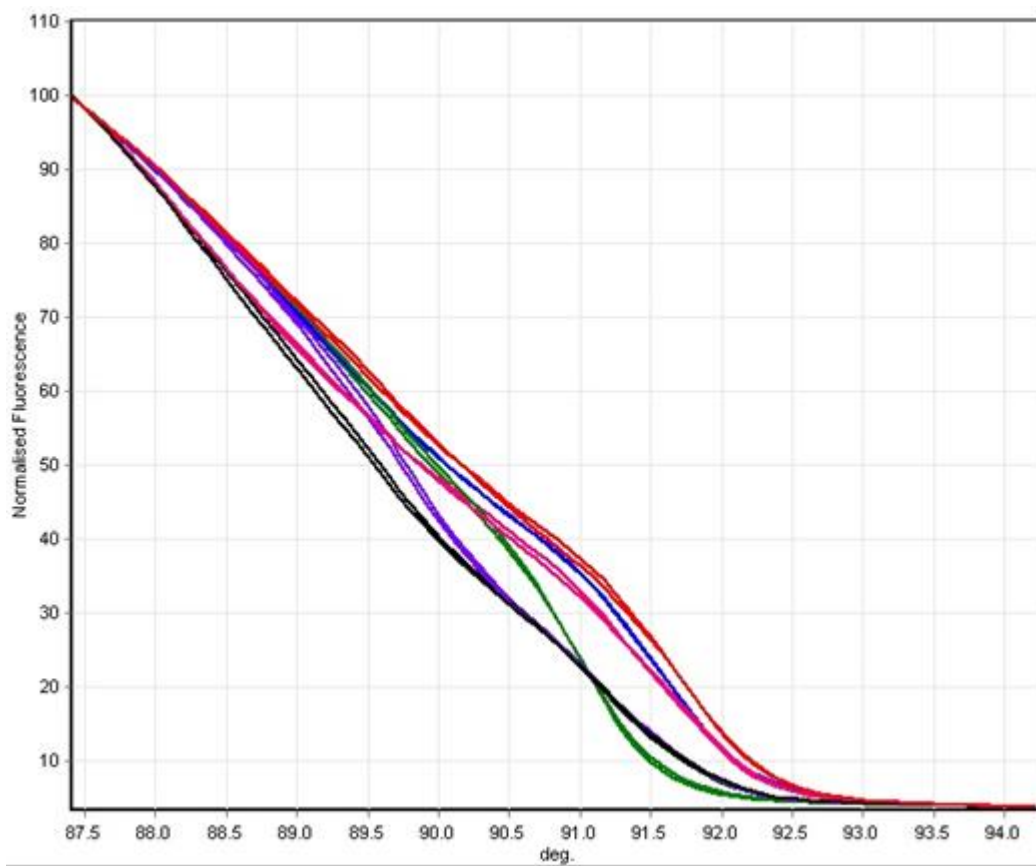
Su questo gene abbiamo studiato due SNP: - 3429 G>C e - 3392 G>T. Come già detto, per lo studio di questi SNPs è stato utilizzato solamente il sequenziamento diretto. L'analisi HRM è risultata di difficile interpretazione, essenzialmente per tre motivi:

- 1- la compresenza di due polimorfismi nello stesso prodotto di PCR;
- 2- lo SNP - 3392 G>T è evidenziabile all'HRM perché la sostituzione comporta un cambiamento della curva di dissociazione, invece l'altro - 3429 G>C non porta ad una modificazione del profilo dissociativo perché i legami a H restano sempre tre anche con la sostituzione.



- 3- l'elevata frequenza nella popolazione di entrambi i polimorfismi.

Nonostante queste problematiche, sotto vengono riportati i plot ottenuti. Vediamo come i due eterozigoti viola e nero per il secondo polimorfismo *RAD51* c.-3392 G>T si riescono a distinguere ma non potendo vedere il primo SNP *RAD51* c.-3429 G>C, non è possibile indicare il genotipo completo se non sequenziando i campioni.



genotipi	Colori delle curve
GG-GG	Blu
GG-GT	Viola
GC-GG	Rosa
GG-TT	Verde
GC-GT	Nero
CC-GG	Rosso

Figura 28. Plot HRM normalizzato per l'analisi dei polimorfismi di RAD51 c.-3429 G>C e c.-3392 G>T.

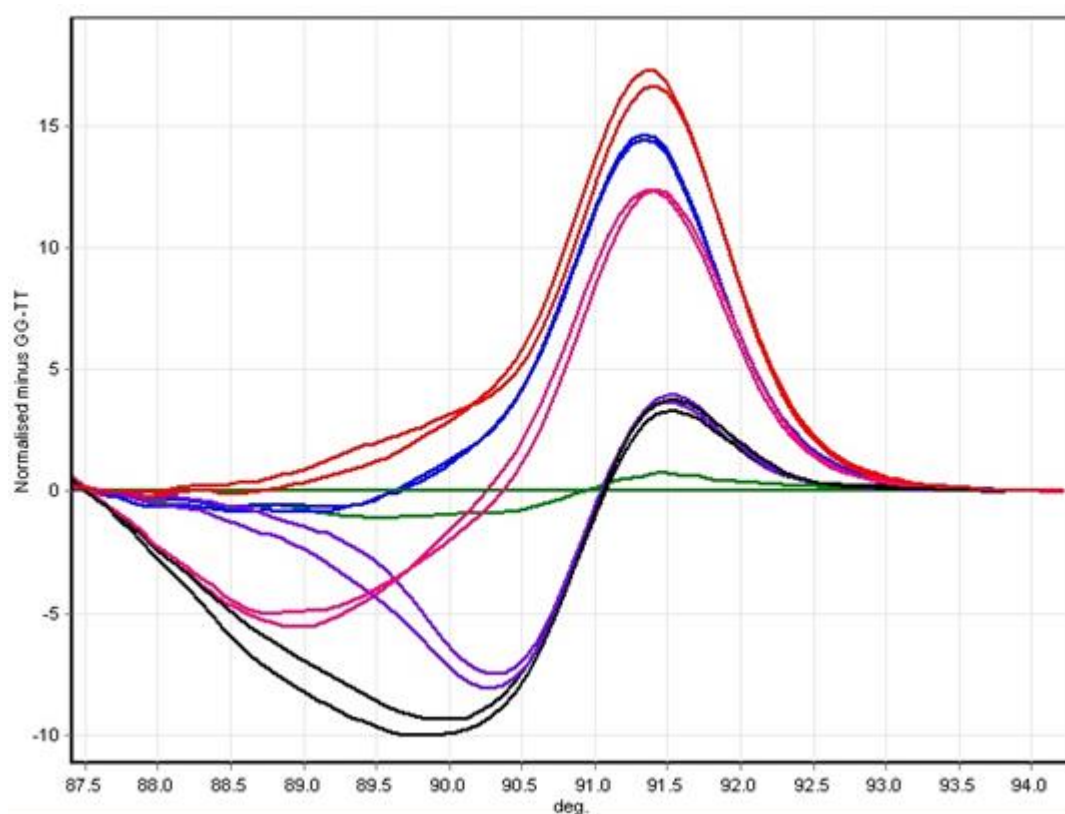


Figura 29. Plot differenziale per l'analisi dei polimorfismi di RAD51 c.-3429 G>C; e c.-3392 G>T.

7.6 Notazioni cliniche dei pazienti SCCHN trattati con RT

La mucosite orale, l'eritema cutaneo e la disfagia erano considerati gli endpoint clinici di questo studio che comprendeva l'81.2% di femmine e il 18.8% di maschi. Il tumore primario era così localizzato:

- 9.9% alla nasofaringe
- 28.7% in sede orofaringea
- 18.8% nella cavità orale

- 12.9% all'ipofaringe
- 26.7% alla laringe
- 2% ai seni paranasali
- 1% alle ghiandole salivari.

In tabella 3 vengono illustrate le caratteristiche cliniche e demografiche del gruppo di studio.

Caratteristiche	No.		%
Totali	101		
Sesso			
- uomini	82		81.2
- donne	19		18.8
Età			
- Media		62.5	
- SD		13.2	
- Range		28-89	
Sito del tumore			
- Rinofaringe	10		9.9
- Orofaringe	29		28.7
- Cavità orale	19		18.8
- Ipofaringe	13		12.9
- Laringe	27		26.7
- Seni paranasali	2		2
- Ghiandole salivari	1		1
Trattamento			
- Radioterapia	101		
- Chemioterapia	56		55.4
Chemioterapia FU			
- Derivati del platino	19		18.8
- Taxani	54		53.5
- Cetuximab	17		16.8
	8		7.9
BED, Gy			
- Medio		59.9	
- SD		9.2	
- Range		18.9-74.4	

Abbreviazioni: SD, deviazione standard; FU, fluorouracile, BED, biologically effective radiation dose.

Abbreviazioni: SD, deviazione standard; FU, fluorouracile, BED, biologically effective radiation dose.

Tabella 3. Caratteristiche cliniche e demografiche del gruppo di studio

Il trattamento chemioterapico consisteva nella somministrazione di derivati del platino, taxani, 5-fluorouracile e cetuximab da solo o in associazione con un altro farmaco. Erano 68 casi di mucosite con grado ≥ 2 , 39 con eritema severo e 12 con un alto grado di disfagia. Poiché molti pazienti erano trattati anche con chemioterapia, gli effetti di questo trattamento sullo sviluppo di reazioni tossiche acute da radiazioni sono stati analizzati suddividendo i pazienti in accordo al tipo di trattamento.

7.6.1 Genotipi e frequenze alleliche

Le frequenze dei genotipi dei cinque polimorfismi indagati sono mostrate in tabella.

Tabella . Genotipi e frequenze alleliche dei polimorfismi XRCC1, XRCC3, RAD 51 e GSTP1 in pazienti con SCCHN (n=101).

SNP	Genotipi	No.	Alleli	No.
XRCC11 28152 G>A	GG	43 (42,6%)	G	0.61
	GA	38 (37,6%)		
	AA	20 (19,8%)	A	0.39*
XRCC3 18067 C>T	CC	31 (30,7%)	C	0.52
	CT	43 (42,6%)		
	TT	27 (26,7%)	T	0.48*
RAD51 c.-3429 G>C	GG	82 (81,2%)	G	0.89
	GC	16 (15,8%)		
	CC	3 (3%)	C	0.11*
RAD51 c.-3392 G>T	GG	33 (32,7%)	G	0.56
	GT	48 (47,5%)		
	TT	20 (19,8%)	T	0.44*
GSTP1 313 A>G	AA	59 (58,4%)	A	0.75
	AG	32 (31,7%)		
	GG	10 (9,9%)	G	0.25*
Abbreviazioni: SNP, single-nucleotide polymorphism. * Frequencies of variant alleles.				

Tabella 4. Frequenza delle varianti alleliche dei geni oggetto dell'analisi.

Tutti i genotipi erano in equilibrio con la legge di Herdy-Weinberg. La frequenza delle varianti alleliche era 0.39 (XRCC1 c.1196 A>G p.Gln399Arg), 0.48 (XRCC3 c.722 C>T p.Thr241Met), 0.25 (GSTP1 c.313 A>G p.Ile105Val), 0.11 (RAD51 c.-3429 G>C) and 0.44 (RAD51 c.-3392 G>T) concordanti con i report precedentemente riportati inerenti alla popolazione caucasica (30).

7.6.2 Associazione tra la variante di *XRCC1* e la comparsa di mucosite acuta

In base alla elaborazione statistica effettuata è stato possibile evidenziare che l'allele XRCC1-399Gln era significativamente associato con i più alti gradi di mucosite ($p=0.011$; $OR=3.01$; $CI=1.27-7.11$).

SNPs/genotypes	All patients (radiotherapy and chemotherapy)				Patients treated with radiotherapy alone				
	Mucositis grade		p	OR	Mucositis grade		p	OR	
	<2	≥2			<2	≥2			
XRCC1 c.1196 A > G	GG	20	23	0.011	0.33	15	7	0.025	0.25
	AG	7	31	0.018	3.11	6	11	0.098	2.83
	AA	6	14	0.776	1.17	2	4	0.311	2.33
XRCC3 c.722 C > T	AA + AG	13	45	0.011	3.01	8	15	0.025	4.02
	CC	12	19	0.389	0.68	10	6	0.256	0.49
	CT	12	31	0.379	1.47	6	11	0.098	2.83
RAD51 c.-3429 G > C	TT	9	18	0.932	0.96	7	5	0.559	0.67
	TT + CT	21	49	0.389	1.47	13	16	0.256	2.05
	GG	28	54	0.512	0.68	18	17	0.936	0.94
RAD51 c.-3392 G > T	GC	4	12	0.476	1.55	4	5	0.47	1.4
	CC	1	2	0.699	0.97	1	/	0.511	0.96
	CC + GC	5	14	0.512	1.45	5	5	0.609	1.06
GSTP1 c.313 A > G	GG	7	26	0.087	2.3	6	7	0.672	1.32
	GT	19	29	0.159	0.55	13	13	0.862	1.11
	TT	7	13	0.804	0.88	4	2	0.354	0.47
GSTP1 c.313 A > G	TT + GT	26	42	0.087	0.43	17	15	0.672	0.76
	AA	20	39	0.756	0.87	14	13	0.903	0.93
	AG	9	23	0.507	1.36	7	6	0.815	0.86
	GG	4	6	0.603	0.7	2	3	0.478	1.66
	GG + AG	13	29	0.756	1.14	9	9	0.903	1.08

Tabella 5. Associazione tra i polimorfismi di XRCC1, XRCC3, RAD51 e GSTP1 con la frequenza di distribuzione dei casi di mucosite dopo radioterapia in pazienti con carcinoma squamoso del distretto testa collo.

Il valore medio di BED non era significativamente differente tra pazienti con grado maggiore o minore di mucosite, suggerendo che la differente severità di tossicità in questo gruppo non era legata al BED. Pazienti che avevano ricevuto CT in addizione alla radioterapia mostravano più alti livelli di mucosite comparati con soggetti trattati con la sola radioterapia ($p=0.001$). Sulla base di questo, questo parametro era considerato nelle ulteriori analisi. L'associazione statisticamente significativa tra l'allele

XRCC1-399Gln e gli alti score di mucosite erano confermati anche nei sottogruppi di pazienti trattati con la radioterapia da sola.($p=0.025$, OR=4.02, CI=1.16-13.90).

Come mostrato in Fig.30 e 31, il rischio di mucosite era significativamente incrementato nei pazienti con il genotipo XRCC1-399Gln sia nei pazienti trattati con radioterapia da sola ($p=0.049$, HR=2.50, CI=0.97-6.47) sia in quelli trattati con chemio e radioterapia combinate ($p=0.035$, HR=1.72, CI=1.03-2.86).

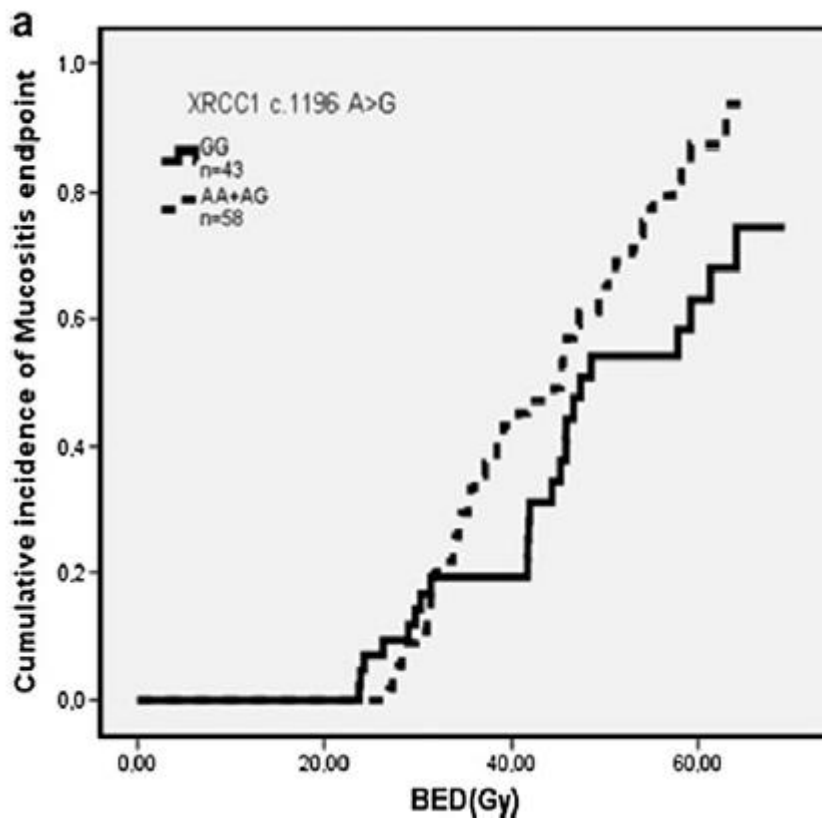


Figura 30. Incidenza cumulativa di mucosite acuta (CTCAE score ≥ 2) dopo radioterapia tra i portatori del genotipo wild-type (G/G) e le varianti (G/A o A/A), polimorfismo genetico XRCC1 c.1196A>G p.Gln399Arg (p log rank

= 0.035). Pazienti SCCHN trattati con radioterapia da sola (n=101). BED= dose di radiazione biologica effettiva.

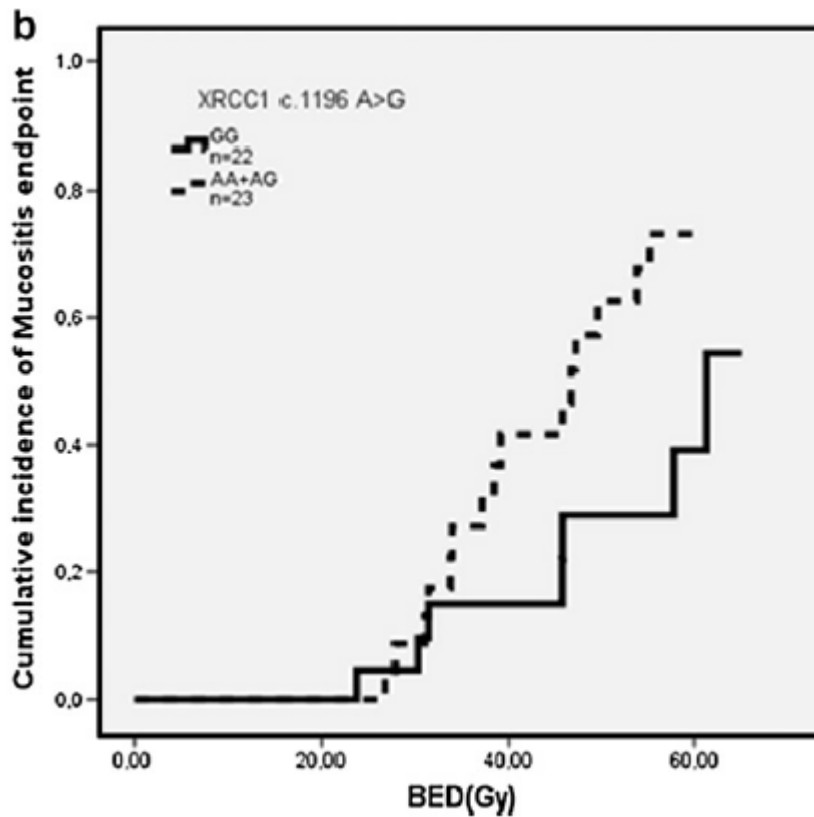


Figura 31. Incidenza cumulativa di mucosite acuta (CTCAE score ≥ 2) dopo radioterapia tra i portatori del genotipo wild-type (G/G) e le varianti (G/A o A/A), polimorfismo genetico XRCC1 c.1196A>G p.Gln399Arg (p log rank = 0.049). pazienti SCCHN trattati con radioterapia da sola (n=45). BED= dose di radiazione biologica effettiva.

I pazienti che sono stati sottoposti a chemio-radioterapia hanno evidenziato un significativo aumento di eritema cutaneo di grado ≥ 2 comparato con soggetti trattati con radioterapia in monoterapia (p=0.027). In base a questo

risultato, questo parametro era considerato nelle successive analisi. L'allele XRCC1-399Gln era associato ad un'aumentata tossicità cutanea in pazienti trattati con chemio-radioterapia, ma questo dato non era statisticamente significativo ($p=0.057$, $OR=2.25$, $CI=0.97-5.23$). Peraltro il trend non era confermato in pazienti trattati con la sola radioterapia ($p=0.208$).

Table 2

Association of XRCC1, XRCC3, RAD51 and GSTP1 polymorphisms with frequency distribution of skin erythema after radiotherapy in SCCHN patients.

SNPs/genotypes	All patients (radiotherapy and chemotherapy)				Patients treated with radiotherapy alone				
	Erythema grade		p	OR	Erythema grade		p	OR	
	<2	≥2			<2	≥2			
XRCC1 c.1196 A > G	GG	31	12	0.057	0.44	18	4	0.208	0.42
	AG	20	18	0.160	1.80	12	5	0.746	1.25
	AA	11	9	0.512	1.39	3	3	0.183	3.33
	AA + AG	31	27	0.057	2.25	15	8	0.208	2.4
XRCC3 c.722 C > T	CC	21	10	0.383	0.67	13	3	0.300	0.51
	CT	26	17	0.870	1.07	12	5	0.746	1.25
	TT	15	12	0.467	1.39	8	4	0.542	1.56
	TT + CT	41	29	0.383	1.48	20	9	0.372	1.95
RAD51 c.-3429 G > C	GG	49	33	0.485	1.46	26	9	0.787	0.81
	GC	11	5	0.510	0.68	6	3	0.450	1.5
	CC	2	1	0.669	0.79	1	/	0.733	0.97
	CC + GC	13	6	0.485	0.68	7	3	0.539	1.24
RAD51 c.-3392 G > T	GG	20	13	0.911	1.05	10	3	0.520	0.77
	GT	31	17	0.530	0.77	20	6	0.524	0.65
	TT	11	9	0.512	1.39	3	3	0.183	3.33
	TT + GT	42	26	0.911	0.95	23	9	0.729	1.1
GSTP1 c.313 A > G	AA	39	20	0.249	0.62	20	7	0.891	0.91
	AG	16	16	0.109	2.00	9	4	0.48	1.3
	GG	7	3	0.411	0.65	4	1	0.596	0.66
	GG + AG	23	19	0.249	1.61	13	5	0.891	1.3

Tabella 6. Associazione tra i polimorfismi di XRCC1, XRCC3, RAD51 e GSTP1 con la frequenza di distribuzione dei casi di eritema cutaneo dopo radioterapia in pazienti con carcinoma squamoso del distretto testa collo.

7.6.3 Associazione tra la variante di *RAD51* e la comparsa di disfagia acuta

Il rischio di elevati livelli di disfagia era significativamente aumentato nei pazienti con genotipo RAD51 -3429 CC/CG ($p=0.031$, $OR=3.83$, $CI=1.06-13.79$).

SNPs/genotypes		Dysphagia			
		Grade		<i>p</i>	OR
		<2	≥2		
XRCC1 c.1196 A > G	GG	39	4	0.490	0.64
	AG	33	5	0.758	1.21
	AA	17	3	0.630	1.41
	AA + AG	50	8	0.490	1.56
XRCC3 c.722 C > T	CC	28	3	0.649	0.73
	CT	36	7	0.240	2.06
	TT	25	2	0.401	0.51
	TT + CT	61	9	0.649	1.38
RAD51 c.-3429 G > C	GG	75	7	0.031	0.26
	GC	12	4	0.077	3.21
	CC	2	1	0.244	3.95
	CC + GC	14	5	0.031	3.83
RAD51 c.-3392 G > T	GG	31	2	0.208	0.37
	GT	42	6	0.855	1.12
	TT	16	4	0.210	2.28
	TT + GT	58	10	0.208	2.67
GSTP1 c.313 A > G	AA	52	7	0.995	0.99
	AG	27	5	0.428	1.64
	GG	10	/	0.221	0.88
	GG + AG	37	5	0.995	1.00

Tabella 7. Associazione tra i polimorfismi di XRCC1, XRCC3, RAD51 e GSTP1 con la frequenza di distribuzione dei casi di disfagia dopo radioterapia in pazienti con carcinoma squamoso del distretto testa collo.

Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative per quanto riguarda i valori medi di BED tra pazienti con differente grado di disfagia. Sempre riguardo alla disfagia, non c'erano evidenze di

significatività tra pazienti con sola radioterapia e pazienti con chemio-radioterapia per cui questo dato non veniva implementato nelle analisi successive. Come mostrato nella figura seguente, i genotipi RAD51 -3429 CC/CG era associato ad altri gradi di disfagia ($p=0.011$, HR=4.00, CI=1.27-12.65).

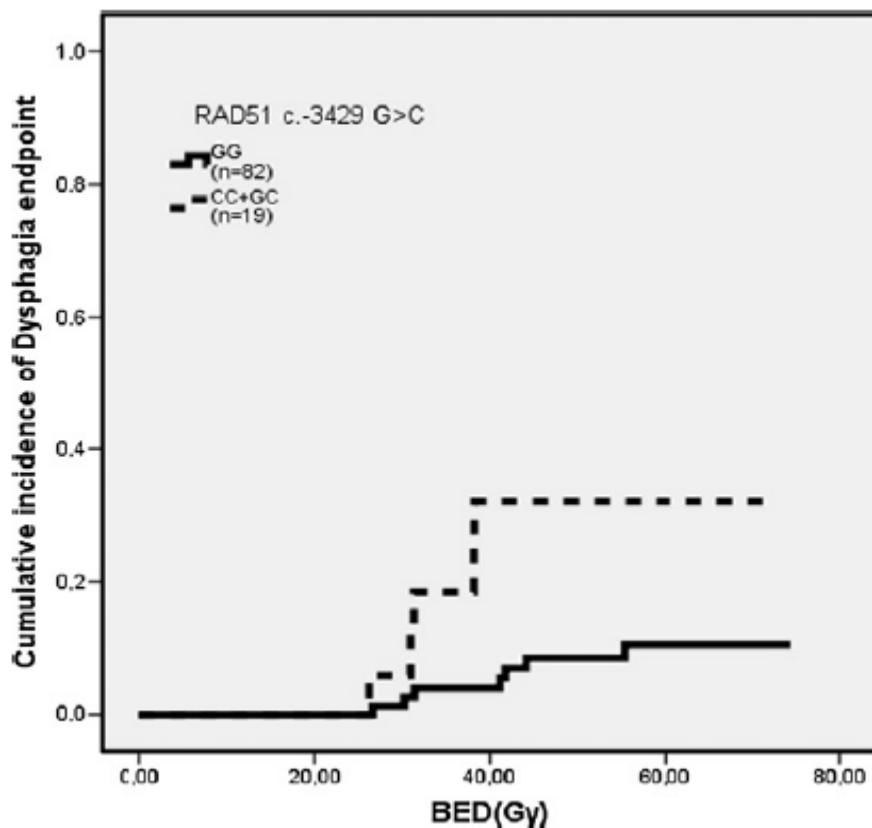


Figura 32. Incidenza cumulativa di disfagia acuta (CTCAE score ≥ 2) dopo radioterapia tra i portatori del genotipo wild-type (G/G) e le varianti (G/C o C/C), polimorfismo genetico RAD61 c.-3429 G>C (p log rank = 0.011). pazienti SCCHN trattati con radioterapia da sola e chemio-radioterapia (n=101). BED= dose di radiazione biologica effettiva.

7.6.4 Associazione tra lo status genotipico XRCC1 c.1196A>G/RAD51 c.-3429

G>C e lo sviluppo di effetti collaterali radio-indotti

Abbiamo infine valutato la possibile correlazione tra lo status genotipico XRCC1 c.1196A>G/RAD51 c.-3429 G>C e lo sviluppo di tossicità acuta radio-indotte. Tutti i pazienti SCCHN erano suddivisi in base alla tossicità ≥ 2 indipendentemente dallo specifico effetto considerato. Pazienti trattati con chemioterapia in combinazione con radioterapia mostravano un'aumentata tossicità rispetto ai pazienti trattati con la sola radioterapia per cui questo dato veniva considerato nelle successive analisi. L'associazione tra alto grado di tossicità e la presenza di almeno uno o di entrambi i polimorfismi nello status genotipico XRCC1 c.1196A>G/RAD51 c.-3429 G>C era dimostrata nella nostra casistica ($p=0.001$, OR=4.77, CI=1.77-12.84) ed era debolmente confermata anche nei pazienti trattati con radioterapia da sola ($p=0.079$, HR=3.02, CI=0.86-10.52). Nessuna differenza statisticamente significativa era individuata riguardo ai valori medi di BED.

Anche l'analisi Kaplan-Meier e l'analisi Cox erano in grado di confermare la significatività dell'associazione tra questo status genotipico ed elevati livelli di tossicità acuta radio-indotta ($p=0.04$, HR=2.03, CI=1.23-3.34; $p=0.011$, HR=2.96, CI=1.22-7.15).

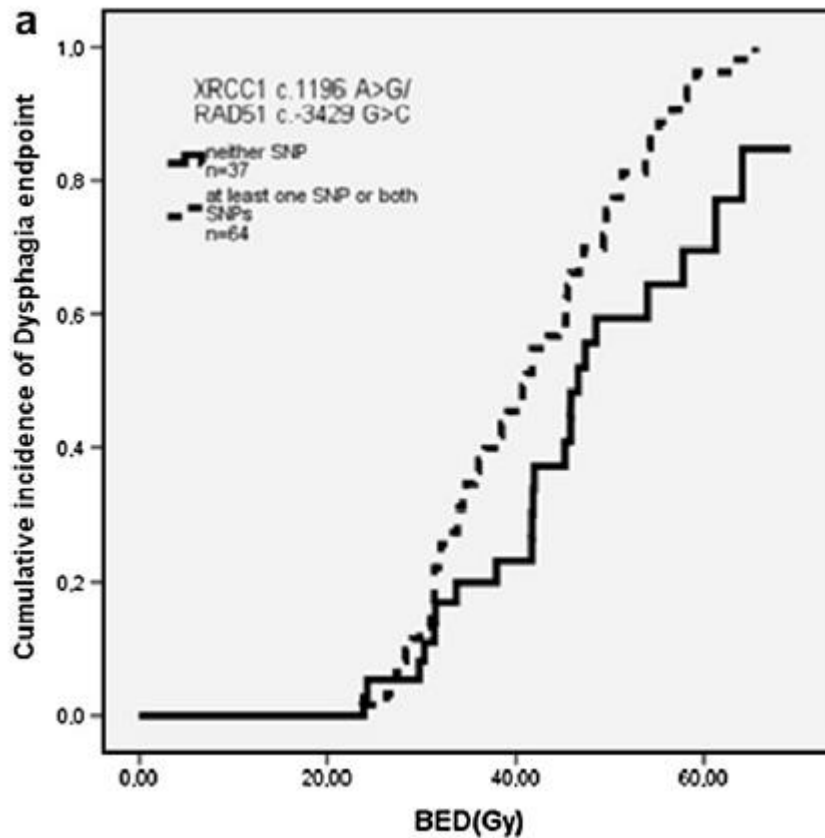


Figura 33. Incidenza cumulativa di tossicità acuta (CTCAE score ≥ 2) dopo radioterapia tra i portatori di nessun polimorfismo e i portatori di almeno una variante polimorfica, status genotipico XRCC1c.1196A>G/ RAD61 c.-3429 G>C (p log rank = 0.004). Pazienti SCCHN trattati con radioterapia da sola e chemio-radioterapia (n=101). BED= dose di radiazione biologica effettiva.

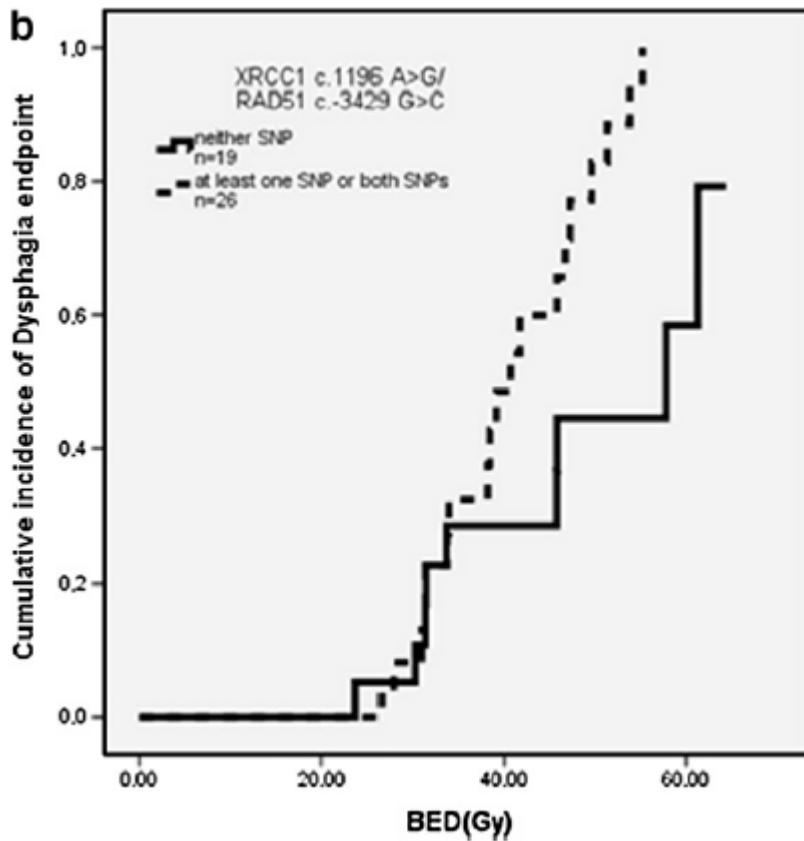


Figura 34. Incidenza cumulativa di tossicità acuta (CTCAE score ≥ 2) dopo radioterapia tra i portatori di nessun polimorfismo e i portatori di almeno una variante polimorfica, status genotipico XRCC1c.1196A>G/ RAD61 c.-3429 G>C (p log rank = 0.011). Pazienti SCCHN trattati con radioterapia da sola (n=45). BED= dose di radiazione biologica effettiva.

8 . CONCLUSIONI

In questo studio abbiamo valutato se specifici SNPs nei geni RAD51, XRCC1, XRCC3 e RAD51, collegati ai meccanismi di riparazione del DNA e di protezione cellulare contro lo stress ossidativo, potessero essere responsabili della variabilità biologica nella radiotossicità in 101 pazienti trattati con carcinoma squamoso del distretto testa-collo. Abbiamo pertanto considerato i livelli di tossicità ≥ 2 come indicatori di radiosensibilità clinica. Per minimizzare differenze dovute al frazionamento e al timing della radioterapia abbiamo considerato come parametro indicativo di tossicità il BED al momento della comparsa dell'effetto collaterale.

Le nostre scoperte evidenziano che pazienti SCCHN con genotipo AA/AG in XRCC1 c.1196 A>G hanno una più alta probabilità di sviluppare mucosite rispetto ai pazienti con genotipo G/G. L'analisi del BED al momento della comparsa dell'effetto collaterale mostra che pazienti con l'allele XRCC1-399Gln hanno mucositi più precocemente rispetto ai genotipi G/G. Questa associazione era confermata sia nel gruppo di pazienti trattati con la sola radioterapia, sia nel gruppo di pazienti trattati con chemioterapia in combinazione alla radioterapia, suggerendo che questa variante potrebbe avere un forte impatto nello sviluppo della radiosensibilità. La nostra ipotesi è che la presenza della suddetta variante

possa determinare ridotta capacità di riparazione del DNA, ciò comportando un'aumentata tossicità.

I nostri dati forniscono quindi evidenze che la variante RAD51 c.-3429 G>C potrebbe giocare un ruolo nell'incremento della disfagia che si sviluppa in seguito al trattamento con radioterapia. Pazienti con i genotipi CC/CG a livello del suddetto polimorfismo sperimentavano alti livelli di tossicità a dosi più basse rispetto ai pazienti con genotipo GG. Analogamente a quanto detto per il polimorfismo del gene XRCC1, noi ipotizziamo che la variante possa condurre ad una perdita di funzionalità nel processo di riparazione del DNA in questi pazienti e ad una incrementata tossicità evidenziabile con la presenza di grave disfagia.

In base alle nostre conoscenze, si tratta del primo studio che mette in evidenza nei pazienti con carcinoma squamoso del distretto testa-collo un'associazione tra la presenza della variante XRCC1-399Gln e lo sviluppo di mucosite acuta e tra la presenza del polimorfismo RAD51 c.-3429 G>C e lo sviluppo di gradi elevati di disfagia in seguito a trattamento radioterapico.

Di conseguenza differenti SNPs correlano con diverse categorie di tossicità acuta. Ciò sembra ragionevole dal momento che XRCC1 e RAD51 prendono parte a 2 differenti meccanismi di riparazione del DNA, il Base Excision Repair e l'Homologous Recombinational Process e quindi potrebbe essere responsabili per 2 distinte categorie di tossicità clinica.

In realtà dati controversi ancora permangono per quanto riguarda l'associazione tra SNPs e l'insorgenza di disfagia.

Come riportato nel lavoro di Werbrouck et al (), un'associazione tra lo sviluppo di questo effetto avverso della radioterapia e XRCC3 p.Thr241Met è stato evidenziato, ma il nostro lavoro sembra non confermare questo dato. Inoltre lo studio sopracitato sembra non confermare l'associazione tra la disfagia e i polimorfismi a livello di RAD51. Ulteriori studi su casistiche maggiori si rendono quindi necessari per tentare di chiarire questo punto critico.

In conclusione, il nostro studio mostra per la prima volta come la determinazione dello status genotipico XRCC1 c.1196A>G/RAD51 c.-3429 G>C potrebbe identificare 2 categorie di pazienti con differente capacità di tollerare il danno genotossico indotto dalle radiazioni ionizzanti. In particolare la presenza di almeno un polimorfismo o di entrambi le varianti polimorfiche potrebbe condurre ad un'aumentata tossicità radio-indotta rispetto ai pazienti in cui non è presente alcun SNPs (31). Numerosi studi hanno evidenziato la rilevanza funzionale degli SNPs oggetto di questo studio come marcatori di danno al DNA. Il nostro studio ribadisce il potenziale ruolo di questi SNPs nel determinare un rischio maggiore di sviluppo di radiotossicità. A causa della relativa esiguità della popolazione esaminata, le nostre scoperte richiedono un'ulteriore validazione in studi ulteriori. Tuttavia i nostri dati forniscono rilevanti informazioni sul valore degli SNPs in XRCC1 c.1196A>G e RAD51 c.-3429 G>C nei pazienti

SCCHN e potrebbero essere dei validi strumenti alla luce della personalizzazione della terapia in ambito tumorale.

9 . BIBLIOGRAFIA

1. BMJ.2004 July 3; 329(7456): 15-19.
2. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18820 patients. Department of Pharmacology and Therapeutics, University of Liverpool.
3. Redrawn from data in Vesell and Page, 1968.
4. Lazarou et al, JAMA 1998; 279: 1200-1205.
5. Eur J Nucl Med Mol. Imaging. 2005;32:351-68.
6. Toffoli et al., 2010.
7. Radiotherapy and Oncology, Potential clinical impact of normal tissue-intrinsic radiosensitivity testing.
8. Rybicky BA, Conti DV, Moreira A, Cicek M, Casey G, Witte JS. DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphism and risk of prostate cancer. Cancer Epidemiology Biomarkers Prev 2004.
9. Mutation Research 577 (2005) 275-283.
10. Dianzani I et al. Polymorphism in DNA repair genes as risk factors for asbestos-related malignant mesothelioma in a general population study. Mutation research. 599, 124-34, 2006.
11. DNA Repair 2 (2003) 901-908.
12. Carcinogenesis, vol.21 no.5 pp 965-971, 2000.
13. Cancer Epidemiology, Biomarker and Prevention, 2003.
14. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 6354-8.

15. Environ Health Persp 2003;1:1843-1850.
16. Human DNA repair genes, 2005.
17. Nucleic Acids Res.30, 1001-1008.
18. Eur J Nucl Med Mol Imaging 2005;32:351-368.
19. RAD51 135G>C modifies Breast Cancer Risk among BRCA2 mutation carriers:results from a combined analysis of 19 studies, The American Journal of Human Genetics, 2007.
20. Mannervik B et al., Biochem j., 1992.
21. Hayes et al. 2005 e ref. cit.
22. Krypuy M., Newnham GM, Thomas DM, Conron M, Dobrovic A. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non small cell lung cancer. BMC Cancer 2006, 6: 295.
23. Giglio S, Monis PT, Saint CP: Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in realtime multiplex PCR. Nucleic Acids Res 2003, 31(22):e136.
24. Fowler JF. IJROBP 1991, 21: 1451-6
25. Mangoni et al., Int J Radiation Oncology Biol Phys pp-1-7, 2010.
26. Collett D. Modelling survival data in Medical Research. U.S.A. CRC Boca Raton, 2003.
27. Clin Cancer Res 2005;11:4802-4809
28. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2006;15:1048-1050
29. Humana Press, Totowa, NJ 2000, 365-386
30. Prostate.2009 May 1;69 (6):662-88

31. Pratesi N. et al., *Radiotherapy and Oncology* 99 (2011) 356–361

10 . RINGRAZIAMENTI

Ringrazio tutte le persone della U.O. di Bichimica Clinica presso il dipartimento di fisiopatologia Clinica dell'Università degli Studi di Firenze, in particolare il prof. Mario Pazzagli e la Dott.ssa Lisa Simi per la preziosa attività di direzione e sostegno.

Un ringraziamento particolare va anche al Prof. Gianni Forti dell'U.O. di Endocrinologia dell'Università di Firenze per la sua costante disponibilità e alla Dott.ssa Monica Mangoni dell'U.O. di Radioterapia di Firenze per il valido contributo scientifico.

Un ringraziamento infine all'U.O. di Radioterapia, all'U.O. Oncologia Medica e all'U.O. di Ematologia di Brescia, e all'U.O. ASL di Prato per aver fornito i campioni oggetto di questo studio.