



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze del Farmaco

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: Scienze Farmacologiche

INDIRIZZO: Farmacologia molecolare e cellulare

CICLO XXVIII

***ANALISI DI BIOMARCATORI GENETICI PER PREDIRE LA
RISPOSTA IN PAZIENTI CON TUMORE AL RETTO E
ALL'ESOFAGO TRATTATI CON CHEMIORADIOTERAPIA
NEOADIUVANTE***

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Pietro Giusti

Supervisore: Ch.mo Prof. Pietro Giusti

Supervisori esterni: Prof. Roberto Padrini, Dott.ssa Milena Gusella

Dottoranda: Elisa Pezzolo

INDICE

RIASSUNTO.....	3
SUMMARY	8
INTRODUZIONE	12
I TUMORI GASTROINTESTINALI	12
IL TUMORE AL RETTO	13
Incidenza e mortalità	13
Fattori di rischio	13
Anatomia	14
Diagnosi, patologia e biologia molecolare.....	15
Stadiazione	16
Terapia	19
IL TUMORE ALL'ESOFAGO	21
Epidemiologia.....	21
Fisiopatologia e patogenesi	22
Valutazioni Cliniche e Diagnosi.....	25
Stadiazione	25
Trattamento.....	27
SCOPO DELLO STUDIO	29
MATERIALI E METODI.....	30
Pazienti	30
Estrazione DNA genomico da sangue periferico	32
Titolazione del DNA genomico.....	32
Analisi dei polimorfismi.....	33
Funzione dei polimorfismi	36
METABOLISMO DEI FOLATI.....	36
MECCANISMI DI RIPARAZIONE DEL DNA.....	39
MECCANISMO DI DETOSSIFICAZIONE	42
TRASPORTATORI DI EFFLUSSO DEL FARMACO.....	42
PCR-RFLP	43
dHPLC.....	46
Analisi statistiche.....	50
RISULTATI.....	53
Genotipizzazione.....	54
Associazioni genotipo-risposta patologica nei pazienti con tumore al retto ed esofageo	56
Associazioni genotipo-outcome nei pazienti con tumore all'esofago	58
DISCUSSIONE	65
CONCLUSIONI.....	71

RIASSUNTO

I tumori gastrointestinali (GI) si riferiscono a condizioni maligne che colpiscono esofago, stomaco, intestino, vescica, fegato e pancreas e vengono considerati complessivamente i tumori con maggiore grado di letalità a livello mondiale.

I tumori gastrointestinali rappresentano il 22% di tutti i tumori e la maggiore minaccia per la salute mondiale con il 12% delle morti annuali complessive correlate al tumore.

Negli ultimi anni, l'alto grado di incidenza dei tumori GI, in Europa ha stimato più di 250mila nuovi casi e 140mila morti. Sebbene l'incidenza dei tumori gastrointestinali sia diminuita nella parte occidentale del mondo dagli anni 40'-80', rimane in ogni caso un problema per la salute pubblica mondiale. In particolare, in Asia e in alcune parti del Sud America, i tumori gastrointestinali sono il tipo di neoplasie più diffuse e causa di morte.

Nonostante i progressi nella diagnosi dei tumori gastrointestinali, alcuni vengono individuati molto tardi a causa di sintomi poco evidenti o metodi di screening poco specifici. La maggior parte dei pazienti vengono diagnosticati all'ultimo stadio, pertanto perdono le opportunità di interventi medici precoci e circa il 20-45% di questi vanno incontro a resezione in seguito a ricaduta tumorale o sviluppo di metastasi a causa della natura altamente aggressiva dei tumori.

La natura aggressiva di questi tumori è correlata ad un elevato numero di anomalie tra cui l'inattivazione di alcuni geni oncosoppressori, l'attivazione di numerosi oncogeni, riattivazioni di telomerasi e anomalie in diversi fattori di crescita o altri recettori.

In particolare, il cancro al retto è considerato uno dei tumori più comunemente riscontrati in tutto il mondo. L'incidenza e l'indice di mortalità variano a seconda dell'area geografica.

Negli Stati Uniti si stimano più di 130mila nuovi casi e più di 50mila morti nell'ultimo anno.

Nell'Unione Europea, il tumore al retto rappresenta il 35% dei tumori colonrettali; l'incidenza è 15-25/100,000 all'anno e la mortalità è 4-10/100,000 all'anno.

Mentre il cancro all'esofago è la sesta tra le cause maggiori di mortalità correlate al tumore e l'ottavo tipo di tumore più diffuso a livello mondiale. Nel mondo 450.000 persone sono affette da tumore all'esofago e la sua incidenza è in aumento.

Il tumore all'esofago rappresenta la causa maggiore di morte per cancro nella popolazione maschile mondiale. La prognosi è relativamente sfavorevole con un tasso di sopravvivenza a 5 anni che varia dal 15% al 26% in base al tipo di trattamento; i risultati migliori si hanno con una diagnosi precoce della malattia durante gli stadi iniziali.

La resezione chirurgica e la radioterapia rappresentano la terapia curativa per gli stadi precoci di tumore al retto e all'esofago ma una percentuale significativa di pazienti viene classificata come tumore localmente avanzato. In questo gruppo di pazienti, il tumore cresce oltre le pareti del retto o esofago oppure è in grado di invadere gli organi o strutture vicine; in questo caso la chirurgia e la radioterapia sono inadeguate portando ad un maggior rischio di ricaduta locoregionale e sviluppo di metastasi.

Negli ultimi anni la combinazione di excisione chirurgica e terapia neoadiuvante prechirurgica è considerata come terapia gold standard per il tumore al retto ed esofageo localmente avanzato. Infatti in più della metà dei pazienti che vengono trattati con chemioterapia, tra cui 5-fluorouracile e/o

cisplatino, mostrano un significativo downstaging del tumore iniziale e una riduzione di recidive locali. L'altra metà dei pazienti non è in grado di rispondere in maniera efficace alla chemioterapia. Attualmente non esistono variabili in grado di predire la risposta alla chemioterapia. Esistono però numerose variazioni interindividuali in meccanismi importanti come la riparazione del DNA e il metabolismo dei folati, delle pirimidine e del cisplatino che possono influire sulla resistenza alla radio e chemioterapia. Alcuni polimorfismi di geni conosciuti essere coinvolti in questi pathway sono stati ampiamente descritti in letteratura e sono stati associati con l'outcome del trattamento antitumorale. Ad oggi però non esiste ancora un pannello di polimorfismi in grado di predire l'outcome terapeutico e la maggiorparte degli studi utilizza modelli statistici lineari per analizzare i dati ottenendo risultati inconsistenti. Anche per quanto riguarda l'analisi dei genotipi esistono molte divergenze, infatti la statistica lineare non è in grado di valutare l'epistasi ovvero le interazione che normalmente avvengono tra i geni a livello di due o più loci pertanto il fenotipo sarà differente se si considera l'espressione di un gene in maniera indipendente. Questo fenomeno molto frequente deve essere considerato qualora si intraprendano studi di farmacogenetica e la statistica lineare non è in grado di valutare questo aspetto. Il metodo Multifactor Dimensionality Reduction è stato progettato specificamente per identificare le interazioni tra variabili discrete che possono influenzare un outcome binario e attualmente viene sempre più utilizzato in studi di farmacogenetica in quanto il numero delle variabili che si vogliono analizzare è consistente. Questo metodo classifica i genotipi in "risposta" o "non risposta" in modo da ridurre la multidimensionalità dei dati in una sola dimensione, in questo modo è possibile individuare combinazioni genetiche che conferiscano un determinato grado di predittività della malattia.

Lo scopo di questo studio consiste nel valutare la correlazione tra alcuni polimorfismi in geni coinvolti nella riparazione del DNA, nel pathway di detossificazione e nel meccanismo di azione e metabolismo dei farmaci antitumorali con l'outcome clinico dei trattamenti radiochemioterapici concomitanti impiegati attualmente come standard in neoadiuvante per i pazienti affetti da tumore al retto e all'esofago.

Inoltre, si vuole valutare l'utilizzo di nuovi approcci statistici per individuare correlazioni genotipo-fenotipo.

In questo studio sono stati arruolati 70 pazienti con tumore rettale di stadio II e II, di cui 18 femmine e 52 maschi con età media di 62 anni. Tutti i pazienti sono stati trattati per 5 settimane con 300 mg/m²/die di 5-fluorouracile mediante infusione venosa e contemporaneamente con radiazioni 56 Gy, seguito da resezione chirurgica.

Le risposte a livello tumorale sono state direttamente valutate sui campioni chirurgici e ordinate secondo la classificazione TNM. I pazienti sono stati

considerati come responsivi (se pT0 ovvero in caso di completa scomparsa del tumore e pertanto risposta completa; pT1 o pT2 in caso di risposta parziale) o non responsivi (se pT3 e pT4)

Sono stati raccolti i campioni di sangue periferico dei pazienti arruolati e il DNA genomico è stato estratto da linfociti di sangue periferico mediante kit commerciale Wizard Genomic (Promega). Il DNA così ottenuto è stato utilizzato per l'analisi dei genotipi di ERCC1, XPD, XPA, XPC, XRCC1, XRCC3, UMPS, MTHFR677, MTHFR1298, TYMS 3'UTR and TYMS 5'VNTR mediante PCR-RFLP.

In particolare abbiamo analizzato i seguenti SNPs: XRCC1 Arg399Gln (rs25487), MTHFR 677 C>T (rs1801133), MTHFR 1298 A>C (rs1801131), TYMS 3'UTR 1494del6 (rs34489327), TYMS 5'UTR 28bp (rs34743033), TYMS 5'UTR G/C (rs2853542), XPC Lys939Gln A>C (rs2228001), XPD (ERCC2) A>C (rs121913019), ERCC1 C>T (rs121913027), XRCC3 Thre241Met G>A (rs861539), UMPS T>C (rs10049380).

La scelta dei polimorfismi da analizzare si è basata sulla ricerca degli stessi su dbSNP di NCBI in base alle frequenze genotipiche nella nostra popolazione.

I genotipi sono stati correlati con gli outcome del tumore dopo chemioradioterapia considerando sia la risposta completa ovvero T0 vs T1-4 sia quella maggiore ovvero T0-2 vs T3-4.

Per quanto riguarda il set di pazienti con tumore esofageo, sono stati arruolati 124 pazienti con tumore esofageo localmente avanzato e della giunzione gastroesofagea (GEJ) (T2-T4 con o senza linfonodi positivi) e trattati con CRT neoadiuvante. Tutti i pazienti hanno ricevuto settimanalmente docetaxel (35mg/m²) e cisplatino (25mg/m²), infusione protratta di fluorouracile (150mg/m²/die), radioterapia concomitante (50Gy) e successivamente intervento chirurgico radicale.

Sono stati raccolti i campioni di sangue periferico dei pazienti arruolati e il DNA genomico è stato estratto da linfociti di sangue periferico mediante kit commerciale Wizard Genomic (Promega). Il DNA così ottenuto è stato utilizzato per l'analisi PCR- RFLP dei seguenti polimorfismi dei geni coinvolti nella riparazione del DNA (XPA-rs1800975, XPC-rs2228000, XPC-rs2228001, XPD-rs13181, XRCC1-rs25487, XRCC3-rs861539, ERCC1-rs11615), nel meccanismo del farmaco (MTHFR-rs1801133, TYMS-rs34743033, UMPS-rs1801019) e nella detossificazione (MDR1-rs2032582, GSTP1-rs1138272).

Le risposte a livello tumorale sono state direttamente valutate sui campioni chirurgici e ordinate secondo la classificazione TNM. La risposta patologica completa (CR) è stata definita come assenza di tumore (ypT0N0); la risposta patologica quasi completa (nCR) è stata definita come presenza di microfoci di cellule tumorali nel sito primario con linfonodi negativi; i restanti pazienti sono stati classificati come non responsivi (NR). I pazienti CR ed nCR sono stati classificati invece come responsivi.

La cancer specific survival (CSS) è stata definita come il tempo tra la diagnosi e la morte causata dal tumore; il relapse free survival (RFS) è stato definito come il tempo tra l'inizio della terapia e la prima evidenza di ricaduta della malattia.

Le curve di sopravvivenza sono state calcolate con il metodo Kaplan-Meier e confrontate utilizzando il log rank test.

Le analisi statistiche sono state eseguite con il test chi quadro, regressione logistica e con il metodo Multifactor Dimensionality Reduction.

I pazienti con tumore al retto che hanno risposto alla radiochemioterapia a livello tumorale sono stati suddivisi nel seguente modo: pT0 (pazienti in cui la massa tumorale era completamente sparita) 25,7%, pT1-pT2 (pazienti in cui la massa tumorale si era notevolmente ridotta ma non scomparsa del tutto) 34,3% e pT3-4 (pazienti in cui la massa tumorale era rimasta invariata o quasi dopo trattamento con chemioradioterapia) 40%.

Pertanto poco meno della metà dei pazienti non hanno risposto al trattamento, in accordo con i dati di letteratura.

Le genotipizzazioni di tutti i pazienti sono state correlate con la risposta patologica. L'analisi statistica con il test chi quadro non ha mostrato nessuna

correlazione tra genotipi e risposta patologica. E' stato eseguito anche il test di regressione logistica e non sono state osservate correlazioni tra genotipo, età, sesso e risposta patologica.

Al contrario invece, utilizzando il metodo MDR abbiamo dimostrato una correlazione significativa tra la combinazione delle varianti genetiche XRCC1/MTHFR677 e la risposta maggiore ($p=0,0009$) che è stata correttamente predetta nel 77,8% dei pazienti.

Per quanto riguarda i pazienti con tumore esofageo, le analisi univariate mostrano che i genotipi MTHFR 677TT, MDR1 2677GT, GSTP1 114CC, XPC 499CC, e XPC 939AC+CC sono associati a un ridotto RFS con p value ≤ 0.1 e pertanto sono state definite come varianti ad alto rischio.

Un modello che include questi 5 polimorfismi ha discriminato tre sottogruppi numericamente simili, portatori di 0-2 ($n=48$), 3 ($n=38$) e 4-5 ($n=34$) genotipi ad alto rischio, per i quali è stato calcolato un RFS a 5 anni di 67.1%, 50% e 20.9% ($p=0.0002$) rispettivamente e un CSS a 5 anni di 71.1%, 55.8% e 25.8% ($p=0.0003$) rispettivamente.

Nel momento in cui il pannello di 5 SNPs è stato combinato con i dati istologici, le analisi hanno suddiviso i pazienti in due set principali con RFS a 5 anni dal 61% al 75% e dal 22% al 36%. In particolare, RFS a 5 anni era differente nel gruppo di pazienti con 3 varianti ad alto rischio e in accordo con l'istologia: 61% nei pazienti con tumore squamoso e 36% nei pazienti con adenocarcinoma ($p=0.06$). Globalmente, due classi di rischio potrebbero essere ottenute con i seguenti valori di RFS e CSS a 5 anni 65% vs 27% (HR 3.0, 95% CI 2.0-6.0, $p<0.0001$ e 69% vs 31% (HR 2.9, 95%CI 1.8-5.7, $p<0.0001$).

La combinazione di risposta patologica con in pannello di 5 SNPs ha permesso la redistribuzione di tutti i gruppi nelle due classi di rischio maggiormente informative: alto rischio (47.5% dei pazienti, inclusi tutti i NRs e nCRs con 3-5 genotipi sfavorevoli) e basso rischio (52.5% dei pazienti, inclusi tutti i CRs e nCRs con 0-2 genotipi sfavorevoli). Questi due gruppi hanno outcome statisticamente differenti: PFS a 5 anni 79.4% vs 17.7% (HR 6.71, 95% CI 3.98-12, $p<0.0001$) e CSS a 5 anni 79.3% vs 26.3% (HR 6.25, 95%CI 3.6-11.5, $p<0.0001$).

La procedura di validazione interna mediante MDR ha confermato i nostri modelli come buoni predittori.

Infine, oltre al pannello sono stati valutati i singoli polimorfismi in associazione con la risposta patologica per entrambi i set di pazienti, tumore all'esaofago e al retto, mediante analisi univariata. Il polimorfismo

XPC Lys939Gln è stato significativamente associato alla risposta patologica: I pazienti con il genotipo wild type nell'84.1% dei casi hanno raggiunto una risposta patologica completa o maggiore rispetto al 52.6% e 40% dei pazienti eterozigoti o Gln omozigoti ($p=0.0006$). Nessun'altra associazione significativa è stata trovata con gli altri SNPs. Per quanto riguarda invece il set di pazienti con tumore al retto, a conferma di quanto detto sopra, le analisi univariate non hanno rilevato nessuna relazione statistica significativa tra la risposta patologica e gli SNPs, nemmeno con XPC Lys939Gln, predittivo di risposta invece nelle neoplasie esofagee; in questo caso il polimorfismo non era associato ad una significativa riduzione della massa tumorale nelle forme rettali ($p=0.37$).

In conclusione, i nostri dati hanno dimostrato il ruolo di un pannello a 4/5 SNPs nel predire PFS e CSS in pazienti che hanno ricevuto lo stesso protocollo di terapia neoadiuvante chemioterapico. I polimorfismi di XPC, MDR1, GSTP1 e MTHFR meritano ulteriori valutazioni per guidare meglio le decisioni terapeutiche in pazienti con queste caratteristiche.

Il polimorfismo XPC 939 è associato alla risposta patologica nei pazienti con tumore all'esofago ma non nei pazienti con tumore al retto.

Inoltre, i nostri risultati ci permettono di affermare che l'epistasi dovrebbe essere sempre considerata nel momento in cui si analizzano associazioni farmacogenetiche.

Il Multifactor Dimensionality Reduction è un metodo semplice e molto valido per individuare le combinazioni genetiche in grado di identificare quei pazienti con tumore al retto con un alta probabilità di rispondere in maniera soddisfacente alla chemioradioterapia.

SUMMARY

Gastrointestinal (GI) tumors refers to malignant conditions afflicting esophagus, stomach, intestine, bladder, liver and pancreas. These kinds of neoplasms are considered overall the most lethal in the world.

Gastrointestinal tumors represents 22% of total cancers and the major danger for world health with 12% of total annual deaths.

In the last years, in Europe the high rate of GI tumors, evaluated more than 250.000 new cases and 140.000 deaths.

Even though the incidence of GI tumors is decreasing in the western area of the world, these neoplasms actually remain a serious issue for worldwide public health. In particular in Asia and in some areas of South America, GI tumors are the most common cancers and represent the main cause of death. Although diagnosis improvements, many times GI tumors are identified too late due to unclear symptoms or uncertain screening method. In most cases, GI tumor patients are diagnosed at the late stage, therefore they lose the opportunity to take advantage of early clinical intervention and about 20-45% of them are surgically resected after tumor relapse or metastasis development.

The aggressive character of GI tumors is related to a high number of anomalies among which oncogenes and telomerase activation, oncosuppressor genes inactivation and many anomalies in growth factors and receptors.

In particular, rectal cancer is one of the most common tumor worldwide. Incidence and mortality rate change depending on geographic areas. In the United States, more than 130.000 new cases and more than 50.000 death every years are evaluated.

In the European Union, rectal cancer represents more than 35% of total colorectal neoplasms; the incidence is 15-25/100.000 every year. Esophageal cancer is the sixth major cause of mortality correlated to the tumor and the eighth more common tumor type worldwide. In the world 450.000 individuals are afflicted by esophageal tumor and its incidence is increasing. Esophageal cancer represents the most common cause of cancer death in the world male population. The prognosis is moderately unfavourable with a 5 years survival rate varying between 15% to 26% according to the treatment type; best results

can be obtained with an early diagnosis during the early stages.

Surgical resection and radiotherapy represent the main curative treatments in early stages of both esophageal and rectal cancers but a considerable percentage of patients is classified as locally advanced tumor. In this group of patients, the tumor grows beyond rectal or esophageal epithelium or can invade surrounding organs and structures; in these cases surgery and radiotherapy are not sufficient leading to a major risk of locoregional recurrence and metastasis development.

In the last years, surgical excision combined with neoadjuvant therapy are considered the gold standard treatment for locally advanced rectal and esophageal cancer. Effectively, more than half of patients treated with neoadjuvant 5-Fluorouracil and/or cisplatin -based chemoradiotherapy (CRT) for locally advanced rectal and esophageal carcinomas has shown to be effective to downstage more than half preoperative treated patients.

Other half patients is not able to be effective responders to chemotherapy.

Up to date no variables are known to be strong predictive of response. Interindividual variations in DNA repair and metabolism of pyrimidine nucleotides, folates and cisplatin may be important mechanisms for resistance to radio and chemotherapy. Common gene polymorphisms in these pathways have been well described and their associations with anticancer-treatment outcome have been widely investigated using statistical linear models, with inconsistent results.

Epistasis is the naturally occurring interaction between genes at two or more loci so that the phenotype differs from what expected if the genes were expressed independently. It's a frequent phenomenon, that linear statistics cannot reveal and it should be considered in pharmacogenetic studies.

The Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) method was designed specifically to identify interactions among discrete variables that influence a binary outcome and is increasingly used in pharmacogenetics. This method classifies genotypes in "responders" or "non responders" in order to reduce the multidimensionality of data in only one dimension; so we can identify genetic combinations conferring disease prediction.

The aim of the present study was to correlate some polymorphisms of genes involved in DNA repair systems, detoxification pathway and antitumoral drug mechanisms of action and metabolism with clinical outcome of concomitant chemoradiotherapy actually used as standard neoadjuvant for rectal and esophageal cancer patients.

Furthermore, we want to evaluate the use of new approaches to identify genotype-phenotype correlations.

In this study, 70 patients with stage II and III rectal cancer were enrolled, 18 females and 52 males, mean age 62 years old. They were treated with 5 weeks of 300 mg/m²/die 5 fluorouracil protracted venous infusion concurrent to 56 Gy radiation followed by surgical resection. Responses at tumor level were directly evaluated on surgical specimens and scored according to TNM classification. Patients were considered as responders (if T0, complete response; if T1 or T2, partial response) or non responders (if T3 and T4). Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes and ERCC1, XPD, XPA, XRCC1, XRCC3, UMPS, MTHFR677, MTHFR1298, TYMS 3'UTR and TYMS 5'VNTR genotypes were analyzed by PCR-RFLP and dHPLC.

In particular, the following SNPs were analyzed: XRCC1 Arg399Gln (rs25487),

MTHFR 677 C>T (rs1801133), MTHFR 1298 A>C (rs1801131), TYMS 3'UTR 1494del6 (rs34489327), TYMS 5'UTR 28bp (rs34743033), TYMS 5'UTR G/C (rs2853542), XPC Lys939Gln A>C (rs2228001), XPD (ERCC2) A>C (rs121913019), ERCC1 C>T (rs121913027), XRCC3 Thr241Met G>A (rs861539), UMPS T>C (rs10049380).

Polymorphisms were selected according to genotypic frequencies of our population and considered only if minor variant frequency was at least 10% in the Caucasian population. Genotypes were correlated with tumor outcomes to CRT considering both complete (T0 vs T1-4) and major (T0-2 vs T3-4) responses.

About the second set of samples, 124 mid/low locally advanced esophageal GEJ tumors patients (T2-T4 with or without positive lymph nodes) and treated with neoadjuvant CRT were enrolled. All patients received weekly docetaxel (35 mg/m²) and cisplatin (25mg/m²), protracted venous infusion of fluorouracil (150 mg/m²/die) and concomitant radiotherapy (50 Gy).

Radical surgery was performed 6-8 weeks after treatment was completed. DNA was extracted from peripheral leukocytes using a commercial kit (Wizard Genomic, Promega). Polymorphisms in genes of the DNA repair systems (*XPA*-rs1800975, *XPC*-rs2228000, *XPC*-rs2228001, *XPD*-rs13181, *XRCC1*-rs25487, *XRCC3*-rs861539, *ERCC1*-rs11615), drug pathways (*MTHFR*-rs1801133, *TYMS*-rs34743033, *UMPS*-rs1801019) and detoxification (*MDR1*-rs2032582, *GSTP1*-rs11338272) were characterized through RLFP-PCR and dHPLC analysis.

Tumor responses were directly evaluated on surgical specimens and organized according to TNM classification.

Pathological complete response (CR) was defined as the absence of residual tumor (ypT0N0); near pathological complete response (nCR) was defined as the presence of microfoci of cancer cells at the primary site with negative lymph nodes; the remaining patients were classified as non responders (NR). Responders were defined as patients having CR or nCR.

Cancer specific survival (CSS) was defined as the time between diagnosis and death from cancer; relapse-free survival (RFS) was defined as the time between initiation of therapy and the first evidence of disease recurrence. Survival curves were computed with the Kaplan-Meier method and compared using the log rank test.

Statistical analysis were performed using chi square test, logistic regression and Multifactor Dimensionality Reduction method.

Patients responded to CRT at tumor level as follows: pT0 (patients without tumor) in 25.7% , pT1-2 (patients with an important tumor reduction) in 34.3% and pT3-4 (patients without tumor reduction) in 40%.

So less than half of patients demonstrated to have any response from CRT, according to the literature. All genotype data were correlated to pathological response.

Chi square tests showed no significant correlation between genotyping and local pathological response. Also logistic regression was performed and no associations between genotype, sex, age and pathological response were revealed.

On the contrary, using the MDR method, we showed a significant correlation between the combination of *XRCC1*/*MTHFR*677 genetic variants and major response ($p=0,0009$) that was correctly predicted in 77.8% of patients.

About the esophageal cancer set of patients, univariate analysis showed that *MTHFR* 677TT, *MDR1* 2677GT, *GSTP1* 114CC, *XPC* 499CC and *XPC* 939AC+CC genotypes were associated to shorter RFS with a p value ≤ 0.1 and were defined as high risk variants.

A model including these five polymorphisms discriminated three numerically similar subgroups, carriers of 0-2 ($n= 48$), 3 ($n= 38$) or 4-5 ($n= 36$) high risk genotypes, for which 5-year RFS was 67.1%, 50.0% and 20.9% ($p= 0.0002$) and 5-year CSS was 71.1%, 55.8% and 25.8% ($p=0.0003$), respectively.

When the 5-SNP panel was combined with histology, the analysis split patients in two main subsets with 5-year RFS rates ranging from 61% to 75% and 22% to 36%. In particular, 5-year RFS was different in the subset with 3 high risk polymorphisms according to histology: 61% in squamous and 36% in adenocarcinoma patients ($p=0.06$). Globally, two class risk could be obtained with 5 years RFS and CSS rates of 65% vs 27% (HR 3.0, 95% CI 2.0-6.0,

$p < 0.0001$) and 69% vs 31% (HR 2.9, 95% CI 1.8-5.7, $p < 0.0001$), respectively. In the end, the combination of pathological response with the 5-SNP panel allowed the allocation of the whole series in two major informative risk classes: high (47.5% of patients, including all NRs and nCRs with 3-5 unfavourable genotypes) or low risk (52.5% of patients, including all CRs and nCRs with 0-2 unfavourable genotypes) class. The two final groups had statistically different outcomes: 5-year PFS rates were 79.4% vs 17.7% (HR 6.71, 95% CI : 3.98-12.0, $p < 0.0001$) and 5-year CSS rates were 79.3% vs 26.3% (HR 6.25, 95% CI : 3.6-11.5, $p < 0.0001$).

The internal validation procedure by MDR confirmed our models as good predictors.

Finally, important to underline, before establishing the SNPs panel, all the single polymorphisms were evaluated and associated to pathological response, both in rectal and in esophageal cancer patients through univariate analysis.

XPC Lys939Gln SNP was significantly associated with pathological response: pts carrying wild genotype presented complete or major response in 84.1% of cases, compared to 52.6% and 40% in heterozygotes and Gln homozygotes, respectively ($p = 0.0006$). No association was found with the other SNPs.

In contrast with these findings, in the set of rectal patients, as above mentioned, univariate analysis revealed any statistically significant association between pathological response and SNPs, not even with XPC Lys939Gln, predicting pathological response in esophageal neoplasms; in this sample set it was not related to a significant reduction of tumor mass in rectal cancers ($p = 0.37$).

In conclusion our data demonstrated the role of a panel of 4 genes/5 SNPs in predicting PFS and CSS in patients receiving the same intensive neoadjuvant chemoradiation protocol. Polymorphisms of XPC, MDR1, GSTP1 and MTHFR deserve further evaluation in order to guide therapeutic decisions in this setting of patients.

Another important aspect of these results is the predictive value in pathological response only in esophageal and not in rectal cancer patients.

Furthermore, our findings suggest that epistasis should be considered when analysing pharmacogenetic associations. The Multifactor Dimensionality Reduction is an easy and valid method to detect genetic combinations that can identify patients with a high probability of tumor response when chemoradiotherapy for colonrectal cancer is indicated.

INTRODUZIONE

I TUMORI GASTROINTESTINALI

I tumori gastrointestinal (GI) si riferiscono a condizioni maligne che colpiscono esofago, stomaco, intestino, vescica, fegato e pancreas e vengono considerati complessivamente i tumori con maggiore grado di letalità a livello mondiale. (1)

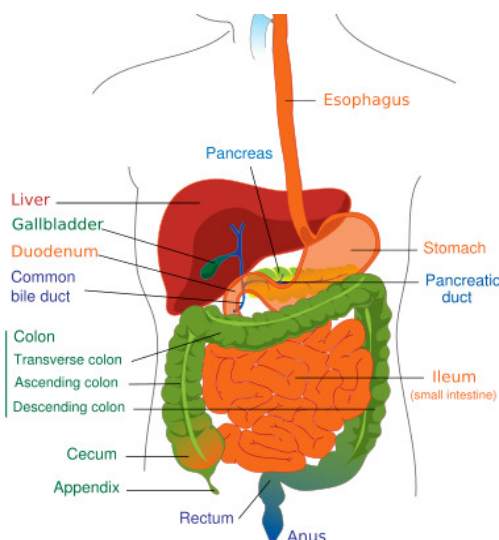


Fig. 1 Organi del tratto gastrointestinale che possono essere interessati da tumore

I tumori gastrointestinal rappresentano il 22% di tutti i tumori e la maggiore minaccia per la salute mondiale con il 12% delle morti annuali complessive correlate al tumore. (2,3)

Negli ultimi anni, l'alto grado di incidenza dei tumori GI, in Europa ha stimato più di 250mila nuovi casi e 140mila morti. (4)

Sebbene l'incidenza dei tumori gastrointestinal sia diminuita nella parte occidentale del mondo dagli anni 40'-80', rimane in ogni caso un problema per la salute pubblica mondiale. (5)

In particolare, in Asia e in alcune parti del Sud America, i tumori gastrointestinal sono il tipo di neoplasie più diffuse e causa di morte.

Nonostante i progressi nella diagnosi dei tumori gastrointestinal, alcuni vengono individuati molto tardi a causa di sintomi poco evidenti o metodi di screening poco specifici. (6)

La maggior parte dei pazienti vengono diagnosticati all'ultimo stadio, pertanto perdono le opportunità di interventi medici precoci e circa il 20-45% di questi vanno incontro a resezione in seguito a ricaduta tumorale o sviluppo di metastasi a causa della natura altamente aggressiva dei tumori. (7)

La natura aggressiva di questi tumori è correlata ad un elevato numero di anomalie tra cui l'inattivazione di alcuni geni oncosoppressori, l'attivazione di numerosi oncogeni, riattivazioni di telomerasi e anomalie in diversi fattori di crescita o altri recettori. (8-11)

IL TUMORE AL RETTO

Incidenza e mortalità

Il tumore al colon retto è una delle neoplasie più diffuse a livello mondiale. I tassi di incidenza e mortalità si differenziano in base alle aree geografiche. È stato stimato che solamente nell'ultimo anno negli Stati Uniti l'insorgenza sia più di 130mila nuovi casi (90mila cancro al colon e 40mila cancro al retto) con più di 50mila morti. (*WHO <http://www.who.int/research/en/> accessed in July 2014*)

Nell'Unione Europea il tumore al retto rappresenta il 35% di tutti i tumori colonrettali; l'incidenza è di 15-25/100.000 per anno e la mortalità è di 4-10/100,000 per anno. (12)



Fig. 2 In rosso i Paesi con un alto tasso di incidenza di tumore al retto

In Italia, il tumore al retto rappresenta il 32% di tutti i tumori colonrettali ed in particolare 55% di sesso maschile e 45% di sesso femminile. (*Rapporto AIRTUM 2014 - ICD-10 C19-20*).

Fattori di rischio

Il rischio di riscontrare la malattia aumenta con l'età. Mediamente la diagnosi di tumore al retto avviene intorno a 70 anni, più o meno in quasi in tutti i paesi europei.

La dieta rappresenta il secondo importante fattore di rischio, in particolare una massiccia assunzione di carni rosse e la carenza di fibre. Anche lo stile di vita è associato ad un aumentato rischio di malattia, in particolare il fumo di sigaretta e l'assunzione moderata o pesante di alcol. (13)

Più del 15% dei casi presenta invece una componente ereditaria, in particolare: storia familiare di tumori del colon o del retto; storia personale di tumori del colon, del retto, dell'ovaio, dell'endometrio (utero) o della mammella; storia di malattie infiammatorie croniche intestinali (rettocolite ulcerosa); alcune malattie ereditarie, quali la poliposi adenomatosa familiare e il cancro del colon da non poliposi ereditaria (sindrome di Lynch). (14)

Anatomia

Il retto comprende la porzione terminale dell'intestino crasso compresa tra il colon ileo-pelvico (o sigma) e l'ano. È così detto per la sua direzione più o meno rettilinea, termina in basso nel punto in cui il suo rivestimento mucoso si continua con il rivestimento cutaneo dell'ano (linea ano-rettale); superiormente è distinto dal colon pelvico da un limite convenzionale rappresentato dalla terminazione del rivestimento peritoneale e più precisamente del mesocolon sigmoideo.

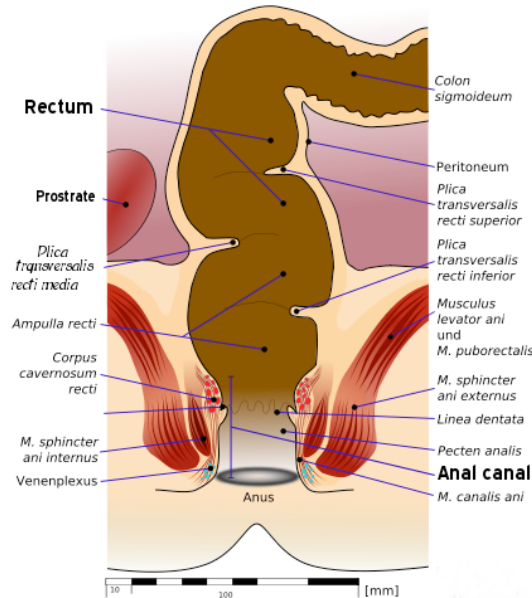


Fig. 3 Anatomia del retto

Il retto presenta una lunghezza di circa 12 cm. Il suo calibro non è uniforme, perché nella porzione media presenta una dilatazione, detta ampolla rettale, che può essere di notevoli dimensioni. La sua superficie esterna è liscia, ma spesso presenta sui lati da uno a 3 solchi trasversali, che a seconda dei casi si estendono alquanto nelle superfici anteriori e posteriori.

Clinicamente si può suddividere il retto in tre parti: il retto alto (prossimale), metà superiore dell'ampolla rettale, grossolanamente posto al disopra dello sfondato del Douglas che si estende da 6-8 cm a 15-19 cm dal margine anale, a seconda delle condizioni di misurazione; il retto basso (distale), metà inferiore dell'ampolla rettale, che termina al margine superiore degli elevatori dell'ano e che corrisponde al retto extra-peritoneale e che è esplorabile con il dito; il canale anale da 0 a 3-4 cm dal margine anale - sede anche dei tumori epidermoidali, di origine tegumentaria. ([National Cancer Institute at the National Institutes of Health-Rectal Cancer Treatment PDQ®](#)) Il retto è formato, come gli altri segmenti dell'intestino crasso, di una mucosa, di una sottomucosa, di una tunica muscolare e di una tunica sierosa, costituita da peritoneo e presente soltanto nella prima porzione del retto, di cui ricopre completamente la faccia anteriore e parzialmente le facce laterali per riflettersi sulla parete posteriore dell'addome.

Sul versante mucoso sono visibili tre valvole, costituite da pieghe della mucosa, della sottomucosa e dalla muscolatura circolare; esse sono: la valvola superiore, la valvola media e la valvola inferiore.

Nella parte più distale, il retto è circondato da tessuto fibro-adiposo detto mesoretto che rappresenta una continuazione del mesosigma. Nel mesoretto decorrono i vasi emorroidari superiori e medi; in tale struttura sono inoltre presenti vasi linfatici e linfonodi.

Diagnosi, patologia e biologia molecolare

La diagnosi di tumore al retto avviene dopo l'indagine biptica sigmoidoscopica per l'analisi istopatologica. I tumori con estensione superiore ai 15 cm dal margine anale vengono classificati rettali, mentre se prossimali vengono classificati come colonici. (12,14)

Oltre il 95% dei casi di tumore rettale sono classificati come adenocarcinomi in quanto insorti da adenoma.

La maggior parte degli adenocarcinomi rettali sono caratterizzati da instabilità cromosomica, mentre raramente da instabilità dei microsatelliti. Circa un terzo dei tumori al retto sono associati a metilazione del DNA aberrante. Esistono diversi pathways di centrale importanza nella carcinogenesi del tumore al retto, in particolare pare che il pathway molecolare WNT (Wingless ed INT1) sia il più importante. Le proteine WNT regolano un elevato numero di processi cellulari tra cui la determinazione del destino cellulare, la motilità, la formazione degli assi primari e l'organogenesi.

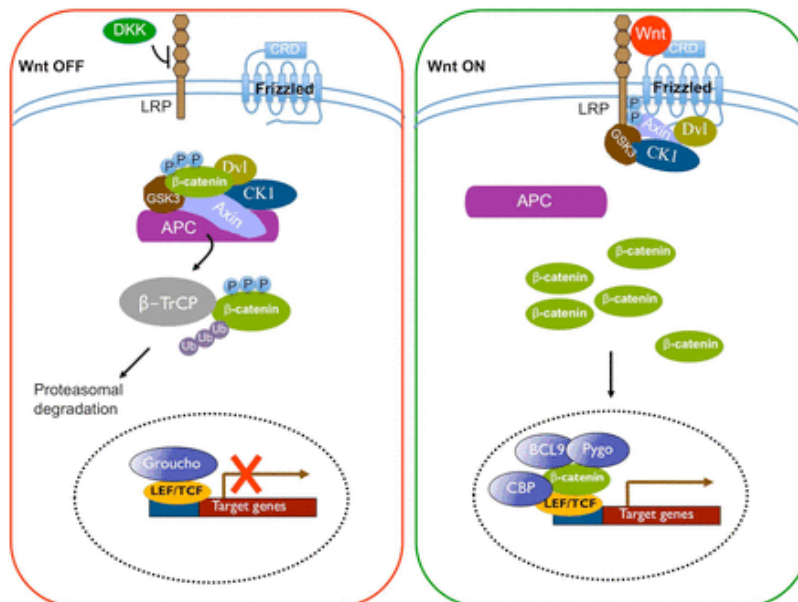


Fig. 4 WNT pathway

In particolare, nel pathway WNT, il gene oncopressore APC, risulta essere mutato con elevata frequenza. La principale funzione della APC è modulare i livelli citoplasmatici di β -catenina, proteina in grado di migrare nel nucleo e attivare complessi proteici di trascrizione di cMyc e ciclina D1. Tuttavia, la migrazione nucleare dei complessi di catenina è possibile se la sua concentrazione citoplasmatica è sufficientemente elevata. In condizioni *normali*, APC è legata a CK1 (caseina chinasi 1) e GSK3 (glicogeno sintasi 3 β -chinasi) (proteine citoplasmatiche); questo grande complesso enzimatico è in grado di fosforilare la β -catenina che, così *marcata*, viene ubiquitinata e destinata dunque alla degradazione attraverso il proteasoma. Se il fattore wnt si lega al suo complesso recettoriale, si ha inattivazione delle proprietà chinasiche correlate con l'APC, con accumulo di β -catenina che non viene destinata al proteasoma, provocando crescita cellulare incontrollata.

Ulteriori inattivazioni di geni oncopressori come P53, *TGF β* o attivazioni di oncogeni come KRAS, PI3CKA e BRAF sono piuttosto rare nel tumore al retto.

Per completare la diagnosi si eseguono esami del sangue, test sulle funzioni renali, monitoraggio dell'antigene carcinoembrionario, raggi x o in alternativa la tomografia, risonanza magnetica o endoscopia ad ultrasuoni.

L'endoscopia rettale a ultrasuoni è fondamentale per selezionare i pazienti che potranno essere sottoposti a trattamento preoperatorio mentre è fondamentale la colonscopia preoperatoria completa se il tumore è di tipo ostruttivo. (15,16)

Infine, l'analisi istopatologica consiste nell'ottenere un campione chirurgico che sia prossimale, distale e dei margini circonfenziali e almeno 12 linfonodi regionali. Lo stato del margine di resezione istopatologica è un parametro molto importante; ci sono infatti molte incertezze nella sua interpretazione e nella classificazione del residuo tumorale. (17)

Stadiazione

La classificazione del tumore avviene seguendo la stadiazione TNM (versione 7 del 2010).

Il sistema TNM è rappresentato in tabella 1 mentre i gruppi di stadiazione in tabella 2. (18)

Tabella 1: sistema TNM (vers. 7, 2010)

TNM	estensione
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : intraepiteliale o invasione della lamina propria
T1	Submucosa
T2	Muscularis propria
T3	Subsierosa/tessuto perirettale
	T3aa mm
	T3b 1–5 mm

TNM	estensione
	T3c 5–15 mm
	T3d 15+ mm
T4	Perforazione nel peritoneo viscerale o invasione di altri organi
N1	1–3 nodi regionali coinvolti
N1a	1 linfonodo
N1b	2–3 linfonodi
N1c	piccoli depositi nel grasso
N2	4 o più nodi regionali coinvolti
N2a	4–6 linfonodi
N2b	7 o o più linfonodi
M1	metastasi distanti
M1a	un organo distante o un set di linfonodi
M1b	più di un organo o peritoneo

Tabella 2: Gruppi di stadiazione

stadio	TNM
I	T1-2, N0, M0
IIA	T3, N0, M0
IIB	T4a, N0, M0
IIC	T4b, N0, M0
IIIA	T1-2, N1/N1c, M0
	T1, N2a, M0
IIIB	T3-T4a, N1/N1c, M0
	T2-T3, N2a, M0
	T1-2, N2b, M0
IIIC	T4a, N2a, M0
	T3-4a, N2b, M0
	T4b, N1-2, M0
IVA	T1-4, N1-2, M1a
IVB	T1-4, N1-2, M1b

Per praticità di individuazione, i tumori rettali sono stati suddivisi nel modo seguente:

- molto precoce (alcuni cT1),
- precoce (cT1 e alcuni cT3),
- intermedio (cT3 e alcuni cT4)
- localmente avanzato (cT3crm +, alcuni cT4a, tutti cT4b).

Altri fattori devono essere considerati in quanto importanti, come per esempio come la dimensione del tumore, la posizione interna, la vicinanza del tumore ad un linfonodo, la dimensione del mesoretto, lo stadio cN e l'invasione nervosa e vascolare. Attualmente non è possibile dare una definizione precisa di quali sottostadi T ed N appartengono questi gruppi.

I termini “favorevole”, “precoce”, “buono”, “intermedio”, “cattivo” o “localmente avanzato” possono essere utilizzati per categorizzare i tumori al retto in sottogruppi clinici. In molti studi pubblicati di recente, il termine “localmente avanzato” è stato comunemente utilizzato per il gruppo intermedio/sfavorevole anche se sarebbe più indicato per indicare i tumori avanzati come indicato nei documenti del consensus europeo. (19,20)

La stadiazione è importante per la scelta del trattamento più indicato. Il cancro del retto si classifica nei seguenti stadi:

- **stadio 0** (carcinoma in situ): la malattia è in fase iniziale, le cellule tumorali sono presenti solo nella mucosa più interna del retto;
- **stadio I** (Dukes A): le cellule tumorali si sono diffuse dallo strato più interno del retto fino al secondo-terzo strato, interessando anche la parete interna, ma non hanno raggiunto la parete esterna del retto, né ad altri organi;
- **stadio II** (Dukes B): le cellule tumorali si sono diffuse al tessuto circostante il retto, ma non hanno invaso i linfonodi;
- **stadio III** (Dukes C): le cellule tumorali hanno invaso i linfonodi, ma non altri organi;
- **stadio IV** (Dukes D): la malattia è molto avanzata e le cellule tumorali hanno raggiunto altri organi, per esempio fegato, polmoni e ovaio;
- **ricidiva**: il tumore si può ripresentare dopo il trattamento. La recidiva può svilupparsi nella stessa sede del tumore primitivo oppure in un altro organo (colon, pelvi, fegato o polmoni).

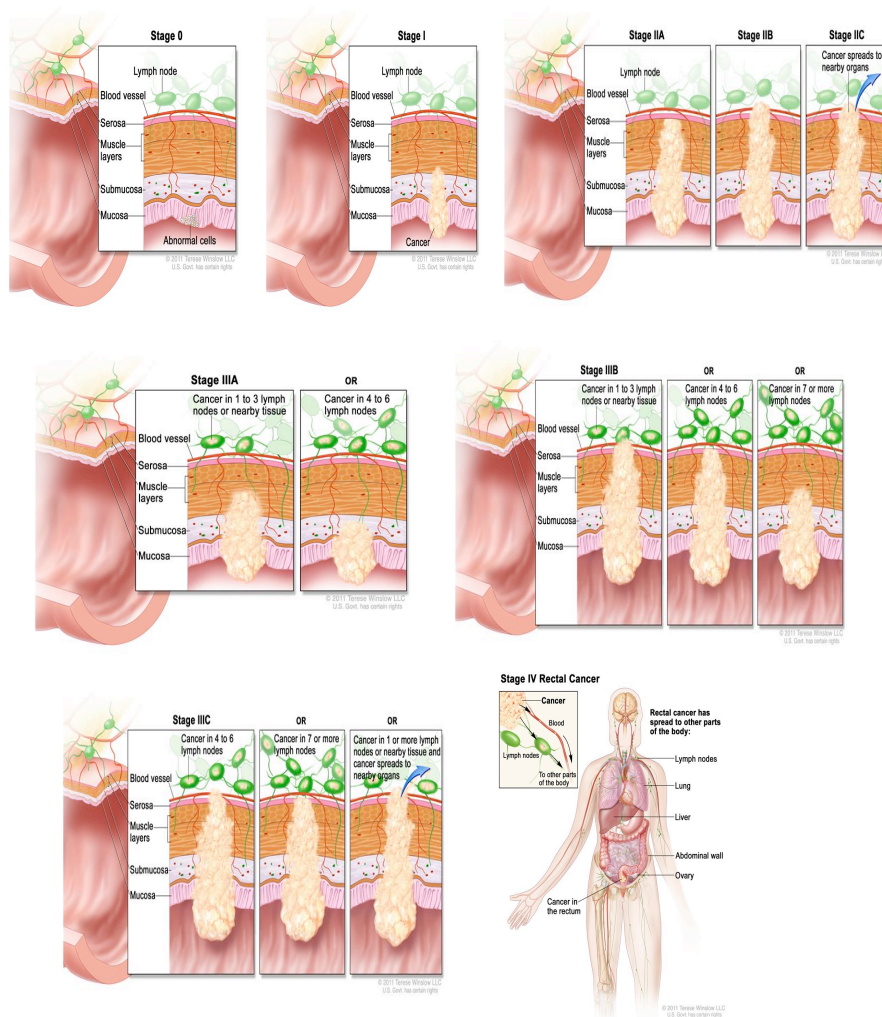


Fig. 5 Stadiazione del tumore al retto

Terapia

La chirurgia è di solito il trattamento principale per il tumore al retto. Molto spesso la chirurgia viene affiancata ad altri trattamenti come la radioterapia e la chemioterapia e spesso vengono somministrati prima (terapia neoadiuvante) e/o dopo l'intervento chirurgico (terapia adiuvante) per ridurre il rischio di ricaduta e metastasi.

La chirurgia può consistere in uno dei due seguenti tipi di intervento:

- **escissione locale:** se la malattia è in stadio molto precoce, il chirurgo può eseguire l'intervento in endoscopia, senza incidere la parete addominale, inserendo un tubo sottile nel retto attraverso l'ano. Se il tumore si presenta sotto forma di polipo si parla di polipectomia;
- **resezione intestinale:** è l'intervento di rimozione del tumore insieme ad un margine di tessuto sano circostante. Il chirurgo congiunge quindi i due

monconi sani di intestino (retto-retto; retto-colon o colon-ano) e di solito asporta anche alcuni linfonodi regionali per esaminarli al microscopio;

- **resezione e colostomia**: se il chirurgo non può congiungere i due monconi, deve eseguire una colostomia, ossia praticare un'apertura (stoma) nella parete addominale per consentire l'evacuazione delle feci in un apposito sacchetto. In alcuni casi la colostomia è provvisoria, ossia è lasciata in sede soltanto fino al ripristino dell'attività del retto; se, invece, il chirurgo deve necessariamente asportare tutto il retto, è permanente.

La combinazione di chemioterapia e radioterapia è il trattamento tipico ed esclusivo del cancro. La chemioterapia somministrata durante la radioterapia ha lo scopo di aumentare l'efficacia della radioterapia applicata sul retto e sul tessuto circostante. Il trattamento combinato chemio-radioterapico può essere somministrato prima o dopo la chirurgia (trattamento neoadiuvante e adiuvante, rispettivamente), ma nel primo caso è preferibile in quanto può essere più efficace e meno tossico.

Dopo il trattamento, il paziente è sottoposto a controlli periodici (analisi del sangue e altri esami) allo scopo di individuare tempestivamente un'eventuale ripresa della malattia.

La resezione chirurgica e la radioterapia sono efficaci per la cura dei primi stadi del tumore al retto ma una percentuale significativa di pazienti viene classificata come localmente avanzata. (21) In quest'ultimo gruppo il tumore cresce all'esterno della parete del retto oppure passa attraverso essa ed invade altri organi o strutture vicine: in questo caso la chirurgia e le radiazioni sono inadeguate e si ha un maggior rischio di ricaduta locoregionale e sviluppo di metastasi. (22)

Negli ultimi anni la resezione anteriore-bassa o adominoperineale e l'excisione totale mesorettale combinati con la terapia neoadiuvante pre chirurgica vengono considerati il gold standard terapeutico per il tumore al retto localmente avanzato. (23)

Il regime migliore per la terapia neoadiuvante nei pazienti in attesa della resezione chirurgica è ancora sconosciuto. Attualmente l'approccio standard più utilizzato in Europa e in America consiste in un lungo trattamento di radioterapia da 45 to 50.4 Gy somministrati in 25-28 frazioni in consomitanza con la chemioterapia a base di 5-fluorouracile.

Due studi randomizzati hanno dimostrato non esserci differenze di outcome tra la radioterapia a corso lungo rispetto a quella a breve corso, definita come 25 Gy in 5 frazioni oltre 1 settimana senza la somministrazione concomitante della chemioterapia. Purtroppo però in entrambi gli studi mancano i dati di un outcome a lungo termine con i relativi follow up. (24)

Il regime ottimale di chemioterapia consiste in infusioni continue intravenose 5-FU (225 mg/sm, 5 giorni a settimana), con o senza oxaliplatino intravenoso (50 mg/sm una volta alla settimana per 5 settimane) in concomitanza con la radioterapia.

Questo scenario di incertezza per quanto riguarda la somministrazione ottimale di radioterapia e chemioterapia è ulteriormente complicato da una marcata variabilità interindividuale sia nell'efficacia che nella tossicità, osservabile in gruppi di pazienti con schemi di radioterapia omogenei.

Esistono numerose variazioni sulla sensibilità alla radiazione e al farmaco e i livelli tumorali sono considerati

Riparazione del DNA, metabolismo del farmaco, angiogenesi, reazioni immunitarie, mobilitazione e reclutamento delle cellule del midollo osseo sono soltanto alcuni dei meccanismi coinvolti nella risposta del tumore ai trattamenti e la loro analisi dal punto di vista genetico è considerata un importante strumento per la personalizzazione della terapia antitumorale. Negli ultimi 15 anni i polimorfismi germline, ossia le differenze interindividuali nelle sequenze del DNA trovate nelle cellule normali, sono ampiamente studiati come predittori di outcome in differenti trattamenti nella maggiorparte dei tumori. (25)

IL TUMORE ALL'ESOFAGO

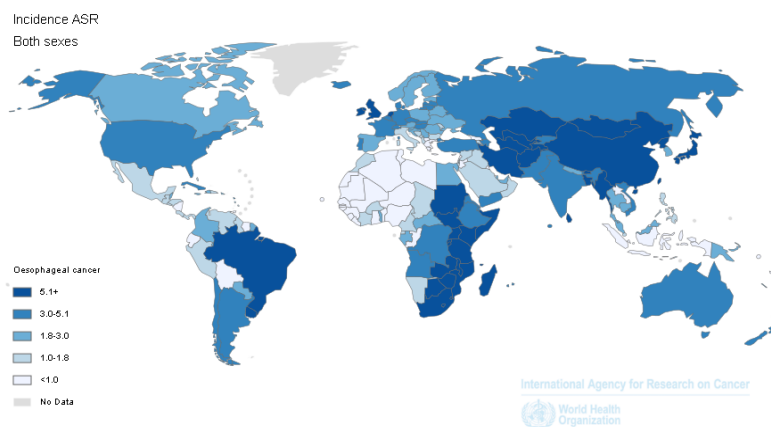
Il cancro all'esofago è la sesta tra le cause maggiori di mortalità correlate al tumore e l'ottavo tipo di tumore più diffuso a livello mondiale. Nel mondo 450.000 persone sono affette da tumore all'esofago e la sua incidenza è in aumento. (26-28)

Il tumore all'esofago rappresenta la causa maggiore di morte per cancro nella popolazione maschile mondiale. La prognosi è relativamente sfavorevole con un tasso di sopravvivenza a 5 anni che varia dal 15% al 26% in base al tipo di trattamento; i risultati migliori si hanno con una diagnosi precoce della malattia durante gli stadi iniziali. (27,29,30)

Epidemiologia

A livello mondiale, l'incidenza del carcinoma esofageo varia ampiamente a seconda delle regioni.

Le disparità globali per quanto riguarda incidenza, mortalità e prevalenza del tumore esofageo sono evidenti soprattutto a causa di interazioni complesse tra fattori di rischio non modificabili (susceptibilità genetica ed età) e modificabili (tabacco, agenti infettivi, dieta e attività fisica). Inoltre, questi fattori di rischio si intrecciano con differenze di comportamento individuale, credenze e pratiche culturali, condizioni socioeconomiche e sistema sanitario, per cui le disparità globali sono inevitabili. (31)



Source: GLOBOCAN 2012 (IARC)

Fig. 6 Incidenza del tumore all'esofago nel mondo *GLOBOCAN International Agency for Research on Cancer WHO*

La cosiddetta “Asian belt” che comprende la Turchia, il nord-est Iran, Kazakhstan e il centro-nord della Cina, ha un'altissima incidenza di carcinomi squamosi esofagei con più di 100 casi per 100.000 abitanti ogni anno e con equa distribuzione tra uomini e donne. (32,33)

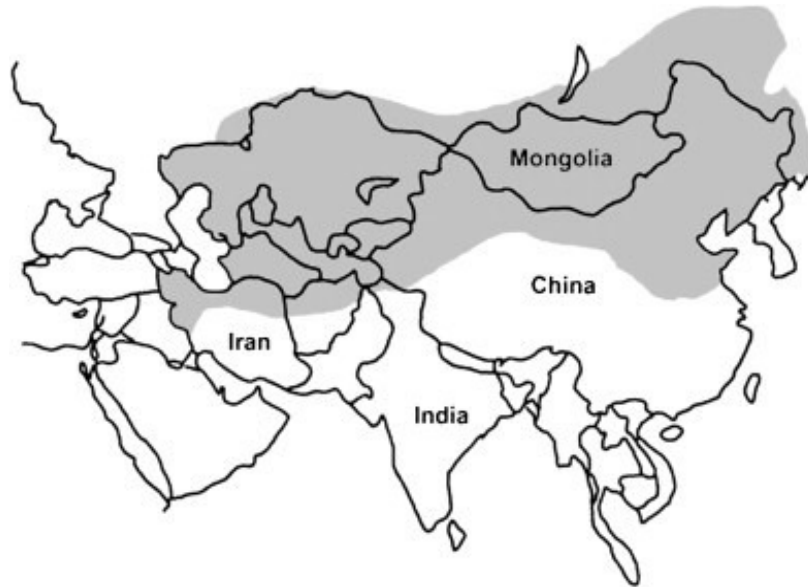


Fig. 7 “Central Asian Esophageal Cancer Belt”

Nell' Unione Europea si stimano 43.700 nuovi casi all'anno e 20.750 decessi negli uomini e 9.650 nelle donne con considerevole variabilità geografica (Grecia 3/100.000 mentre in Francia più di 10/100.000). Anche in Europa, ad essere colpito è principalmente il sesso maschile con un rapporto 2-5/1. (34)

In Italia, il tumore dell'esofago è più diffuso nel Nord-Est del paese, con un'incidenza media di 2 casi per 100.000 abitanti. I tumori dell'esofago colpiscono maggiormente il sesso maschile (70%) e rappresentano tumori dell'età avanzata, con tassi di incidenza che aumentano gradatamente a partire dai 50 anni, per diventare massimi tra i 70 e gli 80 anni di età. (35)

Fisiopatologia e patogenesi

A seconda dell'epitelio di origine si hanno due tipi di carcinoma esofageo.

- *Carcinoma squamoso (SCC)* originario dalle cellule epiteliali di pavimentazione. Si ritrova nel terzo inferiore, medio e superiore dell'esofago.

Inizialmente si presenta come una depressione poi si sviluppa in forma vegetante. Rappresenta circa il 50% dei casi.

(AIRTUM - Associazione Italiana Registri Tumori)

Fra i principali fattori di rischio per questa neoplasia si segnalano tabacco, alcol e altri fattori di rischio alimentari, soprattutto nei Paesi dell'Est asiatico, costituiti principalmente dalle micotossine e dai N-nitroso composti, metaboliti di cibi conservati o contaminati da muffe.

Da ricordare inoltre il rischio derivante dall'ingestione abituale di bevande bollenti, che tramite l'induzione di esofagite cronica creano le condizioni per lo sviluppo di lesioni precancerose; degno di nota è anche il rischio da dieta povera di frutta fresca e verdura. (36)

Nel processo cancerogenetico dello SCC dell'esofago giocano infine un ruolo determinante mutazioni a geni coinvolti nella replicazione cellulare (TP53), così come l'amplificazione del gene della ciclina D1, l'inattivazione trascrizionale del gene FHIT e l'alterazione del gene DLC-1. (37)

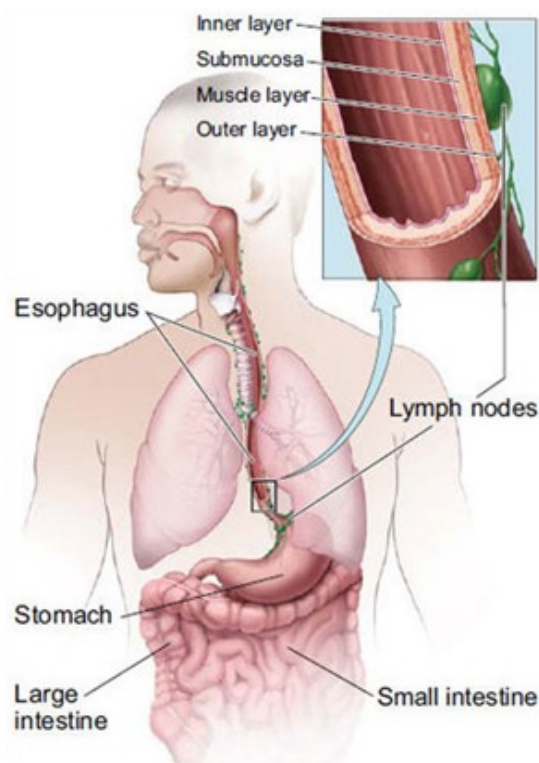


Fig. 8 Esofago e organi adiacenti
National Cancer Institute

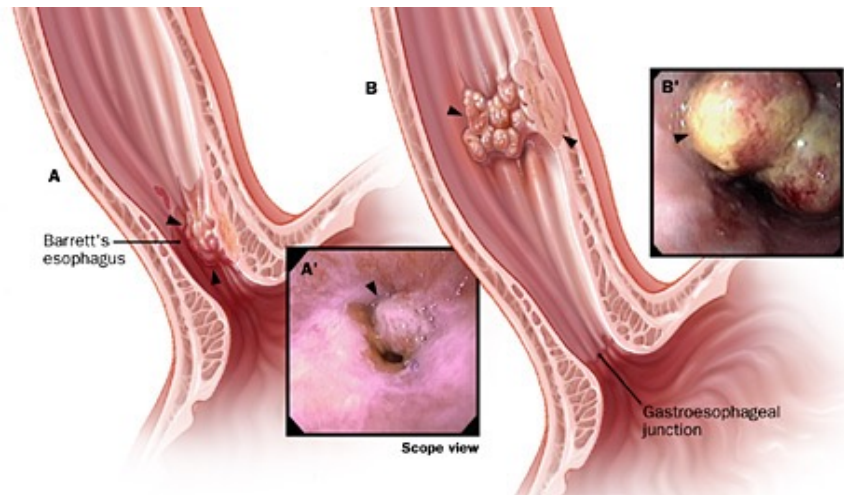


Fig. 9 A) Adenocarcinoma B) Carcinoma squamoso
National Cancer Institute

- *Adenocarcinoma (ADK)* i carcinomi a differenziazione ghiandolare dell'esofago insorgono prevalentemente nel terzo inferiore, in prossimità della giunzione esofago-gastrica, e nel contesto di precedenti quadri di metaplasia intestinale della mucosa (esofago di Barrett).

(AIRTUM - Associazione Italiana Registri Tumori)

Il principale determinante di questa metaplasia epiteliale è costituito dal reflusso gastroesofageo, ad opera dell'azione lesiva dell'acido cloridrico, degli acidi biliari e degli enzimi pancreatici (per la frequente coesistenza di reflusso duodenale) e particolarmente dall'interazione fra queste sostanze. (38)

Anche il fumo di sigaretta, come nell'SCC, è stato identificato tra i fattori di rischio, presente in circa il 40% dei casi di ADK esofageo. Un ulteriore fattore di rischio è rappresentato dall'obesità: persone con alto Body Mass Index hanno un rischio fino a 3 volte più alto rispetto a quelle a più basso BMI. (39)

Il rischio potrebbe diminuire nei pazienti con una pregressa storia di infezione da *Helicobacter pylori*. (40)

Il rischio di adenocarcinoma esofageo nei pazienti con esofago di Barrett è stato stimato essere 0,5% per anno. Il rischio aumenta nei pazienti con dispalsia esofagea ad alto grado, il 16%-59% di questi progredirà ad adenocarcinoma. (41-43)

Al percorso cancerogenetico concorrono anche alterazione dei geni TP53 e CDKN2A, dei trascritti di FHIT e fenomeni di perdita di eterozigosi (geni APC) e amplificazione genica (gene HER2). Anche nell'esofago di Barrett alcune anomalie genetiche tra cui instabilità cromosomica, anomalie nel ciclo cellulare e danni a carico di TP53 e KI67, possono essere considerate potenziali indicatori di progressione verso l'adenocarcinoma esofageo. (44,45)

Tab. 1 Principali fattori di rischio nel cancro esofageo

Carcinoma squamoso (SCC)	Adenocarcinoma (ADK)
tabacco	reflusso gastro-esofageo
alcol	esofago di Barrett
mutazioni enzima del metabolismo dell'alcol	obesità
acalasia	tabacco
lesioni corrosive	radiazioni toraciche
stato socio-economico basso	dieta scarsa di frutta e verdura
scarsa igiene orale	aumento dell'età
deficienze nutrizionali	Sesso maschile

Valutazioni Cliniche e Diagnosi

La disfagia rappresenta il sintomo più comune nel tumore all'esofago, anche se sta aumentando il numero dei pazienti asintomatici che vengono diagnosticati solamente con endoscopia di controllo. (46)

Il carcinoma squamoso si presenta comunemente nei pazienti con storia pregressa di consumo di alcol e tabacco mediante disfagia e conseguentemente perdita di peso.

Per quanto riguarda invece l'adenocarcinoma, i pazienti presentano storia pregressa di reflusso-gastro esofageo e disfagia mentre la perdita di peso non è frequente. (47)

L'esofagografia con mezzo di contrasto al bario è una tecnica ampiamente utilizzata nella valutazione dei pazienti che presentano la sintomatologia principale; anche se molto spesso è richiesta una esofagogastroduodenoscopia per poter ottenere campioni biotici in grado di confermare la diagnosi di carcinoma esofageo. (48)

Stadiazione

Una volta confermata la diagnosi di tumore esofageo, è necessario classificare in maniera accurata il tipo di tumore per poter procedere con il trattamento più indicato.

Il sistema di stadiazione TNM (tumore, linfonodi e metastasi) considera la profondità dell'invasione tumorale, il coinvolgimento linfonodale e la presenza/assenza di metastasi.

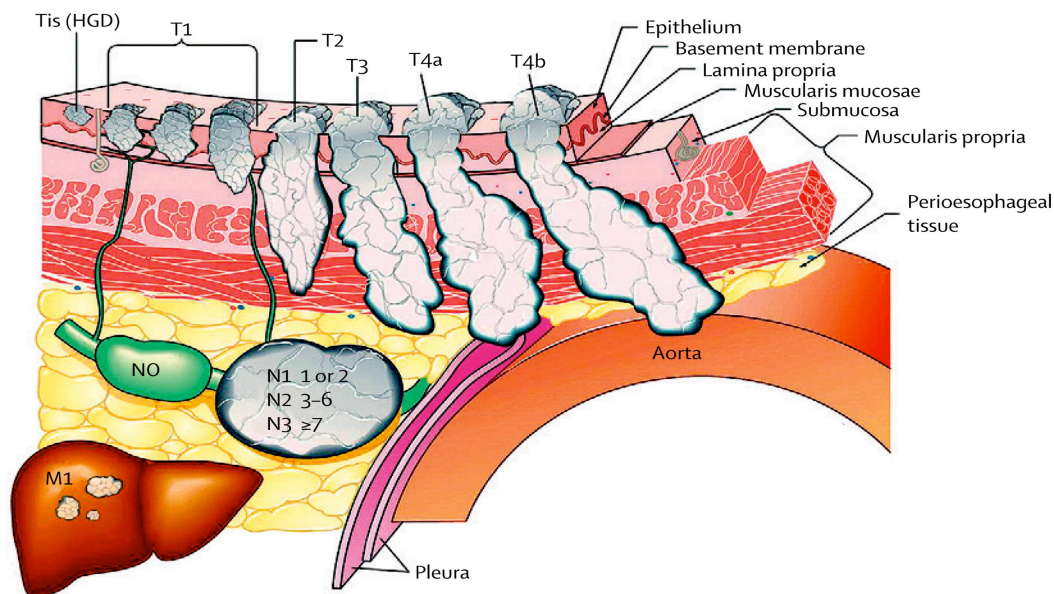


Fig. 10 Disegno rappresentativo della classificazione TNM per la stadiazione del carcinoma esofageo.

(Cleveland Clinic Center for Medical Art and Photography, Cleveland, OH, USA.)

La stadiazione clinica e patologica di riferimento è quella proposta e aggiornata di recente dall' American Joint Committee on Cancer (AJCC) secondo Classificazione TNM (Edge 2010).

Tumore primitivo (T)

Tx la presenza di tumore primitivo non può essere accertata

T0 non evidenza di tumore primitivo

Tis carcinoma in situ/displasia alto grado

T1 il tumore invade la mucosa o lamina propria o muscolaris mucosae o sottomucosa

T1a il tumore invade la mucosa o lamina propria o muscolaris mucosae

T1b il tumore invade la sottomucosa

T2 il tumore invade la muscolaris propria

T3 il tumore invade l'avventizia

T4a il tumore invade la pleura, pericardio o diaframma

T4b il tumore invade le altre strutture adiacenti come aorta, corpi vertebrali o trachea

Linfonodi regionali (N)

I linfonodi regionali, indipendentemente dalla sede del tumore primitivo, sono quelli inclusi nell'area di drenaggio linfatico dell'esofago comprendente i linfonodi dell'asse celiaco e i linfonodi paraesofagei del collo ma non i linfonodi sovraclavicolari.

Nx la presenza di metastasi ai linfonodi regionali non può essere accertata

N0 non evidenza di metastasi ai linfonodi regionali

N1 metastasi in 1 o 2 linfonodi regionali

N2 metastasi in 3-6 linfonodi regionali

N3 metastasi in 7 o più linfonodi regionali

Metastasi a distanza (M)**Mx** la presenza di metastasi a distanza non può essere accertata**M0** non evidenza di metastasi a distanza**M1** metastasi a distanza

Tab. 2 Suddivisione in stadi del tumore esofageo secondo classificazione TNM vers.2010

stadio	TNM
0	Tis, N0, M0
IA	T1 N0, M0
IB	T2, N0, M0
IIA	T3 N0, M0
IIB	T1-T2, N1, M0
IIIA	T4A, N0, M0
	T3, N1, M0
	T1-T2, N2, M0
IIIB	T3, N2, M0
IIIC	T4A, N1-N2, M0
	T4B, ogni N, M0
	ogni T, N3, M0
IV	ogni T, ogni N, M1

Trattamento

La malattia localmente avanzata, definita come l'estensione del tumore primario con il coinvolgimento dei linfonodi regionali (> T2, linfonodi positivi con o senza metastasi) viene generalmente trattata con intento curativo mediante un approccio multimodale che include la chirurgia.

La malattia avanzata (metastatica o disseminata) e la recidiva vengono invece trattate con intento palliativo mediante chemioterapia per aumentare la sopravvivenza e terapie locali, come la radioterapia, o terapie endoscopiche per trattare la disfagia.

L'istologia e la posizione del tumore influenzano la scelta del trattamento chemioterapico e dell'approccio chirurgico. (49)

La diagnosi deve essere effettuata con biopsia endoscopica. L'esofago può anche essere sede di metastasi di altre neoplasie (polmonari, mammarie, tiroidee, melanomi e linfomi). L'endoscopia deve fornire la distanza dello sfintere esofageo superiore ed inferiore dall'arcata dentaria in cm e la distanza di inizio e termine della neoplasia. (50)

L'ecoendoscopia (EUS) pur essendo il metodo più sensibile per definire il livello di infiltrazione e le adenopatie peritumorali, tende ad essere troppo operatore-dipendente e va riservata ai pazienti candidati alla chirurgia dopo l'esecuzione della TAC. (51)

La TAC convenzionale, torace ed addome, è adeguata per la valutazione delle metastasi a distanza. L'ecografia è l'esame più sensibile per la valutazione delle lesioni linfonodali laterocervicali sopraclaveari ed è indicata nella stadiazione delle lesioni sopracarenali.

Analisi della funzionalità midollare, renale, epatica, cardiaca, polmonare, profilo proteico e valutazione dietetica in caso di calo ponderale maggiore al 10% sono indispensabili nella valutazione dei rischi dei singoli trattamenti. (52,53)

Il trattamento deve essere personalizzato in base ai fattori prognostici individuali, il sito anatomico, l'istotipo, le risposte e tossicità attese e le preferenze del paziente e deve risultare da una valutazione multidisciplinare.

Quando l'early cancer è >3 cm e quando interessa la sottomucosa i trattamenti endoscopici sono inadeguati ed è indicata la chirurgia. L'esofagectomia radicale con linfadenectomia mediastinica e addominale è la modalità curativa nei pazienti con neoplasia esofagea completamente resecabile non metastatica, in condizioni cliniche adeguate (cT1-2N0M0). (54)

L'esofagectomia palliativa è un'opzione rara che si può considerare solo in caso di sanguinamento e/o perforazione con impossibilità a trattamento chemioradioterapico (CRT). Nei pazienti con malattia localmente avanzata, ma resecabile e non metastatica (>cT2 e/o N positivo), la CRT preoperatoria e, per l'ADK sia la CT preoperatoria sia CRT, aumentano la percentuale di reseziioni radicali e la sopravvivenza globale rispetto alla sola chirurgia. (55,56)

La radiochemioterapia neoadiuvante pertanto è spesso utilizzata per il carcinoma esofageo localmente avanzato.

Per quanto riguarda ADK con metastasi linfonodali un incremento della sopravvivenza rispetto alla chirurgia è ottenibile anche con CRT adiuvante von 4 cicli di fluoro folati, la tolleranza è significativamente peggiore rispetto alla preoperatoria e solo il 60% dei pazienti è in grado di completare il trattamento senza modifiche. (57)

Le dosi di radioterapia in associazione alla chemioterapia variano da 41,4 a 45 Gy con frazioni di 1,8 Gy/die nel trattamento preoperatorio, mentre arrivano a 50,4 Gy quando non è prevista chirurgia.

Nei pazienti non operabili o con neoplasia non resecabile l'obiettivo del trattamento è eliminare la disfagia e gli altri sintomi correlati alla neoplasia il più a lungo possibile. La CRT anche in questi pazienti offre una palliazione migliore con un raddoppio della mediana di sopravvivenza (MS 13 mesi) rispetto alla sola CT (8 mesi) o RT (7 mesi).

La chemioterapia di associazione standard è costituita da cisplatino e fluorouracile per 4 cicli sia per l' SSC che per l' ADK. (58)

Nell' ADK quando si sceglie la sola CT preoperatoria sono preferibili le combinazioni di platino e fluoropirimidine a 3 farmaci (con l'introduzione di taxani o antracicline), con 3 cicli prima dell'intervento e 3 dopo. (59)

La CRT preoperatoria pur più tossica della sola CT preoperatoria nell'insieme non è più tossica dell'intera CT pre e post chirurgica. (60)

Nei pazienti con ADK metastatico che iper esprimono Her-2 (25-30%) in immunoistochimica (3+) o 2+ con conferma di amplificazione genica (FISH), ottengono un vantaggio in sopravvivenza dall'aggiunta al trattamento con cisplatino/fluoropirimidine del trastuzumab, se la condizione cardiaca lo consente. (61)

La chemioradioterapia concomitante seguita da asportazione chirurgica ha dimostrato migliorare molto la sopravvivenza nei tumori all'esofago localmente avanzato e nella giunzione gastroesofagea rispetto alla sola chirurgia. (62,63)

Pertanto, molti studi hanno dimostrato che i pazienti con malattia localmente avanzata che raggiungono una risposta patologica completa a 5 anni dall'esordio sono più del 50%, mentre nella restante parte dei pazienti la prognosi rimane sfavorevole; l'identificazione della sottocategoria dei pazienti che sopravvivono a lungo termine è pertanto fondamentale per personalizzare le strategie di trattamento. (64)

Dato che non sono ancora stati trovati dei marcatori clinici o patologici predittivi per questo processo decisionale in terapia, negli ultimi anni sono stati studiati alcuni marcatori molecolari genetici, tra cui polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) sia singolarmente sia in pannello.

Per quanto riguarda il tumore all'esofago, in cui la sottocategoria in analisi è spesso scadente per insufficienza di numerosità campionaria, l'approccio gene candidato sembra essere una delle strategie di studio più appropriate per poter valutare ipotetiche associazioni tra risultati clinici e le varianti geniche. (65) Sia le radiazioni sia i farmaci antitumorali uccidono le cellule tumorali danneggiandone il DNA; a loro volta le cellule tumorali hanno assunto la capacità di espellere i farmaci verso l'esterno o attivare sistemi di riparazione, la cui efficienza determina l'efficacia della distruzione cellulare e di conseguenza dell' outcome clinico.

SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo di questo studio consiste nel valutare la correlazione tra alcuni polimorfismi in geni coinvolti nella riparazione del DNA, nel pathway di detossificazione e nel meccanismo di azione e metabolismo dei farmaci antitumorali con l'outcome clinico dei trattamenti radiochemioterapici concomitanti impiegati attualmente come standard in neoadiuvante per i pazienti affetti da tumore al retto e all'esofago.

Inoltre, si vuole valutare l'utilizzo di nuovi approcci statistici per individuare correlazioni genotipo-fenotipo.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Per il seguente studio sono stati utilizzati due gruppi di pazienti indipendenti. Il primo gruppo di pazienti è stato arruolato presso la SOC di Oncologia Medica, Ospedale "Santa Maria della Misericordia" Az. ULSS18 di Rovigo. Dal 2003 al 2015 sono stati raccolti pazienti con tumore al retto localmente avanzato (stadio II e III) e trattati con CRT neoadiuvante.

Tutti i pazienti sono stati trattati per 5 settimane mediante infusione venosa di 300mg/ m²/die di 5 fluorouracile in concomitanza con la radioterapia (56Gy). La resezione chirurgica è stata eseguita 6-8 settimane dopo aver completato il trattamento neoadiuvante.

Lo studio è stato approvato dal comitato etico locale e i pazienti hanno dato il loro consenso informato.

Il secondo gruppo di pazienti è stato arruolato anch'esso presso la SOC di Oncologia Medica, Ospedale "Santa Maria della Misericordia" Az. ULSS18 di Rovigo.

Dal 2003 al 2015 sono stati raccolti pazienti con tumore esofageo localmente avanzato e della giunzione gastroesofagea (GEJ) (T2-T4 con o senza linfonodi positivi) e trattati con CRT neoadiuvante. Tutti i pazienti hanno ricevuto settimanalmente docetaxel (35mg/m²) e cisplatino (25mg/m²), infusioni venose prolungate di fluorouracile (150mg/m²/die) e radioterapia concomitante (50Gy).

La chirurgia radicale è stata fatta 6-8 settimane dopo aver completato il trattamento.

Lo studio è stato approvato dal comitato etico locale e i pazienti hanno dato il loro consenso informato.

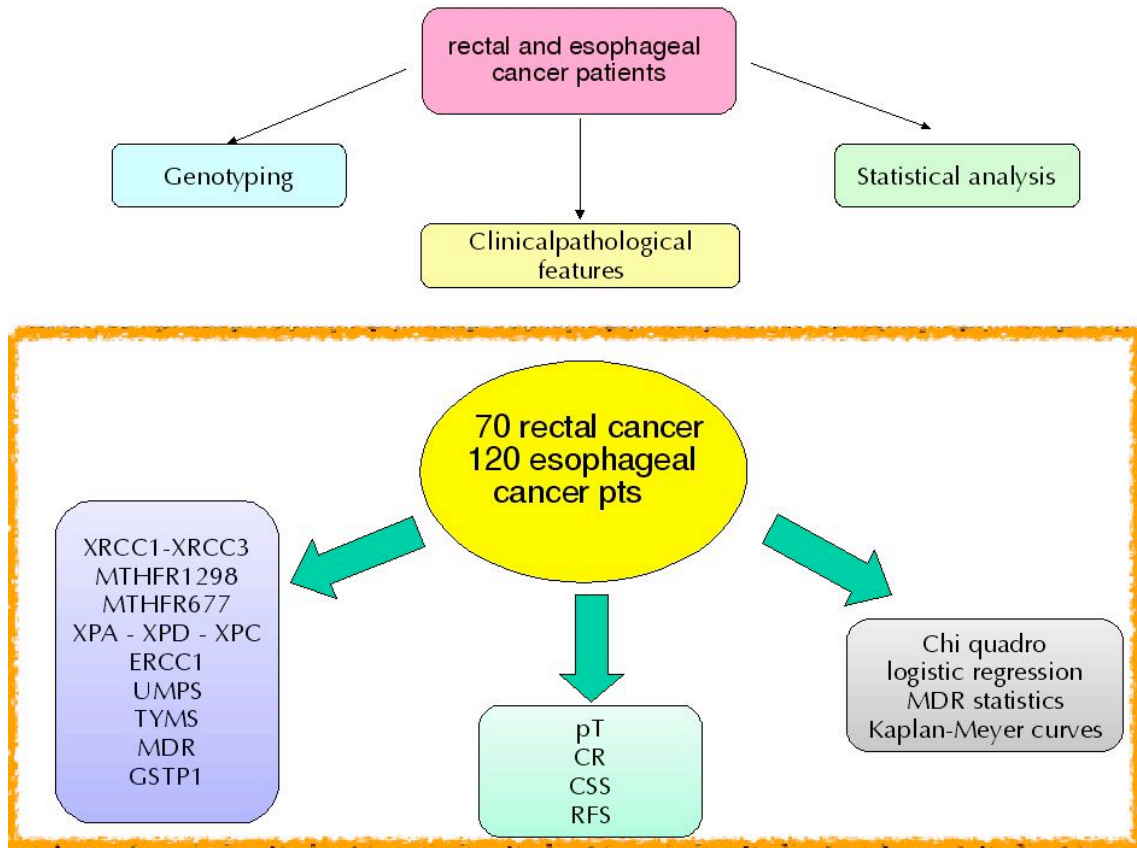


Fig. 11 Disegno dello studio.

Campioni

Estrazione DNA genomico da sangue periferico

Il DNA del primo gruppo di pazienti è stato estratto da leucociti di sangue periferico, utilizzando il kit commerciale Promega.

Il sangue periferico è stato raccolto in EDTA vials e successivamente conservato a -20°C.

L'estrazione del DNA è avvenuta secondo il seguente protocollo:

- scongelare il sangue periferico a temperatura ambiente
- far reagire 1200 µL di soluzione lisante per le cellule (Cell Lysis Solution Promega kit) con 450 µL di sangue periferico per almeno 10-15 minuti
- centrifugare a 14.000 rpm per 20 secondi
- eliminare il surnatante e dissociare meccanicamente il pellet
- risospendere nuovamente con 600 µL di soluzione lisante e centrifugare a 14.000 rpm per 1 minuto
- eliminare il surnatante e dissociare meccanicamente il pellet
- risospendere con 300 µL di soluzione lisante per i nuclei (Nuclei Lysis Solution Promega kit)
- dopo aver spipettato e ottenuto una soluzione vischiosa aggiungere 1,5 µL di RNasi (Promega kit)
- incubare in bagnetto a 37°C per 15 minuti
- raffreddare le provette 5 minuti a temperatura ambiente
- aggiungere sul fondo della provetta 100 µL di soluzione di precipitazione delle proteine (Protein Precipitation Solution Promega kit)
- agitare in vortex per qualche secondo e centrifugare a 14.000 rpm per 3 minuti
- raccogliere il surnatante e aggiungerlo a 300 µL di isopropanolo 1x
- mescolare per inversione 6/7 volte fino alla formazione del gomitolino di DNA
- raccogliere il DNA ottenuto con un'ansa sterile e lavare i sali mediante immersione in etanolo 70%.
- lasciare asciugare l'ansa con il DNA estratto a temperatura ambiente per 20 minuti circa
- risospendere il materiale raccolto in circa 100 µL di soluzione reidratante (Rehydration Solution 10mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA pH 8.0 Promega kit) e conservare il DNA a +4°C

Titolazione del DNA genomico

Per conoscere la concentrazione del DNA genomico estratto viene utilizzato lo spettrofotometro NanoDrop.

Il NanoDrop è uno Spettrofotometro UV-Visibile capace di lavorare con microvolumi di campione sfruttando la tecnologia basata sulla tensione superficiale che piccoli volumi di liquidi esercitano quando si trovano collocati tra due superfici vicine. In tal modo una goccia di campione posizionata sull'apposita piastra di lettura crea una colonna di liquido a diretto contatto con due fibre ottiche, e può essere analizzata in modo semplice e veloce.

Con questo strumento è pertanto possibile determinare automaticamente la lettura del campione a 260 – 280 – 230 nm di lunghezza d'onda, la concentrazione ed i relativi rapporti per determinare il grado di purezza del campione analizzato.

Le aliquote di DNA sono state diluite alla concentrazione operativa di circa 100 ng/μl. Ogni tubo è stato etichettato con il codice identificativo dell'individuo, con una sigla indicante la tipologia del campione biologico, la data di estrazione del DNA genomico e la sua concentrazione e conservato in scatole dedicate a +4°C.

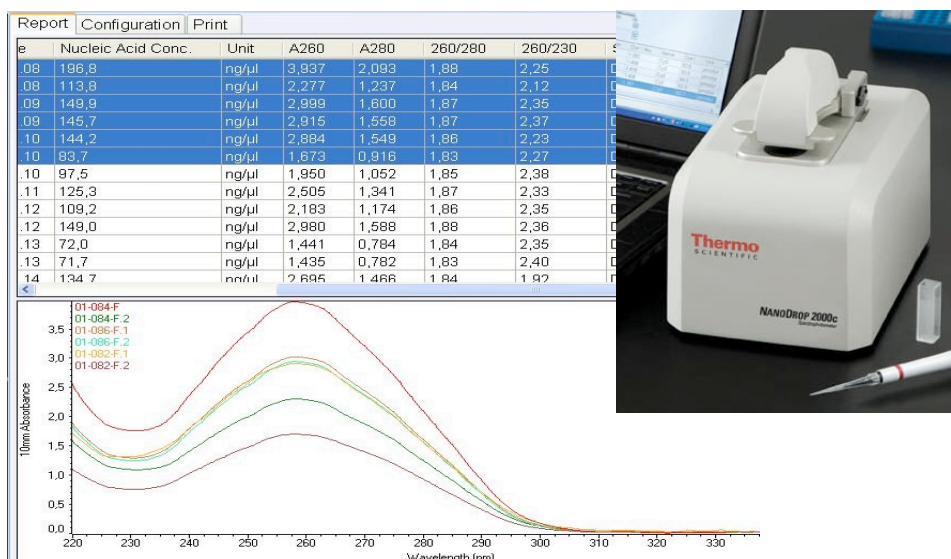


Fig. 12 Spettrofotometro Nanodrop e titolazione DNA

Analisi dei polimorfismi

Il DNA ottenuto è stato utilizzato per l'analisi dei polimorfismi di geni coinvolti nei sistemi di riparazione del DNA (XPA, XPC, XPD, XRCC1, XRCC3, ERCC1), nei pathways del farmaco (MTHFR, TYMS e UMPS) e nella detossificazione (MDR1, GSTP1) mediante analisi RFLP-PCR e dHPLC

I polimorfismi sono stati selezionati dal database NCBI e considerati solo se la frequenza della variante minore era almeno del 1% nella popolazione caucasica.

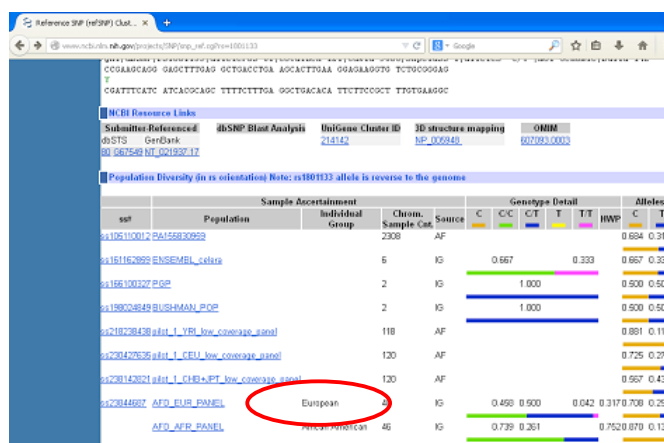


Fig. 13 NCBI database. Verifica della frequenza allelica dei polimorfismi.

Tab. 3 Metodi utilizzati per la genotipizzazione dei polimorfismi dei campioni di tumore al retto e all'esofago.

GENI	rs	PCR PRIMERS 5'-3' (sense-antisense)	detection method
TYMS 5' VNTR	34743033	GTGGCTCCTGCGTTTCCCC	RFLP (<i>HaeIII</i>)
	2853542	GCTCCGAGCCGGCCACAGGCATGGCG CGG	
TYMS 3'UTR	2790	CAAATCTGAGGGAGCTGAGT	RFLP (<i>DraI</i>)
		CAGATAAGTGGCAGTACAGA	
UMPS 638 G>C	1801019	GTCTTTGTGGCAGCGAATCATAATG	dHPLC
		ACACAGATTGGTCTCCTTCTTTTG	
MTHFR 677 C>T	1801133	TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA	RFLP (<i>HinfI</i>)
		AGGACGGTGCGGTGAGAGTG	
MTHFR 1298 A>C	1801131	CTTTGGGGAGCTGAAGGACTAC	RFLP (<i>MbolI</i>)
		CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG	
XPA 23 A>C	1800975	TCAGAAAGGCCGCTGGGT	RFLP (<i>MspI</i>)
		CTGGCGCAGCATCAGTGC	
XPC 499 C>T	2228000	GTAAGGACCCAAGCTTGCCACT	RFLP (<i>SacI</i>)
		CCCACCTTTTCTCCTGCTCACAG	
XPC 939 A>C	2228001	GGAGGTGGACTCTCTTCTGATG	RFLP (<i>PvuII</i>)
		AGGTGTTGGGGCCTGTAGTG	

GENI	rs	PCR PRIMERS 5'-3' (sense-antisense)	detection method
XPB 751 A>C	13181	CCTCTCCCTTTCTCTGTTC CAGGTGAGGGGACATCT	RFLP (<i>MbolI</i>)
XRCC1 399 G>A	25487	TTGTGCTTTCTCTGTGTCCA TCCTCCAGCCTTTTCTGATA	RFLP (<i>MspI</i>)
XRCC3 241 T>M	861539	GGTCGAGTGACAGTCCAAAC TGCAACGGCTGAGGGTCTT	RFLP (<i>NlaIII</i>)
ERCC1 118 T>C	11615	GCAGAGCTCACCTGAGGAAC GAGGTGCAAGAAGAGGTGGA	RFLP (<i>BsrDI</i>)
MDR1 2677 G>T	2032582	TGCAGGCTATAGGTTCCAGG TTTAGTTTGACTCACCTTCCCG	RFLP (<i>BanI</i>)
GSTP1 114 C>T	1138272	CAAGCAGAGGAGAATCTGGG AATGAAGGTCTTGCCTCCCT	RFLP (<i>Cac8I</i>)

Funzione dei polimorfismi

Metabolismo dei folati

I trattamenti chemioterapici antimetaboliti agiscono specificamente sui componenti delle basi azotate del DNA, interferendo nel pathway metabolico dei folati. In particolare, il fluorouracile (5-FU) è un farmaco antineoplastico analogo delle pirimidine in grado di inibire la funzione dell'RNA e/o il processo di sintesi della timidilato. Il preciso meccanismo d'azione del fluorouracile avviene mediante il legame tra il deossiribonucleotide del farmaco (5-FdUMP), il cofattore dei folati (N5-10-metilenetetraidrofolato) e la timidilato sintasi affinché si formi una struttura ternaria legata covalentemente. La formazione di questo complesso provoca l'inibizione della formazione del timidilato dall'uracile in grado di inibire la sintesi di DNA e di RNA provocando la morte cellulare.

Il 5-FU è in grado anche di incorporarsi all' RNA al posto dell'uridina trifosfato, producendo un filamento di RNA fraudolento in grado di interferire con il processo di RNA e sintesi proteica. (66)

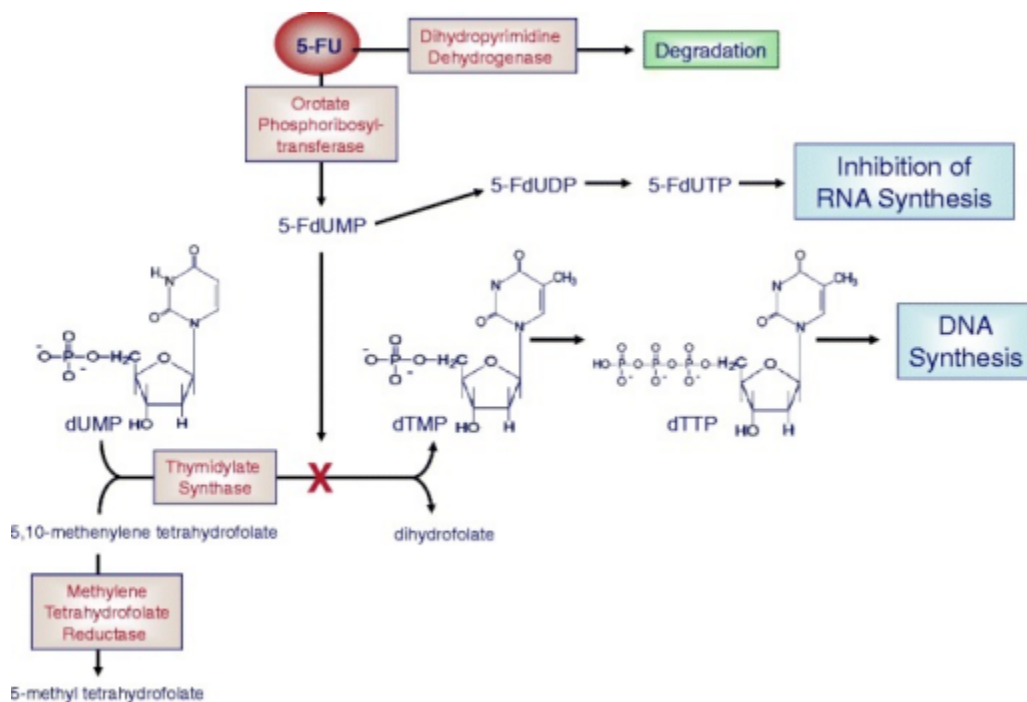


Fig. 14 Pathway dei folati

TYMS

La timidilato sintasi catalizza la metilazione del deossiridilato a deossitimidilato utilizzando la 5,10-metilentetraidrofolato (metilene-THF) come cofattore. Questa funzione mantiene il pool di dTMP (timina-5-primo-monofosfato) fondamentale per la replicazione e riparazione del DNA. Questo enzima è stato studiato molto in quanto target di numerosi agenti chemioterapici; esso viene infatti considerato il sito d'azione primario del 5-fluorouracile, 5-fluoro-2-primo-deossiridina e alcuni analoghi dei folati.

Una over espressione del gene TYMS è associata a resistenza alla chemioterapia e prognosi sfavorevole. (67)

Nella regione 5' UTR di TYMS, è stato identificato un tandem repeat polimorfico di 28bp (rs34743033) in grado di modulare l'espressione del gene TS e i livelli della proteina.

Nello studio fatto da Horie et al. (1995) è stata fatta un'analisi funzionale delle sequenze tandem repeated nella regione 5' terminale del gene umano TYMS. Essi hanno transfettato la linea cellulare HeLaS3 con il plasmide F3 contenente le sequenze di interesse e successivamente è stata valutata l'attività dell'espressione del gene TYMS. Essi hanno identificato doppie (2R) e triple ripetizioni (3R) in tandem nel genoma umano di soggetti normali ma l'attività di espressione delle varianti è risultato differente. Infatti, il gene con la doppia ripetizione possedeva un'attività di espressione inferiore rispetto al gene con la tripletta (3R). (68)

Kawakami et al. (2001) ha invece studiato una possibile correlazione tra differenti lunghezze di una sequenza ripetuta polimorfica nel gene TYMS (2R o 3R) e l'efficienza della traduzione proteica o espressione genica.

Essi hanno quantificato l'espressione dell'mRNA derivato dai pazienti con tumore al colonretto, mediante real time PCR. Essi non hanno ottenuto nessuna correlazione tra il genotipo di TYMS e i livelli di espressione di mRNA.

Essi hanno voluto anche quantificare la proteina TS mediante il saggio fluoro d-UMP; in particolare il genotipo 3R/3R è stato associato ad una maggiore espressione della proteina TS rispetto al genotipo 2R/3R.

Questi risultati hanno suggerito agli autori di indagare anche nei meccanismi posttrascrizionali. Essi infatti hanno costruito un sistema di espressione con cellule HeLa contenenti due plasmidi differenti con sequenze a due o tre ripetizioni. L'attività del costruito 3R/3R era 3-4 volte maggiore rispetto al costruito 2R/2R e gli autori hanno inoltre confermato una migliore efficienza di traduzione del genotipo 3R/3R. (69)

Nel 2003, lo stesso gruppo di ricerca ha identificato uno SNP addizionale (G/C) in TYMS VNTR, assegnando i seguenti genotipi 2G/3G, 2C/3C, 2C/3G. Essi hanno disegnato un costruito plasmidico con gli alleli (2G-2C-3G-3C) e successivamente sono stati transfettati nelle cellule HeLa. Il costruito ha mostrato differenti tipi di efficienza traduzionale: gli alleli 2G-2C possedevano la stessa efficienza mentre l'allele 3G mostrava invece una efficienza di 3-4 volte migliore rispetto il primo gruppo. (70)

Esiste un altro polimorfismo del gene TYMS molto conosciuto e consiste nell'inserzione/delezione di 6bp nella parte 3' UTR (rs2790): alleli deleti producono meno mRNA stabile e più bassi livelli di TS. (71)

MTHFR

La proteina che codificata da questo gene catalizza la conversione di 5,10-metilentetraidrofolato a 5-metiltetraidrofolato, un co-substrato per la remetilazione della omocisteina in metionina.

Variazioni genetiche che coinvolgono questo gene sono associate ad una deficienza nell'attività della metilentetraidrofolato reduttasi.

Ueland et al. (2001) ha scritto una review su gli effetti metabolici e anche sulle implicazioni cliniche del polimorfismo MTHFR C677T.

MTHFR677 condiziona la sintesi di RNA, DNA e della proteina, causando la conservazione dei folaticoinvolti nella sintesi delle pirimidine in purine.

Un altro importante effetto del polimorfismo MTHFR677 coinvolge la dissociazione del cofattore FAD (Flavine Adenine Dinucleotide). Hustad et al. (2000) ha dichiarato che la concentrazione di riboflavina è stata inversamente correlata alla concentrazione plasmatica di omocisteina. Ciò potrebbe trovare una spiegazione dall'effetto su FAD. Un altro studio (Stern et al. 2000) ha marcato l'associazione tra poca metilazione di DNA ed il genotipo CC MTHFR677. In questo caso il genotipo TT ha mostrato, non solo una iperomocistenemia ma anche un altro effetto metabolico coinvolto nella carcinogenesi. (72)

Yamada et al. (2001) ha dimostrato che il polimorfismo MTHFR 677 promuove la dissociazione monomerica e la perdita del cofattore FAD impedendo la conversione di metilene a metilentetraidrofolato. (73)

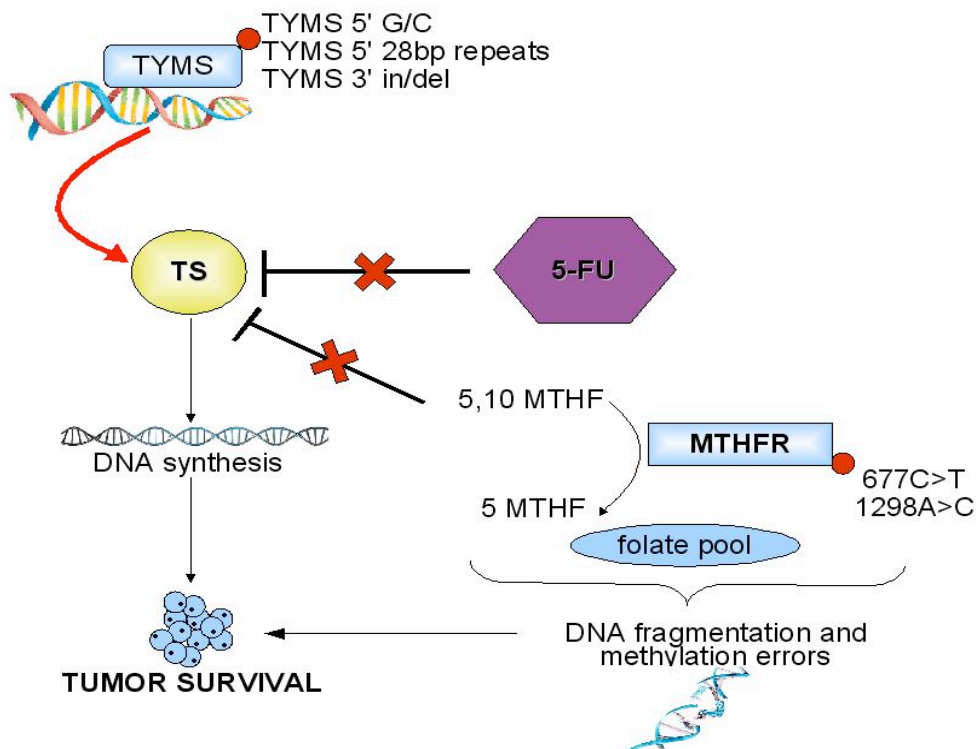


Fig. 15 Principali polimorfismi coinvolti nel pathway dei folati

Meccanismi di riparazione del DNA

La radio e chemioterapia tradizionali per il trattamento delle neoplasie esofagee e rettili mirano a danneggiare il DNA delle cellule tumorali per poterle indurre ad apoptosi. Esistono numerose evidenze che i meccanismi di riparazione del DNA rappresenta uno dei pathway genici cruciali potenzialmente coinvolti nella sensibilità individuale alla chemioterapia e radioterapia. (74,75)

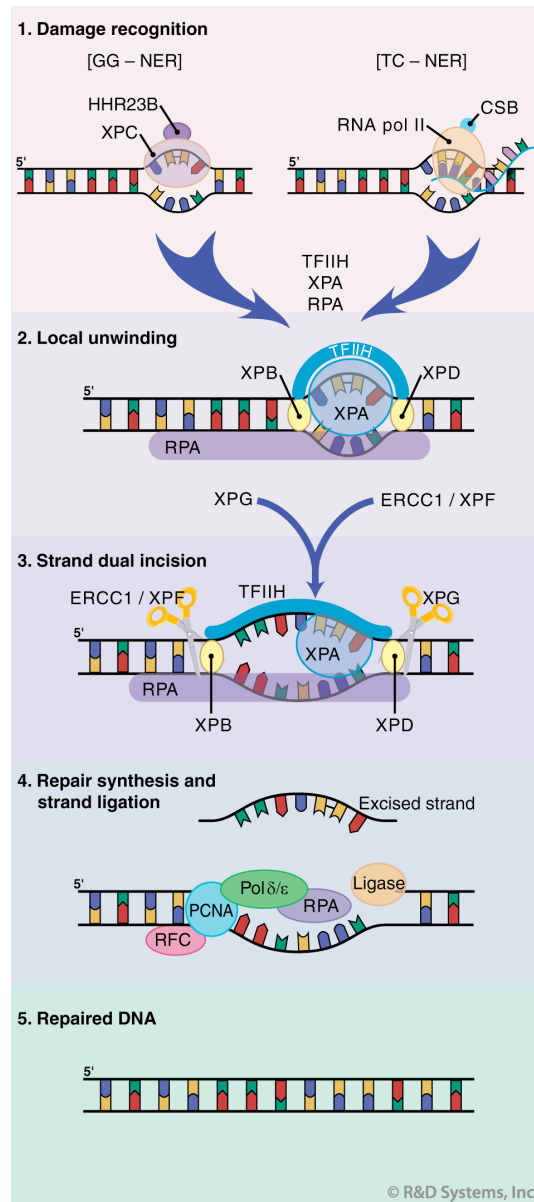


Fig. 16 Meccanismo di riparazione del DNA, Nucleotide Excision Repair.

Il gene di riparazione del DNA **ERCC1** (Excision Repair Cross-Complementing group 1) fa parte del complesso NER (Nucleotide Excision Repair) ed è coinvolto nella riparazione cross-link interstrand e intrastand del DNA causato dal platino, mentre **XRCC1** (X-ray Cross Complementing group 1) è coinvolto nel sistema BER (Base Excision Repair) ed è in grado di rimuovere piccole lesioni attorno alle basi di DNA danneggiate. (76,77)

La proteina XRCC1 codificata dal medesimo gene è coinvolta nella riparazione di rotture a singolo filamento del DNA causate da esposizione a radiazioni ionizzanti e agenti alchilanti. Questa proteina interagisce con la DNA ligasi III, la polimerasi beta e la poli ADP ribosio polimerasi per partecipare al pathway della riparazione da escisione di base.

Studi precedenti hanno dimostrato che un'espressione alterata o polimorfismi a singolo nucleotide di questi due geni possono influenzare la sensibilità alla radiochemioterapia in alcuni tipi di tumore attraverso l'espressione di mRNA aberrante oppure influenzando le interazioni con altre proteine coinvolte nella riparazione del DNA. (78,79)

Quando solo uno dei due filamenti di un cromosoma presenta un difetto, l'altro filamento può essere usato come stampo per guidare la correzione del filamento danneggiato. Al fine di riparare il danno di una delle due eliche di DNA, ci sono numerosi meccanismi tramite i quali si può realizzare la riparazione del DNA. (80)

Per quanto riguarda la riparazione del DNA da danni causati dalla radio e chemioterapia, il meccanismo principale riguarda la riparazione per escisione. In questo caso si rimuove il nucleotide danneggiato sostituendolo con un nucleotide non danneggiato e complementare al nucleotide presente nell'altro filamento di DNA non danneggiato. In particolare, esistono due tipi di riparazione:

- riparazione per escisione di base (Base Excision Repair o BER) che ripara il danno che coinvolge un singolo nucleotide causato da ossidazione, alchilazione, idrolisi oppure deaminazione.

- riparazione per escissione di nucleotidi (Nucleotide Excision Repair o NER) che ripara un danno che coinvolge filamenti lunghi da 2 a 30 nucleotidi. Questi includono danni da distorsione dell'elica dovuti a raggi UV. La sequenza enzimatica è: il complesso **XPC-hHR23B** (o Rad23B) riconosce il sito da riparare, **XPB** e **XPD** (elicasi) srotolano l'elica, **XPG** e **XPF** (endonucleasi) tagliano ed eliminano l'oligonucleotide contenente il danno, DNA-polimerasi sintetizza nuovamente il DNA nel sito del danno, Dna-Ligasi che "ricuce" il filamento riparato.

Il gene **XPA** codifica una proteina zinc finger in grado di legarsi in maniera selettiva al DNA danneggiato da irradiazioni con UV o trattamenti con chemioterapici tra cui il cisplatino.

L'attività di riconoscimento del danno del DNA da parte di XPA è fondamentale nella funzione di NER dato che cellule in cui è stata inattivata la proteina mediante mutazione, sono completamente deficienti di questo passaggio fondamentale di riparazione. E' stato individuato un polimorfismo nella regione 5' non codificante del gene XPA, G23A (rs1800975) consiste nella sostituzione nucleotidica del codone di start. (81) La porzione 5'UTR è essenziale per l'espressione genica attraverso meccanismi di controllo trascrizionali e post-trascrizionali. (82)

Eventuali polimorfismi presenti nell'area prossimale al codone di inizio potrebbero causare implicazioni di binding della subunità ribosomiale 40S e pertanto influenzare i livelli proteici all'interno della cellula. (83)

Il gene **XPC** codifica per un'altra proteina fondamentale nel meccanismo di riparazione NER in combinazione con XPA e può essere portatore di più di cento polimorfismi. In particolare XPC A939C (rs2228001) e XPC C499T (rs2228000) in cui i cambi amminoacidici provocano una diminuzione della capacità di riparazione del DNA, (84) aumento della frequenza di mutazioni a carico della proteina p53 (85) e pertanto un aumento del rischio tumorale.

Infine, il gene ERCC2 codifica per la proteina **XPD**, subunità essenziale del gruppo TFIIH coinvolto nel processo di trascrizione genica e anche nella riparazione del DNA danneggiato da raggi UV.

Il polimorfismo A751C rs13181 livello del codone 751 e consiste in un cambiamento totale nella propria configurazione elettronica e nelle funzioni della proteina. Dato che la riparazione del DNA è fondamentale nel mantenere l'integrità genomica, il polimorfismo A751C è in grado di modificare la capacità riparativa dell'enzima e pertanto aumentare la suscettibilità tumorale. (86)

ERCC1

La proteina ERCC1 è coinvolta, assieme ad altre circa 30 proteine nel pathway di riparazione del DNA NER. Questo complesso è in grado di riconoscere larghe lesioni di circa 20-25 nucleotidi che producono distorsioni bulky nella forma ad elica del DNA. Di particolare interesse è lo SNP a carico del gene ERCC1 nel codone 118 (C118T rs11615) in grado di ridurre l'espressione dell' mRNA e dei livelli proteici. (87)

Questo polimorfismo è una mutazione silente e sembra giocare un ruolo fondamentale nei meccanismi di resistenza in alcuni tipi di tumore.

Il cambio del singolo nucleotide da C a T converte il codone AAC in AAT, entrambi codificanti per l'asparagina. Tuttavia questo cambio riduce l'espressione genica di ERCC1 e di conseguenza riduce l'attività riparativa della proteina ERCC1. (88)

XRCC3

L'enzima codificato dal gene XRCC3 è un membro del sistema riparativo DSBR (Double Strand Break DNA Repair) e gioca un ruolo fondamentale nella ricombinazione omologa, importante per l'integrità cromosomica e per la riparazione del DNA danneggiato. (89,90)

Il polimorfismo XRCC3 T241M rs 861539 consiste in una transizione C/T e sostituzione amminoacidica da Thr a Met nel codone 21. Variazioni nella sequenza di XRCC3 hanno effetti funzionali sulla codifica della proteina e di conseguenza viene alterata la sua capacità di riparare il DNA. (91)

UMPS

Questo gene codifica per uridina 5'-monofosfato sintasi. La proteina codificata è un enzima bifunzionale che catalizza gli ultimi due passaggi nel pathway della biosintesi de novo delle pirimidine. (92)

Meccanismo di detossificazione

GSTP1

Il pathway di detossificazione dei farmaci rappresenta un meccanismo fondamentale per l'efficacia della chemioterapia.

GSTP1 è un'enzima metabolico di fase II e gioca un ruolo molto importante nella difesa cellulare verso numerose sostanze chimiche dannose prodotte a livello esogeno ed endogeno. (93)

Questo enzima protegge dal danno ossidativo catalizzando la coniugazione di ROS e detossificando anche numerosi agenti chemioterapeutici, tra cui agenti alchilanti, composti a base di platino e adriamicina. (94)

In particolare l'enzima GSTP1 (Glutathione S-transferase P1) è uno dei membri della superfamiglia coinvolta nel sistema di difesa cellulare, catalizzando la coniugazione di molti composti idrofobici ed elettrofili con glutathione ridotto. (95)

Sono stati individuati due polimorfismi a carico del sito attivo del gene GSTP1, uno nell'esone 5 (Ile105Val) e l'altro nell'esone 6 (Ala 114Val rs1138272). Entrambi gli SNP provocano una riduzione dell'attività enzimatica. (96)

Molti studi hanno dimostrato che variazioni genetiche a carico dell'enzima GSTP1 (tra cui i polimorfismi Ile105Val e Ala114Val) hanno dimostrato avere un impatto considerevole sulla sopravvivenza e sulla tossicità in diversi tipi di tumore trattati con chemioterapia al platino e radioterapia. (93,97)

In particolare, il polimorfismo GSTP1 Ala114Val aumenta il rischio di ricaduta e morte nei pazienti trattati con chemioterapia al cisplatino. (98,99)

Trasportatori di efflusso del farmaco

MDR1

L'assorbimento ed il trasporto del farmaco sono correlati all'efficacia del trattamento dato che i trasportatori modulano la concentrazione del farmaco all'interno delle cellule. In particolare la glicoproteina P (MDR1) appartenente alla famiglia dei trasportatori di membrana ABC, pompa al di fuori dalle cellule attraverso la membrana plasmatica numerosi composti potenzialmente tossici tra cui molti farmaci come il cisplatino e i taxani. (100)

MDR1 è un gene altamente polimorfico, composto da 28 esoni che possono presentare numerosi polimorfismi che influenzano la funzione della glicoproteina e la resistenza ai farmaci; ciò è stato dimostrato in numerose neoplasie tra cui il tumore al polmone, seno, colonretto e tumori gastrici. (101-104)

Il primo polimorfismo del gene MDR1 individuato è 3435C>T (rs1045642), piuttosto raro nella popolazione caucasica mentre 2677 G>T è maggiormente rappresentato. Quest'ultimo, all'interno dell'esone 21, è in linkage disequilibrium con lo SNP 3435 C>T ed è in grado di provocare un'alterazione di espressione dei livelli di RNA. (105)

Dopo aver selezionato secondo i criteri sopra elencati, gli SNP di interesse è essenziale progettare in modo accurato gli oligonucleotidi (primer) più adatti allo scopo che vogliamo raggiungere e che serviranno da innesco alla DNA polimerasi durante la reazione di amplificazione. Nella fase di progettazione dei primer è fondamentale considerare una serie di fattori:

- specificità di appaiamento
- lunghezza (18-25 bp)
- contenuto in GC (circa 60%); empiricamente, $T_m = 2x(nAT)+4x(nGC)$
- T_m : è opportuno che siano molto vicine (differenze superiori a 2°C possono determinare amplificazioni aspecifiche)
- verificare ed evitare la possibile formazione di strutture secondarie
- l'estremità 3' del primer deve terminare con una GC ma non averne più di 3 consecutive.

I singoli protocolli di reazione di PCR per ogni polimorfismo sono stati messi a punto empiricamente ottimizzando le condizioni tra cui temperatura di melting, numero di cicli, concentrazione di primers o sali e magnesio.

La verifica della qualità dei primers disegnati è stata eseguita mediante PCR in silico dal Genome Browser UCSC.

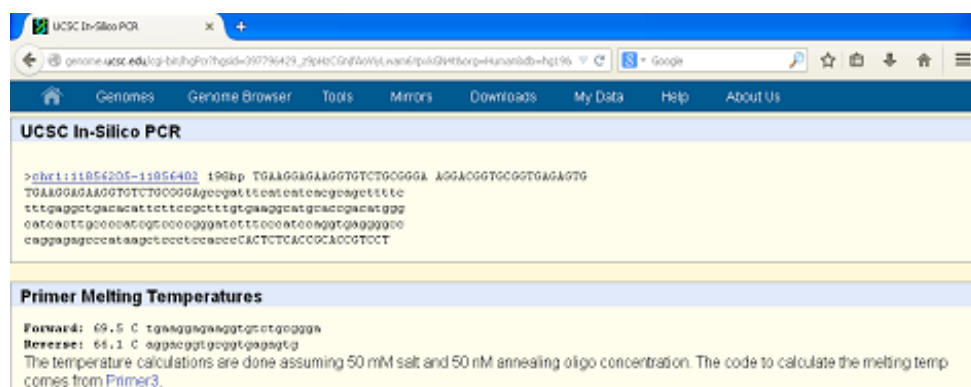


Fig. 17 UCSC In Silico PCR

L'ottimizzazione dei primers è fondamentale per garantire efficienza e selettività. L'efficienza tiene conto di alcuni fattori come per esempio il contenuto di GC, l'efficienza del legame, la complementarietà, la formazione di eventuali strutture secondarie e temperature di melting e annealing. La selettività dei primers è fondamentale per evitare che le coppie di primers si possano legare casualmente ad altri siti oltre che nel sito di interesse della sequenza creando dei prodotti multipli aspecifici.

PCR-RFLP

L'analisi RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) identifica un cambio nucleotidico nella sequenza genetica che avviene in un determinato sito dove un'enzima di restrizione taglia.

Questa tecnica può essere utilizzata nei pattern di eredità, per identificare mutazioni specifiche o per le tecniche di genetica molecolare.

Gli enzimi di restrizione sono proteine isolate da batteri che sono in grado di riconoscere sequenze corte e specifiche di DNA e tagliarne in questi siti

specifici. La normale funzione di questi enzimi nei batteri è quella di proteggere l'organismo da attacchi esterni di DNA come per esempio DNA virale.

La tecnica è molto semplice; l'enzima di restrizione viene aggiunto al DNA che deve essere analizzato e incubato per alcune ore, permettendo all'enzima di tagliare la sequenza dopo aver riconosciuto il sito esatto. Successivamente, il DNA "digerito" viene fatto correre su gel che separa i frammenti di DNA in base alla loro dimensione. Visualizzando il gel dopo la corsa elettroforetica si potranno riconoscere i frammenti di DNA in cui è stato effettuato o no il taglio da parte dell'enzima di restrizione.

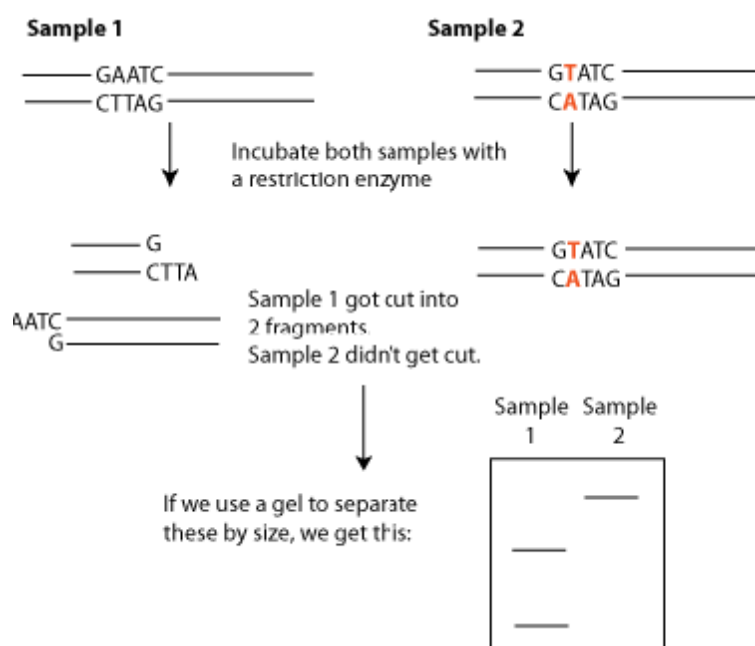


Fig. 18 Schema esemplificativo della tecnica PCR-RFLP

In particolare, è necessario utilizzare un'adeguata concentrazione dei diversi componenti di DNA, enzima e buffer per ottenere una digestione enzimatica ottimale. In generale, 1 unità di enzima di restrizione è in grado di digerire completamente 1 µg di substrato di DNA in un volume di reazione totale di 50 µL in 60 minuti. Questa regola può essere utilizzata come guida nel progettare una reazione che successivamente potrà essere adattata empiricamente per esempio andando a modificare la quantità di buffer nella reazione di digestione in base alle condizioni di variabilità del DNA in termini di quantità e purezza.

L'enzima di restrizione deve essere maneggiato con cura e mantenuto in ghiaccio; solitamente è l'ultimo componente ad essere aggiunto alla reazione. Il DNA utilizzato per la reazione deve essere libero da contaminanti quali fenolo, cloroformio, alcool, EDTA, detergenti o eccessiva quantità di sali. Tutti i componenti della reazione devono essere mescolati pipettando su e giù e senza utilizzare il vortex. Il tempo di digestione è generalmente di un'ora ma come la temperatura può variare a seconda dell'enzima. Il termine della reazione di digestione viene solitamente eseguito con shock termico, bloccando l'attività enzimatica in ghiaccio.

Per ogni polimorfismo è stato studiato un protocollo di PCR-RFLP specifico ottimizzando le condizioni della reazione di PCR e di digestione enzimatica.

Il protocollo di reazione di digestione enzimatica di ogni sequenza con il proprio enzima è stato definito utilizzando il software Restriction Mapper in grado di individuare virtualmente, in base alla sequenza e alla mutazione, un enzima di restrizione adeguato considerando il proprio sito di restrizione.

Untitled digest

Enzymes: HindIII

Length	5' Enzyme	5' Base	3' Enzyme	3' Base	Sequence
176	HindIII	23	none	198	AGTGGATTTC ATCATCAAGC AGCTTTTCTT TGAGGCTGAC ACAATCTTCC GTTTTGTGAA GGCATGCAAC GACATGGGCA TCACITTGCCC CATCTGCCCC GGGATCTTTC CCATCCAGGT GAGGGGCCA GGAGAGCCCA TAAGCTTCCCT CCACCCCACT CTCACCGCAC CGTCTC
22	none	1	HindIII	22	TGAAGGAGAA GGTCTCTGCG GG

Fig. 19 Digestione enzimatica virtuale mediante RestrictionMapper

Tutte le reazioni di PCR sono state eseguite utilizzando i seguenti reagenti: MgCl₂ 50 mM, Buffer 10x, dNTPs 10mM, primer forward 10 µM, primer reverse 10 µM, AmpliTaq Gold DNA Polymerase Hot Start Applied Biosystem 5 unità/µL e acqua distillata fino a raggiungere un volume di reazione totale di 50 µL. L'eteroterma varia per ogni reazione in termini di temperatura di annealing e numero di cicli.

I prodotti di PCR sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica a 90V per circa 60 minuti su gel di agarosio 2% in TAE 1x utilizzando un adeguato marcatore di peso molecolare in base alla dimensione dei frammenti amplificati. Mentre i prodotti di digestione enzimatica sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica a 90V per circa 60 minuti su gel MetaPhore 3% in TBE 1x.

dHPLC

Il sistema dHPLC (denaturing High Performance Liquid Chromatography) è un metodo cromatografico utile per individuare sostituzioni di basi, piccole inserzioni o delezioni nel DNA. Grazie alla sua alta velocità e risoluzione, questo metodo è particolarmente indicato per individuare i polimorfismi nelle valutazioni genotipiche in numerosi studi di farmacogenetica.

In pratica, l'analisi è preceduta da una reazione di PCR standard per amplificare il segmento di DNA di interesse contenente il polimorfismo che si vuole studiare.

Il concetto principale del sistema dHPLC si basa sulla presenza di una colonna di separazione costituita da copolimeri (beads) di polistirene-divinilbenzene (PS-DVB) che costituisce la fase stazionaria. Le beads sono alchilate con catene C-18 che formano singoli legami C-C. Di natura, le beads della colonna sono elettrostaticamente neutre ed idrofobiche e non reagiscono con gli acidi nucleici.

Il trietilammonio acetato (TEAA) è un agente che lega gli ioni in grado di agire da "ponte molecolare" per permettere l'assorbimento degli acidi nucleici alle beads. Questo reagente è sia idrofobico che carico positivamente, interagisce con le cariche negative dei fosfati del DNA, mentre i gruppi idrofobici reagiscono con le catene idrofobiche C-18 sulle beads di PS-DVB. Pertanto il TEAA crea un ponte tra l'acido nucleico e la matrice della colonna.

La fase mobile invece consiste in una combinazione di tamponi in grado di eluire il DNA dalla colonna. In particolare, viene utilizzata una soluzione 0.1 M di TEAA mescolata con il 25% di acetonitrile in grado di rompere il legame tra matrice e DNA.

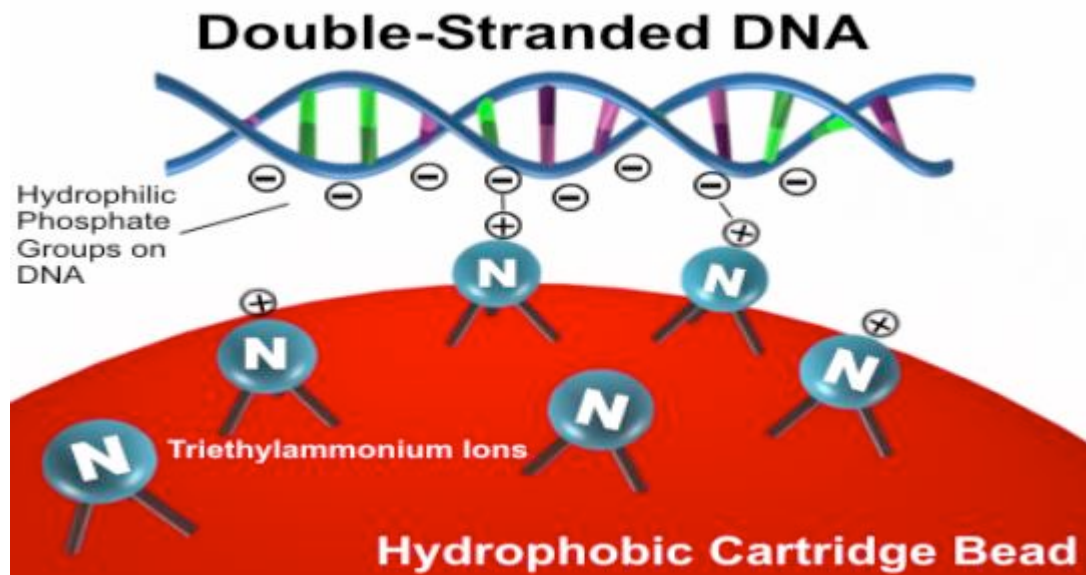


Fig. 20 Chimica di separazione: trietilammonio interagisce idrofobicamente con la matrice. La carica positiva degli ioni di trietilammonio interagiscono elettrostaticamente con le cariche negative all'interno della struttura del DNA.

Il sistema dHPLC utilizzato per questo studio è Wave System di Transgenomic ed è costituito da un degasatore, un sistema pompa, un autocampionatore formato da due piastre da 96 pozzetti, un fornetto, un detector a UV e la colonna di separazione.



Fig. 21 dHPLC Wave System Transgenomic utilizzata

L'autocampionatore è un sistema di iniezione che permette di avere una grande precisione nel volume di ogni campione analizzato e consente di rendere estremamente automatizzata questa procedura. Il sistema pompa assicura invece un flusso costante e stabile della fase mobile attraverso la colonna di separazione cromatografica, garantisce inoltre la pressione adatta per far scorrere gli eluenti attraverso la fase stazionaria.

Il sensore spettrofotometrico di rilevamento trasforma il segnale analogico in un valore digitale; i detector fanno passare un fascio di luce attraverso l'eluente mentre questo scorre lungo la colonna e le variazioni nelle intensità della luce dovute all'assorbimento UV o all'emissione fluorescente vengono monitorate. Si ottiene così un cromatogramma in cui per ciascun soluto presente viene indicato il tempo di ritenzione e l'area del picco.

Questo sistema è in grado di operare a livello analitico in tre modalità differenti: non denaturante, semi-denaturante e totalmente denaturante. L'analisi non denaturante viene fatta ad una temperatura di 50°C ed è molto utile per verificare la qualità, la purezza della PCR e per conoscere le dimensioni del frammento di DNA a doppio filamento.

L'analisi parzialmente denaturante viene fatta in un range di temperatura piuttosto ampio in base alla sequenza in studio, dai 52°C ai 75°C circa ed è

molto utile per individuare mutazioni e SNP. Infine il metodo completamente denaturante viene eseguito a 75-80°C e viene utilizzato per identificare la

dimensione di un frammento di DNA a singolo filamento, per analizzare RNA o per valutare la qualità degli oligonucleotidi.

Per questo studio il metodo dHPLC Wave System è stato utilizzato in condizioni parzialmente denaturanti per poter individuare il polimorfismo di interesse. La chimica di separazione si basa sulle dimensioni, sulla sequenza e sulla temperatura di analisi.

Il protocollo prevede l'amplificazione separata dell'allele "normale" e del presunto allele mutato; si procede poi con il mix dei due amplificati in una unica provetta. Successivamente si porta il campione a denaturazione ad una temperatura di circa 95°C, con un successivo lento raffreddamento. La denaturazione dovuta all'elevata temperatura porta i frammenti di DNA allo stato di singolo filamento; con il raffreddamento, si osserva un riappaiamento delle sequenze: da questa situazione si possono generare, se la mutazione è presente, 4 possibili configurazioni: omoduplex wild type, omoduplex mutanti e 2 varianti di eteroduplex. Il DNA eteroduplex si genera quando un frammento amplificato di DNA mutato ed uno non mutato vengono a contatto, l'omoduplex è invece costituito dall'appaiamento di due frammenti identici. Si formano in tal modo le coppie di omoduplex e di eteroduplex che vengono iniettate dentro una colonna di cromatografia denaturante.

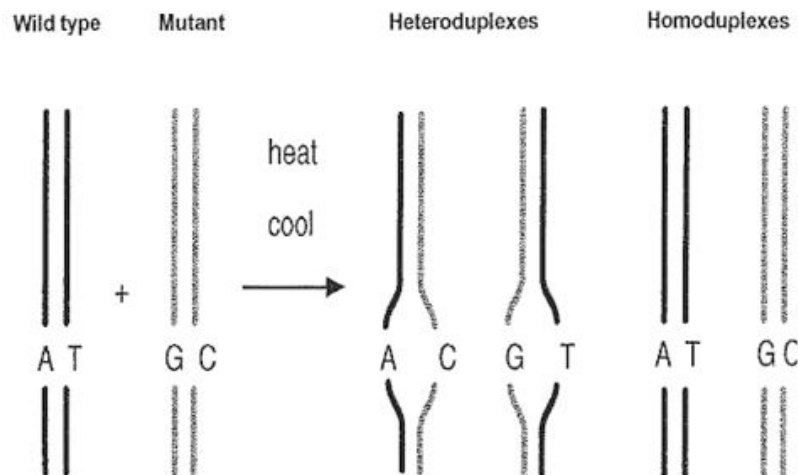


Fig. 22 Rappresentazione schematica della formazione di eteroduplex

Una qualsiasi variazione tra la molecola originale (wild type) e quella mutata porta alla formazione di un eteroduplex (appaiamento di due singoli filamenti di DNA non perfettamente corrispondenti, caratterizzata perciò dalla presenza di una "bolla" dovuta al non appaiamento nel punto dove è avvenuta la mutazione). Gli eteroduplex, con misappaiamento di coppie di basi, si comportano cromatograficamente in modo diverso rispetto agli omoduplex, infatti eluiscono dalla colonna prima rispetto agli omoduplex, perché l'eteroduplex ha una capacità di legare il TEAA inferiore ad una molecola omoduplex, presentando tempi di ritenzione differenti.

Ciò è dovuto al fatto che nel punto della mutazione si formano delle porzioni di DNA a singola elica (dette bolle), poiché le due singole eliche non sono in grado di formare legami a idrogeno in quanto le basi risultano non correttamente appaiate.

La proprietà fondamentale di tali bolle, nel DNA a doppia elica, è quella di avere una minore densità di gruppi fosfato e quindi, una minore densità di carica rispetto al doppio filamento, garantendo una minore ritenzione della molecola di acido deossiribonucleico sulla fase stazionaria e un tempo di eluizione inferiore a quello dell' omoduplex.

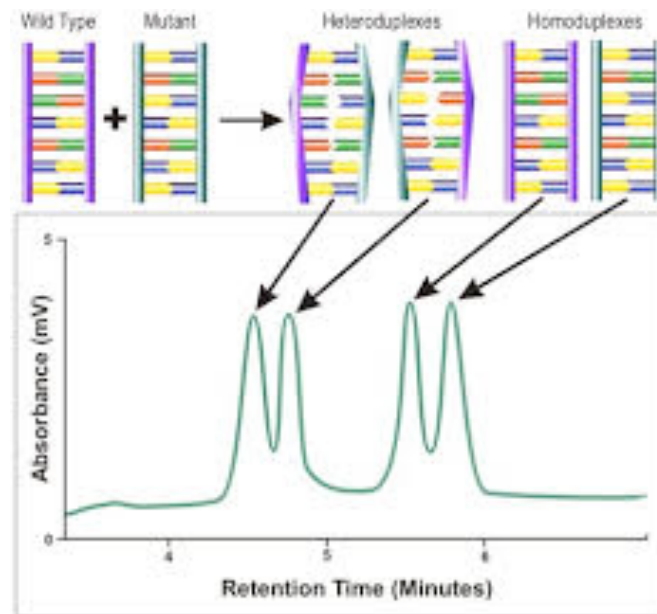


Fig. 23 Distinzione tra cromatogrammi in presenza o meno della mutazione sul DNA.

La DHPLC rileva la differenza tra la molecola dell' omoduplex che ad una determinata temperatura è ancora sotto forma di due filamenti e quella dell'eteroduplex che alla stessa temperatura mostra una parziale denaturazione in corrispondenza del sito dove si è verificato un mis-appaiamento. (106) La presenza di una mutazione si evidenzia sotto forma di picchi ulteriori rispetto al "wild type"; il grande vantaggio è che pur non caratterizzando la mutazione (cioè non viene definito come è stata modificata la sequenza) la DHPLC è in grado di rivelarne la presenza all'interno del frammento analizzato. L'analisi viene eseguita ad una temperatura sufficiente per poter denaturare (melt) parzialmente gli eteroduplex di DNA. Nel caso del polimorfismo che vogliamo indagare, UMPS G638C, la temperatura di melt è 59°C. Gli eteroduplex denaturati vengono distinti dai corrispondenti omoduplex mediante la cromatografia liquida in fase inversa ad accoppiamento ionico. Differenti tempi di ritenzione sulla matrice della colonna permettono di distinguere chiaramente i polimorfismi. Il meccanismo di ripartizione in fase inversa ad accoppiamento ionico (RP-IPHPLC), separa le molecole e le eluisce sulla base della dimensione crescente delle molecole.

Una molecola viene trattenuta dalla fase stazionaria o trasportata dalla fase mobile in dipendenza del suo coefficiente di ripartizione (CR).

La ripartizione di un componente nelle due fasi viene descritta dal suo coefficiente di ripartizione o di distribuzione che è dato dal rapporto tra la concentrazione del componente in una delle due fasi e la concentrazione del componente nell'altra fase:

$$K_d = [\text{componente}] \text{ nella fase 1} / [\text{componente}] \text{ nella fase 2}$$

Il valore di tale coefficiente ad una determinata temperatura è costante e dipende dalla natura chimica del sistema, inteso come l'insieme delle due fasi e del componente stesso.

Variando nel tempo la concentrazione della componente organica nella fase mobile possono essere eluite in tempi diversi molecole con differenti CR.

Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando SAS, versione 9.2 e GraphPad Prism versione 4.0 per Windows (GraphPad Software, San Diego California, USA, www.graphpad.com).

Le associazioni tra i polimorfismi genetici individuali ed outcome sono stati analizzati in accordo ai modelli genetici dominanti (combinando gli eterozigoti e le varianti omozigoti rare), recessivi (combinando gli eterozigoti e le varianti omozigoti comuni) e additivi (con tre gruppi separati). Le analisi sono state inoltre eseguite confrontando gli eterozigoti versus i genotipi omozigoti comuni o rari.

La risposta patologica completa (CR) è stata definita come assenza di tumore (ypT0N0); la risposta patologica completa parziale (nCR) è stata definita come presenza di microfoci di cellule tumorali nel sito primario con linfonodi negativi; i restanti pazienti sono stati classificati come non responsivi (NR). I pazienti CR ed nCR sono stati classificati invece come responsivi.

La cancer specific survival (CSS) è stata definita come il tempo tra la diagnosi e la morte causata dal tumore; il relapse free survival (RFS) è stato definito come il tempo tra l'inizio della terapia e la prima evidenza di ricaduta della malattia.

Le curve di sopravvivenza sono state calcolate con il metodo Kaplan-Meier e confrontate utilizzando il log rank test.

Per considerare gli SNPs multipli, sono stati verificati simultaneamente il p value di significatività definito in accordo con la correzione di Bonferroni nel modo seguente: $p \leq 0.05/\text{numero di polimorfismi}$. Pertanto, nel seguente studio le associazioni genetiche con $p \leq 0.004$ sono state considerate come conclusioni vere.

L'endpoint principale era il RFS; è stato valutato un campione di 120 pazienti per ottenere un HR di 2.0 per RFS con una potenza dell' 80%.

([http://www.statstodo.com/SSizSurvival_Pgm.php#Single calculation:sample size extimation](http://www.statstodo.com/SSizSurvival_Pgm.php#Single%20calculation:sample%20size%20extimation))

I genotipi che hanno ottenuto $p \leq 0.1$ in RFS in analisi univariata sono stati inclusi nel pannello dell'analisi multivariata; i pannelli predittivi migliori sono stati scelti in base al più alto numero di pazienti correttamente discriminati in un gruppo ad

alto (RFS a 5 anni \leq al 35%) o basso rischio (RFS a 5 anni \geq al 65%). Questi gruppi sono stati definiti come classi di rischio informative.

Le analisi ROC (Receiver Operating Characteristic) sono state eseguite per valutare l'idoneità dei modelli nel predire il rischio di ricaduta nei 5 anni successivi; i pazienti esaminati prima dei 5 anni di follow up sono stati esclusi e i modelli sono stati considerati buoni predittori quando l'area al di sotto delle curve ROC (ROC-AUC) era al di sopra 0.7.

La sensibilità, la specificità, il valore predittivo positivo (PPV) e il valore predittivo negativo (NPV) sono stati calcolati con un intervallo di confidenza del 95% (95% CI).

A causa della relativa bassa incidenza dei tumori esofageo e GEJ, le nostre serie, sebbene significative, sono state insufficienti a suddividere con adeguato potere in set di validazione e di training.

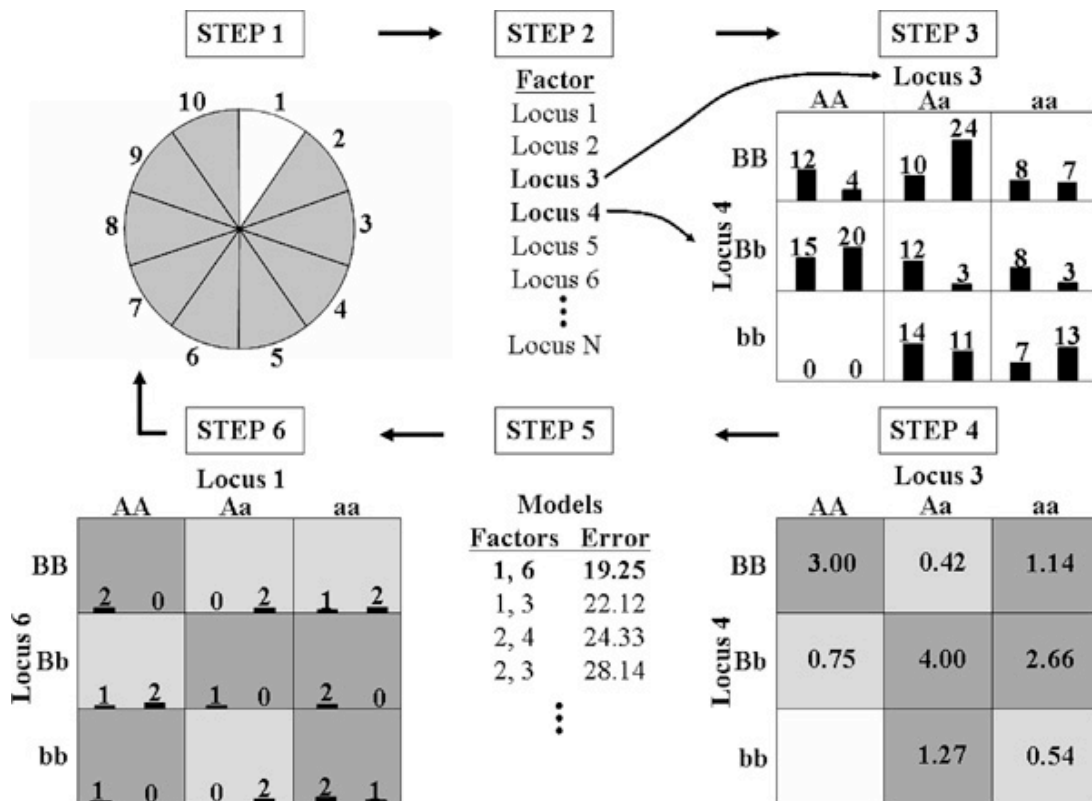
Per valutare la prestazione dei modelli sviluppati ed escludere overfitting, è stata applicata una strategia di ri-campionamento utilizzando l'analisi non parametrica Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) (<http://www.multifactordimensionalityreduction.org>).

Questo metodo è basato su un metodo di cross validazione in grado di valutare ogni combinazione degli attributi (12 variabili genetiche e 4 variabili cliniche) per 10 volte. La performance del modello è stata definita in accordo all'errore di predizione e la significatività statistica è stata determinata mediante test di permutazione. Dato che l'algoritmo MDR comprime i dati multidimensionali in un'unica dimensione con due classi di rischio (alta e bassa), per questa analisi è stata richiesta una significatività statistica con p value inferiore a 0.05.

MDR è un approccio non parametrico e model-free di estrazione dei dati per individuare le combinazioni di attributi o variabili indipendenti che interagiscono tra loro in modo non lineare al fine di determinare il valore assunto da una variabile di classe. MDR è stato progettato per identificare le interazioni tra le variabili discrete che influenzano un risultato binario, ed è considerato una valida alternativa non parametrica, ai tradizionali metodi statistici.

La base del metodo MDR è un algoritmo di induzione che converte due o più variabili in un singolo attributo. Questo processo per la realizzazione di un nuovo attributo modifica lo spazio di rappresentazione dei dati. L'obiettivo finale è quello di creare una rappresentazione che facilita l'individuazione delle interazioni non-lineari tra i vari attributi, in modo tale che la previsione della variabile di classe sia migliore rispetto a quella della rappresentazione originale dei dati.

Fig. 24 Riassunto dei passaggi principali del metodo MDR



L’algoritmo MDR è costituito da sei passaggi raggruppate in tre macrofasi. L’algoritmo prevede come input un insieme di dati che riportano le informazioni relative ad un certo numero di casi (persone affette dalla malattia analizzata) e controlli (persone non affette dalla malattia analizzata). Per ogni paziente si inseriscono tutte le caratteristiche genotipiche e fenotipiche o parte di queste caratteristiche in relazione al tipo di malattia considerata, insieme con lo stato della malattia (affetto o non affetto). L’algoritmo cerca il modello N-dimensionale che rappresenta meglio l’insieme dei dati selezionati. (107)

Primo passo–selection: i dati vengono divisi casualmente in p parti (es. in 10 parti uguali) per creare due insiemi complementari: uno chiamato training set (es. 9/10 dei dati) mentre un secondo chiamato testing set (es. 1/10 dei dati). MDR viene eseguito per ogni combinazione dei casi presenti nel primo insieme ed impiegato per fare previsione circa lo stato della malattia per tutti i possibili casi contenuti nel secondo insieme; questo consente di eseguire una validazione incrociata dei dati (passaggio 1, figura 24). La proporzione di soggetti per i quali è stata fatta una previsione errata è una stima dell’errore di previsione che verrà successivamente eseguita al termine del terzo passo. I parametri N sono scelti dal pool di tutti i parametri (passaggio 2, figura 24), la sezione può essere esaustiva (cioè tutte le combinazioni di parametri sono esplorate) o guidata dall’utente. *Secondo passo – model building:* definizione di un modello cioè uno spazio N-dimensionale equivalente al prodotto cartesiano dei parametri del domino selezionati nel passo 1 (passaggio 3, figura 24; le barre relative ad ogni cella rappresentano le distribuzioni dei casi ipotetici (a sinistra) e dei controlli (a destra) con ogni possibile combinazione dei fattori). La dimensione di un parametro genetico di un dominio è il numero di valori che una variante genetica può assumere (negli esseri umani questo numero è fissato a tre).

Le variabili fenotipiche invece sono quasi sempre delle variabili booleane. Durante questa fase ogni dato è classificato all'interno di una cella dello spazio N-dimensionale, per ogni cella due contatori tengono traccia del numero di casi e di controlli.

Terzo passo – model evaluation: per ogni cella del modello, se il rapporto caso/controllo è superiore o uguale a una soglia predefinita (di solito 1.0) la cella è etichettata come ad alto rischio, altrimenti è etichettata come a basso rischio (passaggio 4, figura 24; Le celle grigio scuro rappresentano le combinazioni del genotipo ad alto rischio, mentre le celle colorate di grigio chiaro rappresentano combinazioni a basso rischio. Le celle bianche rappresentano combinazioni del genotipo per le quali non è stato osservato alcun dato). In questo modo, un modello per entrambi i casi ed i controlli è formato da un primo insieme di celle ad alto rischio e da un secondo insieme di celle a basso rischio. Questo consente di ridurre il modello n-dimensionale ad un modello mono-dimensionale cioè ottenere una variabile con due classi di rischio multifattoriale etichettate come alto e basso rischio. Una volta che tutte le celle sono etichettate, il modello viene valutato stimando il suo errore di previsione (passaggi 5-6, figura 24). Questo processo viene ripetuto finché tutte le possibili combinazioni di parametri vengono elaborate.

RISULTATI

Tumore al retto

La popolazione in studio consiste in 70 pazienti arruolati con tumore al retto in stadio II e III, di cui 18 femmine e 52 maschi con età media di 62 anni.

Le risposte a livello tumorale sono state direttamente valutate sui campioni chirurgici e ordinate secondo classificazione TNM. I pazienti sono stati considerati come responsivi (se pT0 ovvero in caso di completa scomparsa del tumore e pertanto considerati aver raggiunto la risposta completa; pT1 o pT2 in caso di risposta parziale) o non responsivi (se pT3 o pT4).

I pazienti che hanno risposto alla radiochemioterapia a livello tumorale sono stati pertanto suddivisi nel seguente modo: pT0 25,7%, pT1-pT2 34,3% e pT3-pT4 40%. Pertanto poco meno della metà dei pazienti non ha risposto al trattamento, in accordo con i dati di letteratura.

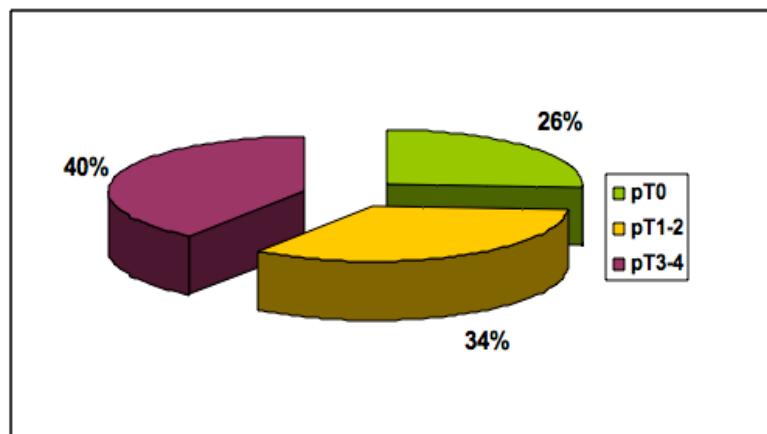


Fig. 25 Percentuale di pazienti con tumore al retto che hanno risposto alla CRT.

Tumore all'esofago

La popolazione in studio consiste in 124 pazienti (104 maschi e 20 femmine), età mediana 60 anni (range 42-74), 62 (50%) con adenocarcinoma e 62 con carcinoma squamoso; la mediana di follow up dell'intera popolazione era di 41 mesi (range 4.6-137.5) e 82 mesi (range 6.3-137.5) per i pazienti viventi.

Successivamente alla radiochemioterapia, la CR è stata ottenuta da 55 pazienti (45.1%), la nCR in 18 pazienti (14.7%) mentre 49 pazienti (40.5%) sono risultati non responsivi. Due pazienti non sono stati valutati perchè non hanno eseguito l'intervento chirurgico.

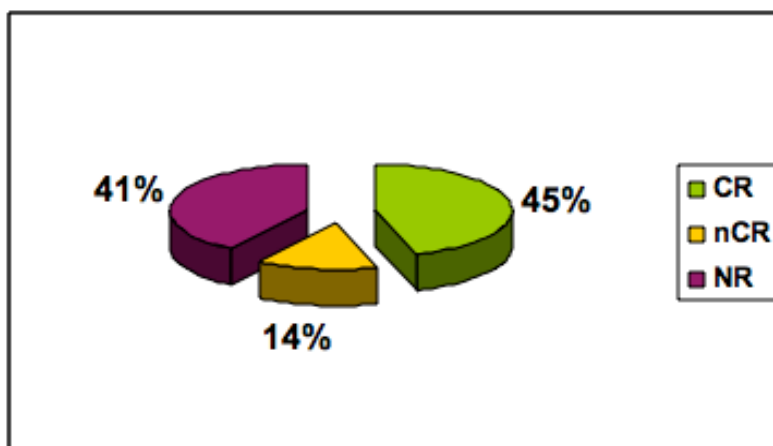


Fig. 26 Percentuale di pazienti con tumore all'esofago che hanno risposto alla CRT

60 pazienti sono ricaduti (48.4%) con un tempo mediano di ricaduta di 13.2 mesi (range 2-45); le percentuali di RFS erano 53.6% e 48.7% a 3 e 5 anni rispettivamente.

53 pazienti sono deceduti a causa del tumore (42,7%); le percentuali di CSS erano 65.2% e 53.6% a 3 e 5 anni rispettivamente; nessun decesso è avvenuto dopo i 62 mesi. La sopravvivenza non è stata influenzata dal genere, età o istologia.

Genotipizzazione

La genotipizzazione è stata correttamente eseguita nel 99.5% dei casi e la concordanza con i campioni rianalizzati è stata del 100%. Le distribuzioni dei genotipi rispetta l'equilibrio di Hardy-Weinberg per tutti i polimorfismi studiati e sono simili alle frequenze riportate nella popolazione caucasica (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)

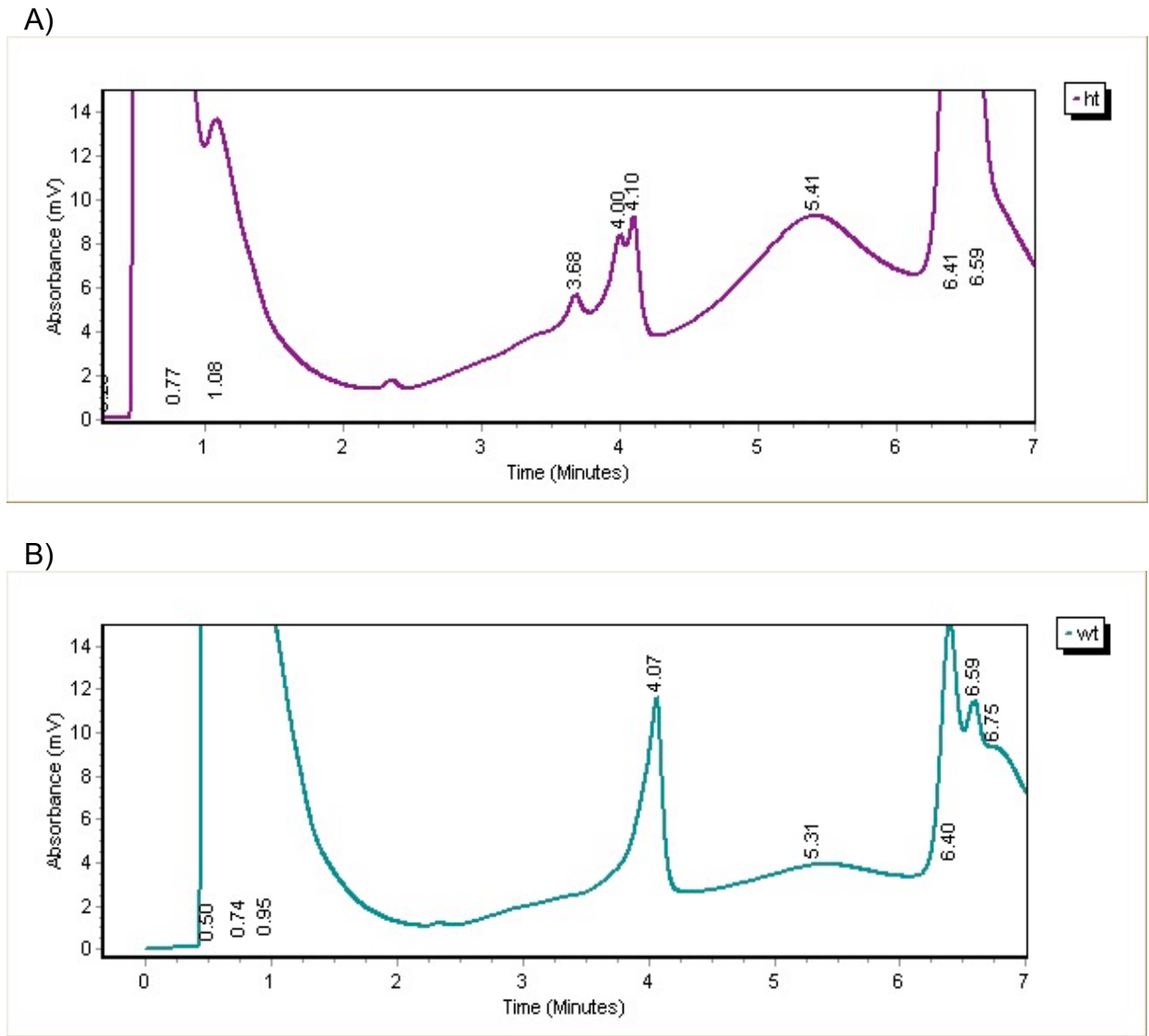


Fig. 27 Cromatogrammi dhPLC, UMPS G638C A) profilo genotipo eterozigote; B) profilo genotipo omozigote wild type o mutato.

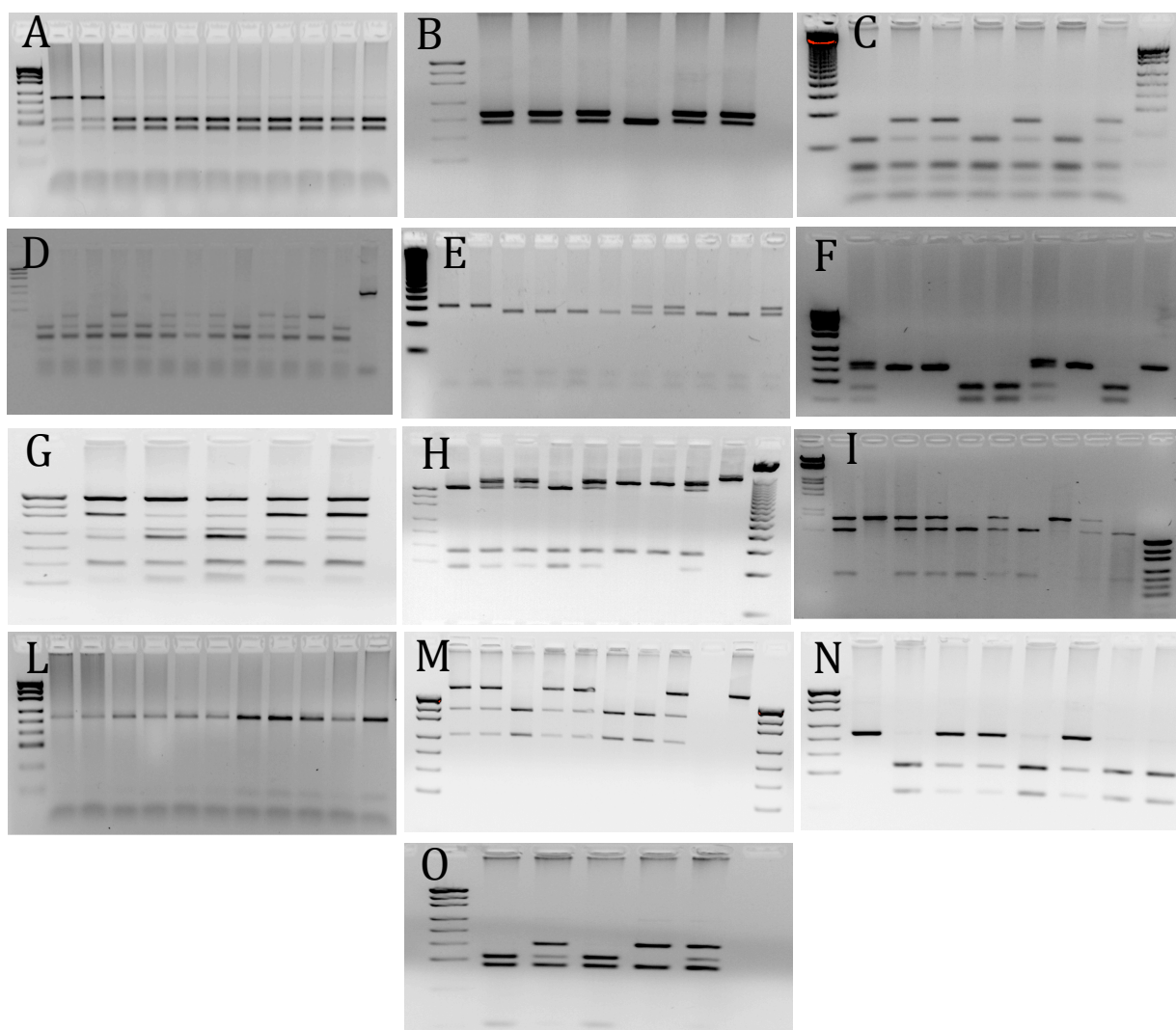


Fig. 28 PCR-RFLP A) GSTP C114T B) MTHFR C677T C) MTHRF A1298C D) TS 5' UTR E) XPC C499T F) TS 3' UTR G) XRCC3 T241M H) XPD A751C I) XPC A939C L) MDR1 G2677T M) XRCC1 G399A N) ERCC1 T118C O) XPA A23C

Associazioni genotipo-risposta patologica nei pazienti con tumore al retto ed esofageo

Le genotipizzazioni di tutti i pazienti sono state correlate con la risposta patologica. L'analisi statistica con il test chi quadro non ha mostrato nessuna correlazione tra genotipi e risposta patologica nel gruppo di pazienti con tumore al retto. E' stato eseguito anche il test di regressione logistica e non sono state osservate correlazioni tra il genotipo, età, sesso e risposta patologica nel gruppo di pazienti con tumore al retto.

Al contrario invece utilizzando il metodo MDR abbiamo dimostrato una correlazione significativa tra la combinazione delle varianti genetiche XRCC1/MTHFR677 e la risposta maggiore ($p=0.0009$) che è stata correttamente predetta nel 77,8% dei pazienti affetti da tumore al retto.

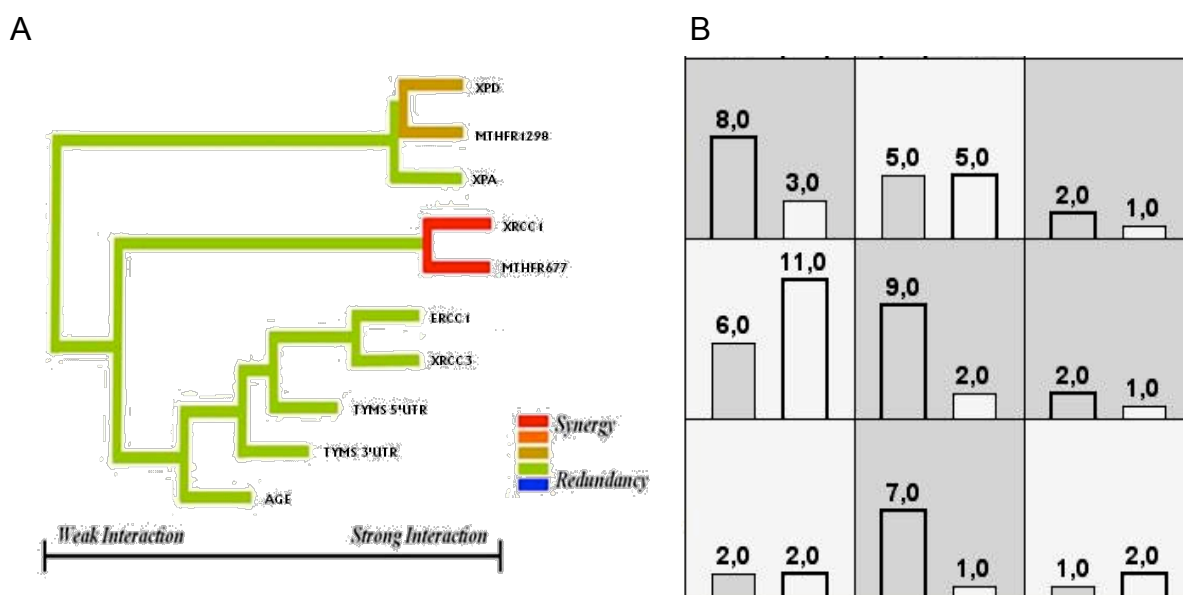


Fig. 29 Rappresentazioni grafiche dei risultati ottenuti con il metodo MDR
 A) Entropia: tipo e intensità di interazione fra tutti i fattori analizzati
 B) Modello grafico: schema a N dimensioni con numero di casi e controlli e classificazione alto/basso rischio

Per quanto riguarda il gruppo di pazienti con tumore esofageo è stata analizzata la correlazione tra genotipi e risposta patologica mediante analisi univariata. In questo gruppo di pazienti, il polimorfismo XPC Lys939Gln è risultato predittivo di risposta. Infatti questo SNP è stato significativamente associato alla risposta patologica dato che i pazienti con genotipo wild type nell' 84.1% dei casi ha ottenuto una risposta completa o maggiore rispetto al 52.6% e 40% dei casi rispettivamente nei pazienti eterozigoti e Gln omozigoti ($p=0.0006$). Nessuna altra associazione statisticamente significativa è stata trovata con gli altri SNPs.

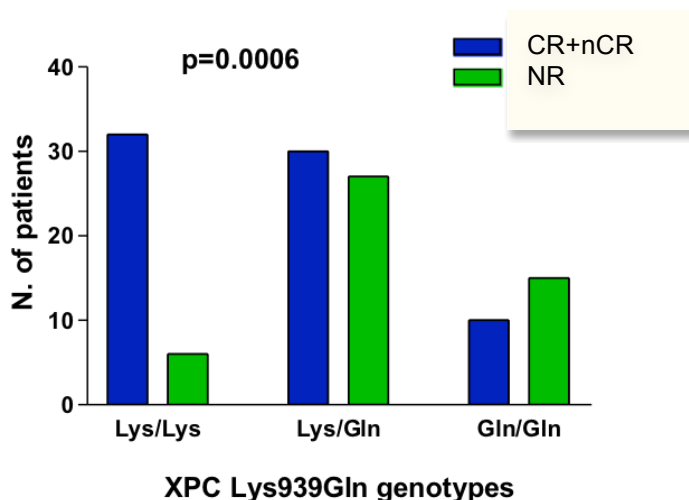


Fig. 30 Distribuzione dei genotipi di XPC Lys939Gln e risposta patologica nei pazienti con tumore all'esofago.

Mentre, nel gruppo dei pazienti con tumore al retto, come citato sopra, non è stata rilevata nessuna correlazione statistica significativa tra tutti i polimorfismi e la risposta patologica in analisi univariata. In particolare, il polimorfismo XPC Lys939Gln, predittivo di risposta nelle neoplasie esofagee, non era associato ad una significativa riduzione della massa tumorale nelle forme rettali ($p=0.37$).

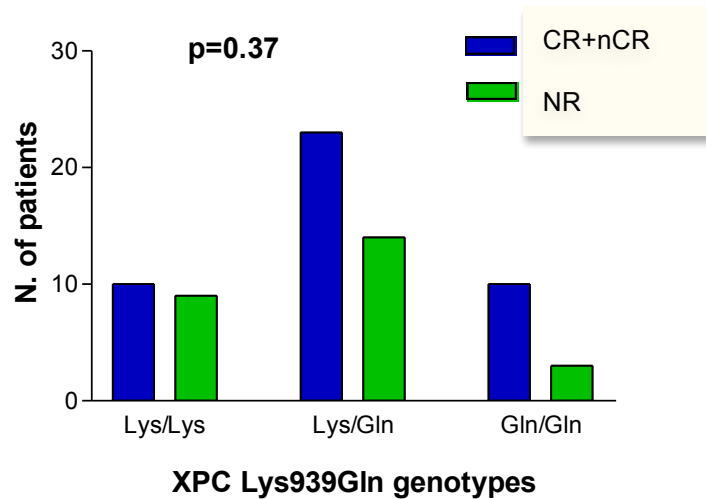


Fig. 31 Distribuzione dei genotipi di XPC Lys939Gln e risposta patologica nei pazienti con tumore al retto.

Associazioni genotipo-outcome nei pazienti con tumore all'esofago

Le analisi univariate mostrano che i genotipi MTHFR 677TT, MDR1 2677GT, GSTP1 114CC, XPC 499CC, e XPC 939AC+CC sono associati a un ridotto RFS con p value ≤ 0.1 e pertanto sono state definite come varianti ad alto rischio e utilizzate per generare un pannello a 5 SNPs.

Un modello che include questi 5 polimorfismi ha discriminato tre sottogruppi numericamente simili, portatori di 0-2 ($n=48$), 3 ($n=38$) e 4-5 ($n=34$) genotipi ad alto rischio, per i quali è stato calcolato un RFS a 5 anni di 67.1%, 50% e 20.9% ($p=0.0002$) rispettivamente e un CSS a 5 anni di 71.1%, 55.8% e 25.8% ($p=0.0003$) rispettivamente.

High risk genotypes distribution	n	%
0-2	48	40.0
3	38	31.7
4-5	34	28.3
tot	120	100

Fig. 32 Suddivisione dei pazienti nei tre sottogruppi del pannello a 5 SNPs. La risposta patologica è stata combinata con i dati istologici: i pazienti con maggior grado di risposta (pCR o nCR) erano quelli con carcinoma a cellule squamose (72.2%) rispetto ai pazienti con adenocarcinoma (49.2%) ($p=0.016$).

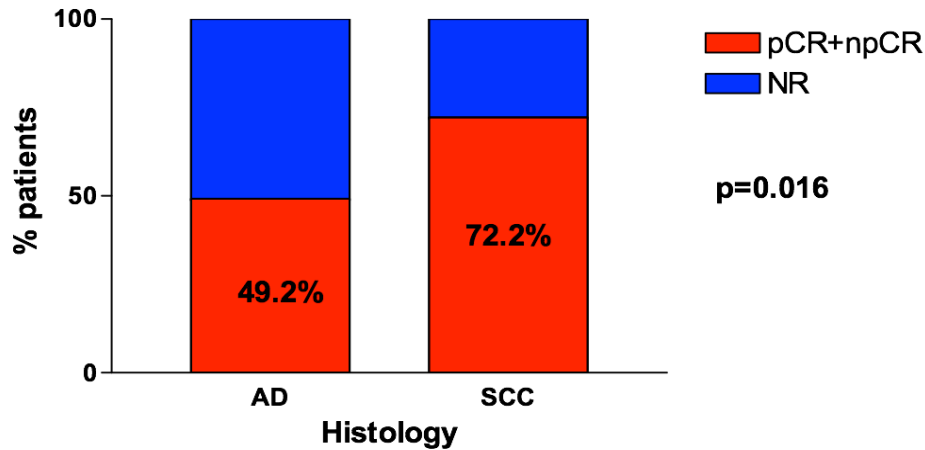


Fig. 33 Combinazione tra risposta patologica ed istologia

La risposta patologica è stata combinata con il pannello a 5 SNPs: I pazienti con 0-3 genotipi ad alto rischio avevano una percentuale di risposta (pCR o nCR) del 68.6% contro il 38.2% dei pazienti con 4-5 genotipi ad alto rischio ($p=0.0035$).

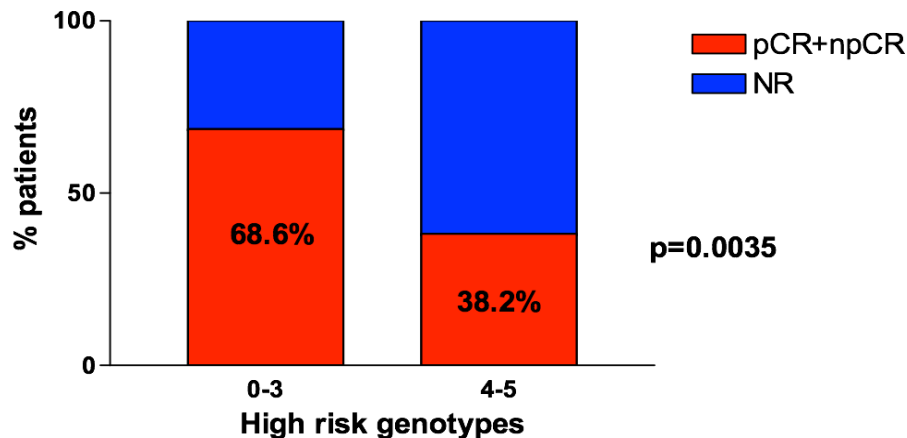


Fig. 34 Combinazione tra risposta patologica e genotipi ad alto rischio

I pazienti con adenocarcinoma (ADK) e carcinoma a cellule squamose (SCC) erano distribuiti equamente nei genotipi ad alto rischio ($p=0.4$). Combinando i dati istologici con il pannello di 5 SNPs e la risposta patologica: sono state ottenute 6 classi con percentuali di risposta che variano dal 82% (SCC con 0-2 genotipi ad alto rischio) al 28% (ADK con 4-5 genotipi ad alto rischio) ($p=0.0075$).

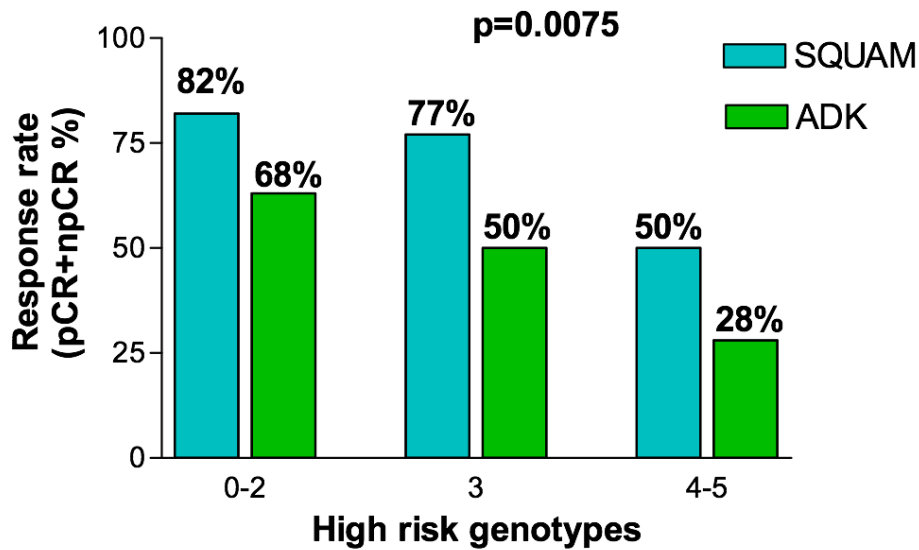


Fig. 35 Combinazione tra risposta patologica, istologia e genotipi ad alto rischio.

I valori mediani di RFS e CSS per i pazienti con 4-5 varianti genotipiche ad alto rischio sono stati rispettivamente 18.6 mesi (HR 2.66, 95%CI 1.8-6.3, $p < 0.0001$) e 34.9 mesi (HR 2.66, 95%CI 1.8-6.3, $p < 0.0001$); mentre i valori mediani di RFS e CSS per i pazienti con 0-3 genotipi sfavorevoli non sono ancora stati raggiunti.

L'area al di sotto della curva ROC di ricaduta era di 0.73 (95%CI 0.62-0.83, $p < 0.001$).

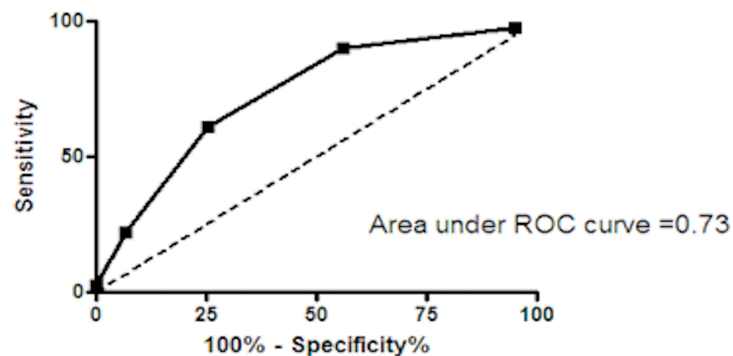


Fig. 36 Area sotto la curva ROC

Per quanto riguarda la sopravvivenza: il pannello a 5 SNPs è stato combinato con RFS e CSS a 5 anni.

Il pannello a 5 SNPs ha discriminato 3 sottogruppi con differenti percentuali di RFS (67.1%, vs 50.0% vs 20.9%, $p = 0.0002$) e CSS (71.1% vs 55.8% vs 25.8%, $p = 0.0003$) a 5 anni.

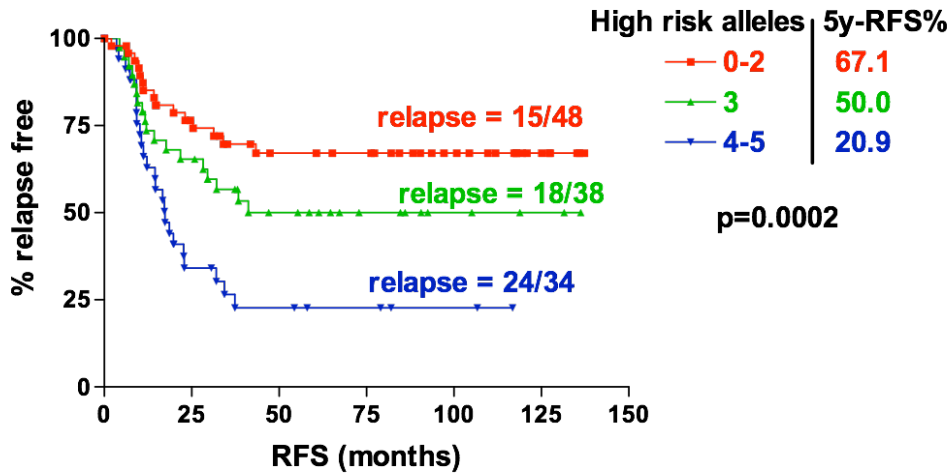


Fig. 37 Combinazione tra RFS e pannello a 5 SNPs

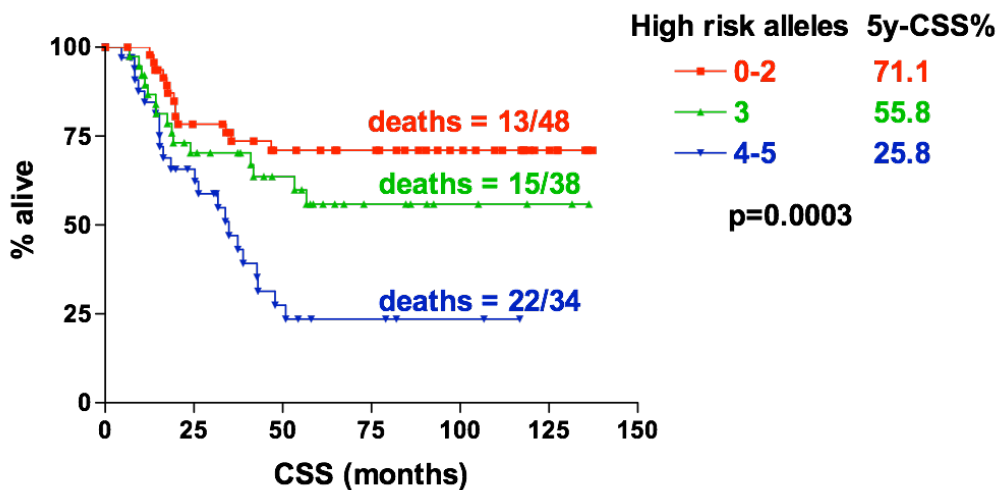


Fig. 38 Combinazione tra CSS e pannello a 5 SNPs.

Un cut off di tre SNPs ha raggiunto la più alta sensibilità (73.7%, 95%CI 60.3-83.0) e accuratezza (68.4%, 95%CI 58.2-76.7) con una specificità del 60.9% (95%CI 44.5-75.8), PPV di 72.4% (95%CI 59.8-82.2) e NPV di 62.5% (95%CI 47.0-75.8).

Nel momento in cui il pannello di 5 SNPs è stato combinato con i dati istologici, le analisi hanno suddiviso i pazienti in due set principali con RFS a 5 anni dal 61% al 75% e dal 22% al 36%. In particolare, RFS a 5 anni era differente nel gruppo di pazienti con 3 varianti ad alto rischio e in accordo con l'istologia: 61% nei pazienti con tumore squamoso e 36% nei pazienti con adenocarcinoma (p=0.06). Globalmente, due classi di rischio potrebbero essere ottenute con i seguenti valori di RFS e CSS a 5 anni 65% vs 27% (HR 3.0, 95% CI 2.0-6.0, p<0.0001 e 69% vs 31% (HR 2.9, 95%CI 1.8-5.7, p<0.0001).

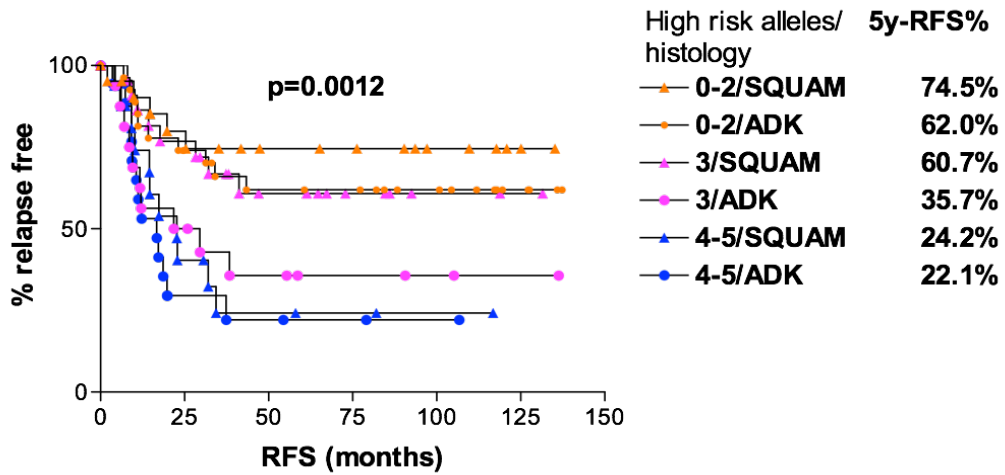


Fig. 39 Combinazione tra RFS, istologia e pannello a 5 SNPs

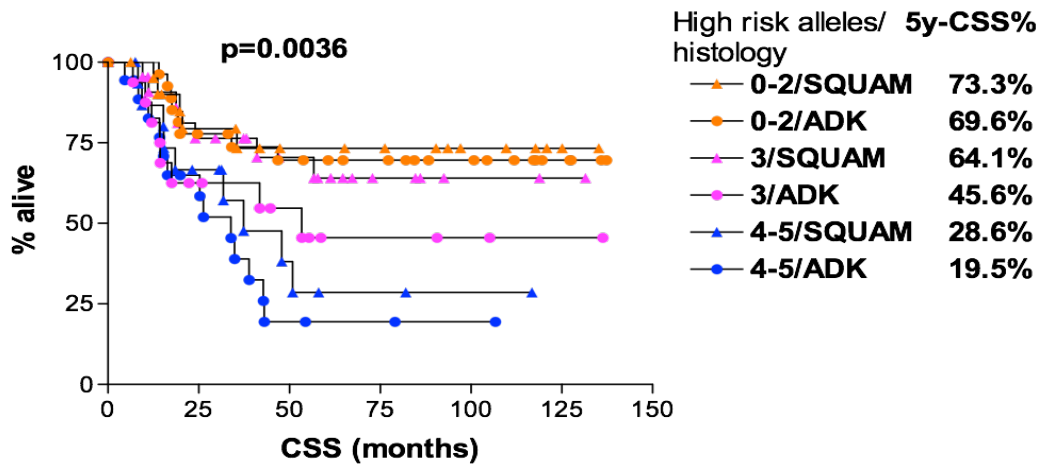


Fig. 40 Combinazione tra CSS, istologia e pannello a 5 SNPs

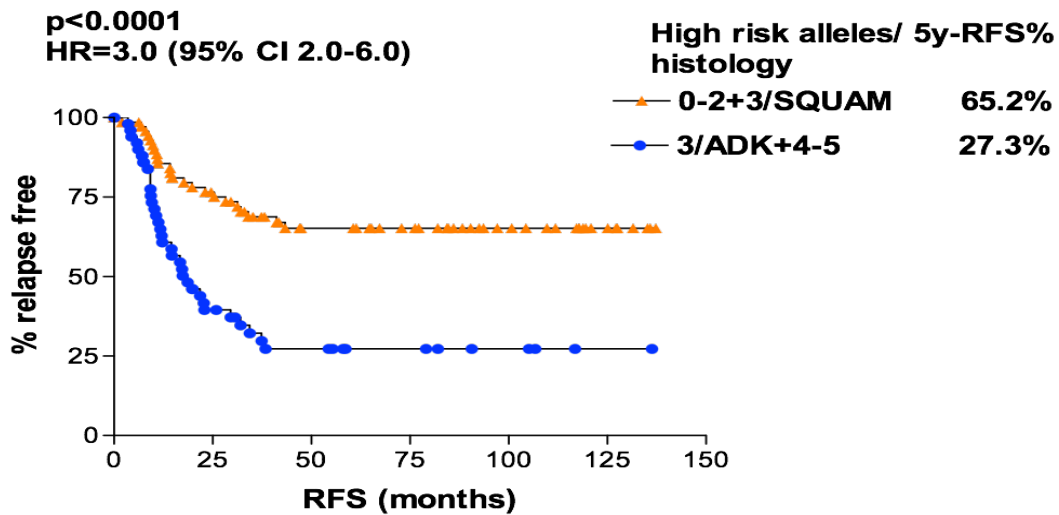


Fig. 41 Suddivisione dei pazienti in due subset principali in relazione a RFS, istologia e pannello a 5 SNPs.

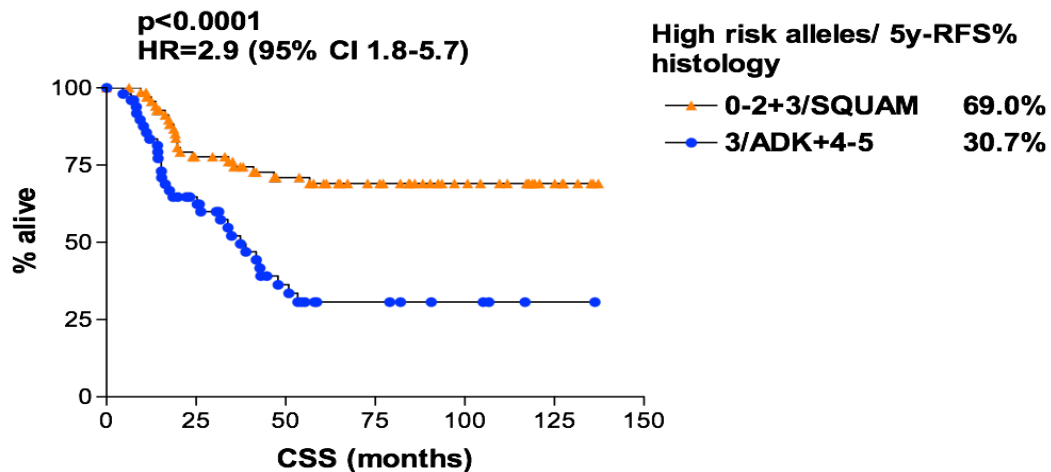


Fig. 42 Suddivisione dei pazienti in due subset principali in relazione a CSS, istologia e pannello a 5 SNPs.

La predizione dell'outcome è stata migliorata combinando il pannello di 5 SNPs con la risposta patologica. Questo modello ha suddiviso i pazienti in due gruppi con indici CSS e RFS $\geq 70\%$ o $\leq 36\%$ ($p<0.0001$). In particolare, pazienti con risposta completa parziale (nCR) hanno presentato un rischio di ricaduta globale del 44.4%; grazie al pannello genetico si potrebbero suddividere i pazienti in due sottogruppi con 77.7% e 33.5% di RFS a 5 anni ($p=0.01$). Inoltre, il gruppo di pazienti che ha raggiunto la risposta completa (CR) potrebbe essere suddiviso in due sottogruppi separati con indice RFS a 5 anni del 91.3% e 69.5% ($p=0.058$). Infine, la combinazione di risposta patologica con in pannello di 5 SNPs ha permesso la redistribuzione di tutti i gruppi nelle due classi di rischio maggiormente informative: alto rischio (47.5% dei pazienti, inclusi tutti i NRs e nCRs con 3-5 genotipi sfavorevoli) e basso rischio (52.5% dei pazienti, inclusi tutti i CRs e nCRs con 0-2 genotipi sfavorevoli). Gli ultimi due gruppi hanno outcome statisticamente differenti: PFS a 5 anni 79.4% vs 17.7% (HR 6.71, 95%

CI 3.98-12, $p < 0.0001$) e CSS a 5 anni 79.3% vs 26.3% (HR 6.25, 95%CI 3.6-11.5, $p < 0.0001$).

La classificazione ha ottenuto una sensibilità del 79% (95%CI 66.7-87.5), specificità 85.4% (95%CI 71.5-93.1), accuratezza 81.8% (95%CI 72.8-88.0), un PPV di 88.2% (95%CI 77.0-93.8) e un NPV di 74.5% (95%CI 60.2-85.1).

La procedura di validazione interna mediante MDR ha confermato i nostri modelli come buoni predittori. Il modello "5 SNPs/istologia" disponibile pre-trattamento ha mostrato un errore di predizione del 33% e una significatività del test di permutazione $p = 0.03$ per RFS. Il modello "5 SNPs/istologia" disponibile post-trattamento ha mostrato un errore di predizione del 21% e una significatività del test di permutazione $p = 0.004$ per RFS.

Per valutare la prestazione dei modelli sviluppati ed escludere overfitting è stata applicata la strategia di ricampionamento utilizzando l'analisi MDR.

L'analisi MDR, comparando l'istologia con il pannello a 5 SNPs ha permesso di riconfermare i dati ottenuti dalla statistica classica. I pazienti sono stati suddivisi in due classi: alto rischio (celle scure) e basso rischio (celle chiare) sovrapponibili con i risultati delle analisi log-rank.

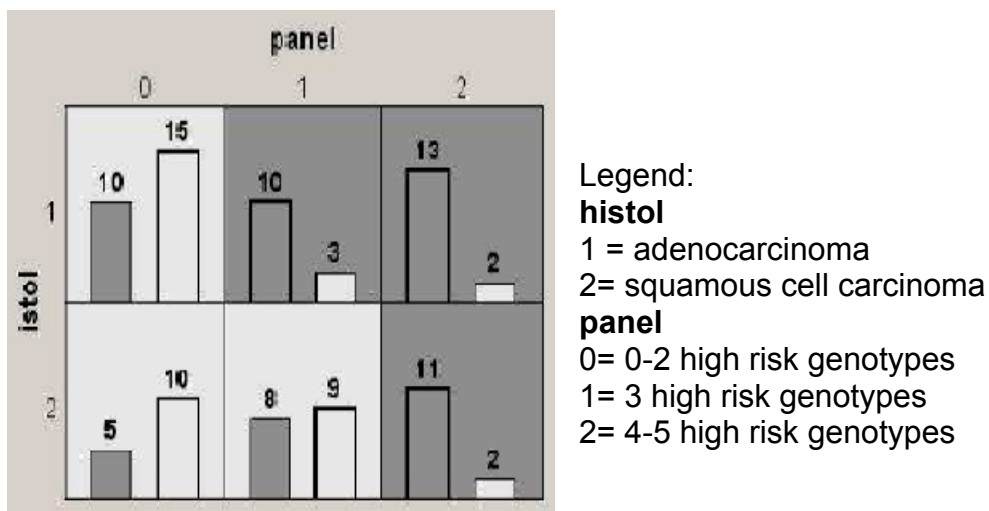


Fig. 43 Rappresentazione grafica dell'analisi MDR per la previsione di sopravvivenza dei pazienti.

DISCUSSIONE

Negli ultimi anni, non sono stati ottenuti risultati chiari e definitivi in studi di associazione tra marcatori genetici e outcome di pazienti trattati con RCT con tumore al retto e all'esofago; pertanto non si è ancora giunti ad una conclusione che ci permetta di discriminare i pazienti potenzialmente più o meno responsivi attraverso un pannello di polimorfismi.

In questo studio abbiamo cercato di correlare alcuni polimorfismi legati al meccanismo di riparazione del DNA, detossificazione e meccanismo d'azione del farmaco con l'outcome clinico di pazienti con tumore al retto e all'esofago. In particolare, per quanto riguarda il gruppo di pazienti con tumore al retto e trattati con RCT a base di fluorouracile abbiamo individuato una correlazione significativa tra le varianti genetiche XRCC1/MTHFR677 e la risposta patologica maggiore ($p=0.0009$) utilizzando un metodo statistico MDR alternativo alla statistica lineare classica. Utilizzando il test chi quadro infatti, non era emersa nessuna correlazione significativa, concludendo erroneamente che tutti i polimorfismi studiati non erano in grado di discriminare i pazienti potenzialmente responsivi alla RCT.

I metodi di statistica tradizionale non sono indicati per individuare le interazioni che possono coinvolgere diversi SNPs, e influenzare la risposta alla RCT.

Per poter risolvere questi problemi, uno dei metodi informatici in grado di identificare le interazioni gene-gene è il Multifactor Dimensionality Reduction.

MDR è un metodo efficace per individuare interazioni importanti tra i geni (e/o gene e fattori ambientali) e un fenotipo binario. L'idea chiave del metodo MDR è quella di ridurre la multidimensionalità dei genotipi in attributi binari ad un' unica dimensione utilizzando un classificatore ben definito. (108,109)

La maggior parte degli studi in letteratura non ha tenuto conto di questa problematica, inoltre alcuni di essi hanno ottenuto risultati inconcludenti a causa di mancanze importanti nell'analisi statistica. In particolare, per valutare l'efficacia di una variante genetica come marcatore a livello clinico è importante osservare alcune procedure fondamentali. Per prima cosa è fondamentale che tutti i pazienti coinvolti nello studio vengano frazionati in sottogruppi omogenei in accordo al genotipo (portatori o no della variante) e successivamente comparare gli outcome tra i sottogruppi. Una spiccata differenza tra i sottogruppi permette di dimostrare un'associazione tra genotipo ed outcome.

Per poter ottenere risultati affidabili, uno degli aspetti più importanti da valutare è un'adeguata dimensione del campione in analisi. Questo aspetto dovrebbe essere considerato e calcolato all'inizio dello studio in base allo scopo che si vuole raggiungere e il livello di significatività.

Un altro punto importante che influenza la dimensione del campione è definire in cosa consistono le notevoli differenze tra due gruppi di pazienti. Riguardo a ciò non esistono linee guida restrittive ma ci si aspetta che le differenze di outcome dovrebbero essere clinicamente rilevanti. Nel caso della terapia tumorale, gli outcome sono in genere risposta e sopravvivenza. Come regola generale, quando vengono considerate le frequenze (per esempio la percentuale di pazienti che rispondono alla terapia o muoiono in due gruppi a confronto) sono accettate differenze del 20% oppure un odd ratio di 1.5-2.0.

Infine, per evitare errori causati dalla selezione dei pazienti, studi genetici di associazione dovrebbero arruolare un numero sufficiente di pazienti considerando anche le frequenze dei polimorfismi nella popolazione in studio.

Online sono disponibili software gratuiti per poter calcolare la corretta dimensione del campione che si intende arruolare in uno studio.

(<http://www.epibiostat.ucsf.edu/biostat/sampsize.html>)

In letteratura esistono numerosi studi che riguardano l'associazione di un pannello di polimorfismi germline e la risposta patologica e/o PFS ed OS, alcuni in accordo con i nostri risultati altri meno.

Nessuno dei lavori pubblicati mostra un'associazione tra il polimorfismo XPC Lys939Gln e la risposta patologica. Nella nostra casistica, all'analisi univariata il polimorfismo XPC Lys939Gln è associato significativamente alla risposta patologica nei pazienti con tumore esofageo ma non nei pazienti con tumore rettale. Poichè entrambi i gruppi erano stati sottoposti a trattamento concomitante di radioterapia ed infusione con 5-FU, l'effetto di questi ultimi non sembrerebbe legato all'attività di XPC. Al contrario, la predittività sulla risposta di XPC sembra legata alla somministrazione di cisplatino e/o taxano, utilizzati solo nel gruppo con tumore esofageo; in alternativa è l'insorgenza del tumore in sede esofagea o rettale che determina una diversa sensibilità ai trattamenti, probabilmente legata a profili molecolari e biologici specifici e diversi.

Grimminger et al. hanno analizzato il potenziale predittivo del polimorfismo XRCC1 (Arg194Trp, Arg399Gln) e XRCC3 (A241G) in 81 pazienti con tumore al retto trattati con RCT neoadiuvante. Il DNA genomico è stato estratto da tessuto chirurgico contenente cellule normali. Il polimorfismo XRCC1 Arg399Gln ha mostrato una significativa associazione con la risposta: pazienti eterozigoti hanno ottenuto la risposta patologica maggiore più frequentemente rispetto ai pazienti omozigoti Arg/Arg e Gln/Gln (47% vs 22,8% e 21,4% rispettivamente, $p=0.039$). Non sono state invece trovate associazioni tra caratteristiche clinico-patologiche e sopravvivenza. (110)

Balboa et al. hanno studiato 65 pazienti con tumore al retto trattati con RT standard e infusione continua e concomitante di 5-FU prima della chirurgia. In questo studio è stato valutato un pannello di polimorfismi sui geni: XRCC1, ERCC1, ERCC2, MTHFR, TYMS, DPYD, GSTP1 ed EGFR e correlati con la risposta patologica. Si è vista una buona associazione con la risposta maggiore nei pazienti portatori della variante TYMS 5'UTR 3G rispetto ai pazienti con gli alleli 2R e 3C (67% vs 37%, $p=0.018$). Nessuna altra associazione è stata riportata. (111)

Anche Paez et al. hanno proposto gli SNPs associati a TYMS come possibili markers predittivi per il tumore al retto. Solo 51 pazienti trattati con CRT neoadiuvanti per tumore al retto sono stati arruolati nello studio ed è stato visto che il genotipo 3R/3R era associato ad una percentuale superiore di risposta maggiore (61% vs 22%, $p=0.013$) rispetto ai genotipi 2R/2R e 2R/3R ($p=0.037$). (112)

L'anno seguente lo stesso autore ha pubblicato uno studio con una cohorte di pazienti maggiore ($n=128$) e nel quale sono stati valutati i seguenti polimorfismi: TYMS, ERCC1 (Asn118Asn, 8092 C>A, 19716 G>C), XRCC1 (Arg194Trp, Arg280His, Arg399Gln), XPD (Lys751Gln), EGFR (Arg497Lys) e STP1 (Ile105Val) in relazione con la risposta patologica, PFS e OS.

Globalmente, il 45% dei pazienti ha ottenuto una risposta maggiore, che non sembra essere dipendente dal regime chemioterapeutico. Per questo motivo non è stata applicata nessuna stratificazione per quanto riguarda la terapia farmacologica. Anche in questo studio il genotipo 3R/3R è stato associato con una regressione patologica maggiore (59% vs 38%, $p=0.023$) in confronto con i genotipi 2R/2R e 2R/3R. Il sottogruppo 3R/3R è stato inoltre confermato con valori migliori di PFS (103 mesi vs 75 mesi, $p=0.039$) e OS (124 mesi vs 78 mesi, $p=0.023$). Nessuna altra associazione è stata trovata, ad eccezione del polimorfismo XRCC1 (Arg399Gln) con il valore di PFS: pazienti portatori del genotipo Arg/Arg vivevano un periodo maggiore senza ricaduta del tumore rispetto ai portatori dei genotipi Arg/Gln e Gln/Gln (101 mesi vs 78 e 31 mesi rispettivamente, $p=0.048$). (113)

Gli stessi risultati sono stati replicati nello studio di Lamas et al. in una coorte indipendente; sono stati arruolati 93 pazienti con tumore al retto e trattati con CRT neoadiuvante. Gli autori hanno valutato la relazione tra la regressione del tumore osservata sui pezzi chirurgici e i polimorfismi dei geni TYMS, MTHFR, DYPD, EGFR, ERCC1, ERCC2 e XRCC1.

Le analisi statistiche hanno dimostrato che i genotipi XRCC1 Arg/Arg ($p=0.01$) e TYMS 5'UTR 2R/3G – 3C/3G – 3G/3G ($p=0.03$) erano significativamente associati ad una risposta patologica migliore. (114)

Altri studi successivi hanno ampliato lo spettro delle varianti da studiare per poter capire meglio le interazioni tra i geni.

Garcia-Aguilar et al. hanno studiato la risposta patologica in 132 pazienti con tumore al retto localmente avanzato e trattati con CRT neoadiuvante.

Gli autori hanno valutato i polimorfismi germline in 23 geni coinvolti nella patogenesi del tumore al colonretto e hanno trovato una significativa bassa risposta patologica completa nei pazienti portatori delle varianti omozigoti di CCND1 (870 AA, $p=0.014$) e MTHFR (677 TT, $p=0.012$) in confronto con gli altri genotipi. (115)

Cecchin et al. invece hanno genotipizzato 16 geni associati alla sensibilità alle radiazioni e al metabolismo e detossificazione del farmaco. Nello studio sono stati arruolati 238 pazienti con tumore al retto e trattati con RCT neoadiuvante. Le analisi multivariate di regressione logistica hanno evidenziato che i pazienti con maggiore risposta potrebbero essere discriminati in base alla presenza delle forme wild type di OGG1-124CC ($p=0.024$) e di MTHFR-677CC ($p=0.034$) rispetto agli altri genotipi. Non è stata infine trovata nessuna associazione con il subset intermedio. (116)

Nei numerosi studi presenti in letteratura e nel nostro sono state pertanto riscontrate diverse discrepanze nell'associazione tra i diversi polimorfismi analizzati e la risposta alla RCT neoadiuvante. E' molto difficile trovare studi simili per poter fare un confronto adeguato a causa per esempio della somministrazione di dosi differenti di 5-FU oppure la co somministrazione di altri tipi di folati e altri farmaci chemioterapici come oxaliplatino e irinotecano. Inoltre, anche gli endpoint e i metodi di valutazione della risposta patologica sono spesso differenti. Ultima cosa non meno importante è la scelta della sorgente di DNA utilizzata per la genotipizzazione. Utilizzare cellule di tessuto sano o tumorale non è equivalente; esistono infatti alcune differenze genetiche, frequentemente avvengono perdite o guadagni di alleli.

Per quanto riguarda invece lo studio con il gruppo di pazienti con tumore all'esofago, abbiamo generato un modello prognostico con 5 SNPs coinvolti nella riparazione del DNA (XPC 499 e 939), nell'azione del farmaco (MTHFR 677) e nella detossificazione (GSTP1 114, MDR1 1267) e ognuno dei quali con una correlazione con RFS con $p < 0.1$.

Il pannello ha discriminato tre sottogruppi di pazienti, due con due rilevanti differenze di RFS a 5 anni (67.1% r 20.9%, $p < 0.0001$); il terzo presentava un outcome intermedio (RFS 50%) anche se includeva molti pazienti sopravvissuti a lungo termine (20/38, 52.6%) che sono risultati misclassificati dal punto di vista clinico.

Siamo stati in grado di migliorare il potere predittivo del pannello a 5 SNPs includendo le analisi istologiche e la risposta patologica.

Dopo aver combinato pannello e istologia, i 3 sottogruppi sono stati concentrati in due subset con rispettivamente 65% e 27% di RFS a 5 anni. I genotipi con 0-2 e 3-5 polimorfismi ad alto rischio hanno confermato prognosi differenti indipendentemente all'istologia, mentre la sopravvivenza era correlata all'istologia in presenza di 3 polimorfismi (61% nel tumore squamoso e 36% nell'adenocarcinoma).

Analogamente, la predizione dell'outcome è stata migliorata combinando la risposta patologica con il pannello di 5 SNPs. Sono stati identificati due gruppi con valori di RFS tra 69.5% e 91.3% e tra 11.4% e 33.3%.

Il setting favorevole è stato composto da tutti i pazienti con CR e pazienti con nCR combinati con il profilo genetico a basso rischio (0-2 polimorfismi a basso rischio), mentre il setting a prognosi sfavorevole è stato composto da pazienti non responsivi o pazienti nCR portanti un profilo genetico ad alto rischio (3-5 polimorfismi ad alto rischio, $p < 0.0001$).

Di conseguenza, i sottogruppi di pazienti con nCR e CR sono stati definiti in modo migliore. In letteratura è ancora poco chiaro se pazienti con nCR e CR possiedano un outcome differente, spesso vengono riportati come unico gruppo mentre altre volte separatamente.

In questo studio, i pazienti nCR hanno presentato un rischio di ricaduta di circa il 45%. Successivamente alle nostre analisi combinate, il gruppo è stato suddiviso in due subset con 77.8% e 33.3% di RFS a 5 anni (HR 4.1, $p = 0.01$).

Inoltre, è stata individuata anche una differenza del 20% nei valori di RFS nel gruppo dei pazienti CR (91.3% e 69.5% HR 4.0, $p = 0.058$).

Infine, la combinazione di risposta patologica con il pannello a 5 SNPs ha permesso di ripartire tutti i pazienti in due classi di rischio maggiormente informative: basso o alto rischio con PFS a 5 anni di 79.5% vs 17.7% rispettivamente ($p < 0.0001$).

In letteratura, vengono riportati altri pannelli di SNP associati alla sopravvivenza nel tumore esofageo localmente avanzato.

In una coorte di pazienti asiatici trattati con RT e cisplatino + fluorouracile o cisplatino + paclitaxel, Yang et al. ha trovato una combinazione dei genotipi XPC 939CC e XPA -23 AG con la sopravvivenza: pazienti che portavano entrambi i genotipi sfavorevoli (16/218, 7%) mostravano una sopravvivenza globale media ridotta (OS 4 mesi vs 5 mesi) comparati ai pazienti senza genotipi sfavorevoli (104/218, 48%) o con 1 solo variante sfavorevole (98/218, 45%). Nel momento in cui essi sono stati esaminati come singoli polimorfismi, il 74% (31/44) dei pazienti portatori della variante di XPC 939CC risultavano scarsamente responsivi. (117)

Gli alleli XPC 939 (CC e AC) sono stati presentati anche nel nostro pannello predittivo come varianti sfavorevoli; anche se la frequenza era molto più alta nel nostro studio (CC 19% e AC 49%) e pertanto più pazienti sono stati considerati ad alto rischio. Al contrario, il polimorfismo XPA -23 non ha mostrato nessuna associazione con la sopravvivenza. Le giuste considerazioni devono essere fatte visto che tra i due studi esistono differenze razziali.

Wu et al. hanno pubblicato uno studio in cui veniva presentato un pannello a 5 varianti coinvolte nel pathway del fluorouracile (MTHFR, TYMS, MTR); i pazienti portatori fino a 2 varianti ottenevano un migliore RFS rispetto ai pazienti con 3-5 varianti (HR=0.09), ma rappresentavano solamente il 16.6% della popolazione (29/175). Nel pannello, il genotipo MTHFR 677 TT è stato significativamente associato a migliore RFS; anche se non è stata riportata nessuna associazione con la sopravvivenza globale. (118)

Al contrario, nel nostro pannello, MTHFR 677 TT ha presentato una cattiva associazione con CSS e RFS mentre TYMS non ha mostrato associazioni significative. Le differenze tra i due studi potrebbero essere legate all'istologia del tumore (adenocarcinoma: 83% vs 50%), l'utilizzo dei taxani (paclitaxel vs docetaxel), la durata del follow-up (valore medio 18.6 vs 41 mesi).

Nello studio di Bradbury, due SNPs in XPD (Asp312Asn) e due SNPs in ERCC1 (118C>T, 8092C>A) hanno mostrato un'associazione significativa con OS e PFS; inoltre combinando i dati con analisi di aplotipo, i pazienti portatori delle isoforme wild type per ogni polimorfismo raggiungevano OS e PFS inferiore (HR: 2,92, $p<0.0001$). (119)

Nelle nostre serie i polimorfismi XPD 751 ed ERCC1 118 non hanno mostrato nessuna associazione con la sopravvivenza. Comparare due serie è difficoltoso, dal momento in cui le due popolazioni in studio sembrano differenti in termini di PFS media (16 mesi vs 43 mesi) e OS (28 mesi vs 60 mesi); inoltre sono state riscontrate differenze sostanziali anche nel protocollo di trattamento.

In un piccolo studio in cui sono stati inclusi 21 pazienti, Okuno et al. ha riportato una sopravvivenza globale migliore con 2-3 SNPs dei geni GSTP1 e TYMS. (120)

Altri studi hanno riportato un'associazione importante tra un singolo SNP e la sopravvivenza o la risposta. (121,122)

La variante 3435 CT di MDR1 è stata indagata in due studi; la variante con alta espressione è stata associata ad una risposta peggiore (per esempio presenza di linfonodi positivi) e peggior sopravvivenza globale (OS HR 0.44 e RFS HR 0.25). Il nostro pannello suggerisce una relazione tra sopravvivenza peggiore ed il genotipo MDR1 2677GT ma non con 3435CT.

La variante GSTP1 CT è stata associata alla ricaduta (HR 2.19) e una peggiore sopravvivenza globale (OS HR 2.10), anche se dopo un aggiustamento questi dati non sono rimasti significativi. (123)

Al contrario, nelle nostre serie questa variante difettiva ha significativamente migliorato la sopravvivenza a lungo termine (PFS) e globale (CSS).

Spesso esistono discrepanze o difficoltà di interpretazione tra gli studi di associazioni genetiche; le principali motivazioni potrebbero essere la non omogeneità della popolazione in studio, differenze nello schema di trattamento, etnie (asiatici vs caucasici) e lunghezza del follow up.

Uno dei punti principali dello studio è che tutti i pazienti hanno ricevuto lo stesso trattamento neoadiuvante e hanno avuto un lungo follow up; la numerosità campionaria è stata significativa in base anche alla bassa incidenza del tumore esofageo.

Inoltre, i requisiti multi-testing sono stati destinati correggendo il valore p: quando vengono analizzati simultaneamente un vasto numero di polimorfismi, la possibilità di trovare falsi positivi aumenta. Uno dei metodi più stringenti in grado di contrastare questo problema è la correzione di Bonferroni, in grado di ridurre decisamente il numero dei falsi positivi.

Questo metodo, insieme ad un'alta omogeneità clinica delle serie, garantisce che i nostri risultati descrivono un'associazione reale tra outcome e marcatori genetici. Si potrebbe sostenere che l'approccio del gene candidato è limitato dalla stessa dipendenza dalle conoscenze esistenti sulla biologia della malattia; attualmente viene considerato uno strumento molto utile per gli studi genetici.

(124)

Inoltre, una strategia mediante cross validation ha confermato la generalizzabilità del nostro modello.

Si potrebbe suggerire che combiando il pannello di SNP e l'istologia, ottenibile dalla diagnosi della malattia, potrebbe diventare uno strumento prospettico per selezionare i pazienti in grado di poter trarre un potenziale beneficio dalla chemioradioterapia neoadiuvante (per esempio tutti i portatori di massimo due genotipi sfavorevoli e i pazienti con 3 polimorfismi ad alto rischio con carcinoma a cellule squamose che hanno raggiunto RFS a 5 anni sono più del 65%), mentre i portatori di 4-5 genotipi ad alto rischio, indipendentemente dall'istologia, e i pazienti con adenocarcinoma con 3 genotipi ad alto rischio che hanno raggiunto un RFS a 5 anni sono meno del 30% potrebbero essere indirizzati verso approcci terapeutici alternativi.

D'altra parte, l'integrazione del pannello genetico con la risposta patologica ottenuta con la radiochemioterapia neoadiuvante, potrebbe aiutare nella personalizzazione della cura, per esempio selezionando tra i pazienti responsivi quelli che potrebbero ricadere e pertanto proporre trattamenti adiuvanti innovativi. Questo importante prospettivarichiede ovviamente ulteriori chiarimenti in studi indipendenti.

CONCLUSIONI

I nostri risultati ci permettono di affermare che l'epistasi dovrebbe essere considerata nel momento in cui si analizzano associazioni farmacogenetiche.

Il Multifactor Dimensionality Reduction è un metodo semplice e molto valido per individuare le combinazioni genetiche in grado di identificare quei pazienti con tumore al retto con un' alta probabilità di rispondere in maniera soddisfacente alla chemioradioterapia.

In conclusione, i nostri dati hanno dimostrato il ruolo di un pannello a 4/5 SNPs nel predire PFS e CSS in pazienti che hanno ricevuto lo stesso protocollo di terapia neoadiuvante chemioterapico. I polimorfismi di XPC, MDR1, GSTP1 e MTHFR meritano ulteriori valutazioni per guidare meglio le decisioni terapeutiche in pazienti con queste caratteristiche.