

*Alla mia mamma, a mio padre, a Lavinia e
al mio Mouse*



Università di Pisa

Facoltà di Farmacia

Corso di Laurea Specialistica in Farmacia

Tesi di Laurea

Analisi farmacogenetica della timidilato sintetasi in pazienti con carcinoma del colon-retto in trattamento con capecitabina: sviluppo di un nuovo metodo di genotipizzazione e applicazione clinica

Candidata

Relatori

Marzia Del Re

Chiar. mo Prof. Antonello Di Paolo

Chiarm. mo Prof. Romano Danesi

Anno Accademico 2008/2009

Indice

Riassunto	3
Premessa.....	6
Introduzione	9
1. Il carcinoma del colon-retto	9
2. 5-fluorouracile.....	13
2.1 Anabolismo	15
2.2 Meccanismo d'azione.....	17
2.3 Catabolismo	20
2.4 Farmacocinetica	22
2.5 Impieghi terapeutici	26
2.6 Meccanismi di resistenza	30
2.7 Reazioni avverse	32
3. Profarmaci del 5-FU	34
3.1 Capecitabina.....	34
3.2 Tegafur	35
4. Farmacogenetica del 5-FU	38
4.1 Diidropirimidina deidrogenasi	39
4.2 Timidina fosforilasi.....	48
4.3 Timidilato sintetasi.....	53
4.2.1 Polimorfismi del promoter del gene TS.....	59
4.2.2 Correlazione tra genotipo e tollerabilità della capecitabina.....	67
Scopo della tesi.....	69
Pazienti e Metodi.....	70
1. Pazienti	70
2. Analisi dei polimorfismi della regione 5'UTR del gene TS.....	71
2.1 Estrazione del DNA genomico.....	71
2.2 Amplificazione PCR del DNA genomico	72

2.3 Analisi della ripetizione nella regione 5'-UTR.....	75
2.4 Analisi con RFLP del polimorfismo G>C nelle ripetizioni TSER*2 e *3.....	75
2.5 Analisi di VNTR e del polimorfismo G>C con sequenziamento automatico..	76
Risultati	81
Discussione	88
Bibliografia	93
Ringraziamenti	110

Riassunto

Il 5-Fluorouracile (5-FU), un chemioterapico utilizzato in diverse neoplasie solide, agisce mediante il suo metabolita 5-FdUMP (5-fluoro-deossiuridina monofosfato) che forma un complesso stabile con TS, bloccando la sintesi del dTMP. Nella regione *enhancer* del gene TS (TSER, *thymidylate synthase enhancer region*) si trova una ripetizione di 28 paia di basi (*variable number of tandem repeats*, VNTR), ripetuta da 2 a 9 volte, più comunemente due o tre (allele 2R o 3R). Ogni ripetizione contiene una sequenza specifica (5'-CCACTTG-3') denominata *upstream stimulatory factor-1* (USF-1) alla quale si lega il fattore che stimola la trascrizione del gene TS. Per questa ragione l'allele 3R contiene 3 USF-1 boxes ed è associato ad una espressione di TS tre o quattro volte maggiore rispetto all'allele 2R che, possedendo 2 USF-1 boxes, ha una minore attività trascrizionale. Tuttavia un secondo polimorfismo (rs2853542, G>C) è stato individuato nelle VNTR di TSER e la sua presenza modifica il quadro descritto precedentemente in quanto la presenza della variante C (5'-CCACTTC-3') impedisce al fattore di trascrizione di legarsi all'USF-1 box. L'attività trascrizionale del gene TS dipende pertanto dalla presenza delle ripetizioni e dalla presenza, all'interno di esse, del polimorfismo G>C. Dal momento che la quantità di proteina TS presente all'interno della cellula influenza l'attività e/o la tossicità del 5-FU e dei suoi profarmaci capecitabina e tegafur, lo scopo di questa tesi è stato quello di validare un metodo di genotipizzazione della TSER in una popolazione di 70 pazienti affetti da carcinoma del colon-retto. Di questi era valutabile la tossicità in 50 che erano trattati come segue: capecitabina (21), 5-FU, leucovorin e oxaliplatino (13), capecitabina e oxaliplatino (10), capecitabina, oxaliplatino e irinotecano (2), 5-FU infusione (1),

irinotecano e oxaliplatino (1) e combinazioni di capecitabina, oxaliplatino e radioterapia (2). È stata inoltre valutata la possibile associazione tra genotipo e tossicità del trattamento.

È stato messo a punto un metodo PCR per l'amplificazione di una porzione di TSER contenente i VNTR ottimizzato per l'abbondanza di G/C presenti nella regione, che è causa di ridotta efficienza di amplificazione. Per risolvere questo problema è stata aumentata la temperatura di denaturazione ed aggiunto DMSO alla miscela di reazione PCR per facilitare la separazione dei filamenti di DNA e permettere la successiva amplificazione. E' stata inoltre aumentata la concentrazione dello ione magnesio a 2 mM per rendere più efficiente il processo di PCR. Il prodotto di amplificazione è stato separato su gel di agarosio per il riconoscimento dei due alleli 2R e 3R. L'analisi del polimorfismo G>C è stata effettuata inizialmente con digestione con enzima di restrizione *HaeIII* e separazione dei frammenti di digestione con elettroforesi su gel di agarosio, come riportato nella letteratura scientifica. Tuttavia l'immagine che si otteneva era confusa per la presenza di numerosi frammenti di digestione e non era possibile determinare con sicurezza il genotipo risultante. Per questa ragione è stato messo a punto un metodo di sequenziamento automatico che ha permesso l'identificazione con maggior precisione del polimorfismo G>C.

Sono stati genotipizzati 70 pazienti con carcinoma del colon-retto e i risultati dell'analisi genetica hanno dimostrato la presenza degli alleli 2RGC, 2RCC, 3RGGC e 3RGCC la cui frequenza era 27,2%, 20%, 29,2% e 23,6%, rispettivamente. Tra questi pazienti, 50 erano valutabili per la tossicità del trattamento di grado ≥ 2 che è stata suddivisa per gruppi di trattamento. La somministrazione di capecitabina da sola e in associazione con oxaliplatino era associata a nausea/vomito (14,3% vs. 30%), diarrea

(33,3% vs. 40%), sindrome mano-piede (4,8% vs. 30%), stomatite (9,5% capecitabina da sola) e neutropenia (20% capecitabina e oxaliplatino). La combinazione di 5-FU e oxaliplatino produceva diarrea (38,5%) e neutropenia (23,1%). L'associazione tra genotipo e tossicità mostrava una tendenza non significativa all'associazione tra numero di USF-1 boxes e tossicità. In conclusione, questo studio ha validato un metodo originale di genotipizzazione dei polimorfismi genetici di TSER in una popolazione di pazienti e la sua accuratezza ne permette l'impiego clinico per la caratterizzazione genetica del ruolo di TS nella risposta alle fluoropirimidine.

Premessa

Il carcinoma del colon-retto rappresenta la seconda causa di morte per tumore ed in Italia l'incidenza varia nelle diverse regioni da 30 a 53 nuovi casi/anno ogni 100.000 abitanti. I pazienti deceduti per questa neoplasia sono circa 18.000/anno e le proiezioni future ipotizzano un progressivo aumento. Esistono chiare evidenze che la riduzione della mortalità per carcinoma del colon-retto può essere ottenuta attraverso l'identificazione e il trattamento della neoplasia in stadio precoce e soprattutto con l'asportazione dei polipi adenomatosi che rappresentano la condizione di maggiore rischio per lo sviluppo del carcinoma del colon-retto. Infatti la maggior parte dei tumori maligni intestinali sono adenocarcinomi e sono il risultato della trasformazione di un polipo adenomatoso attraverso la sequenza adenoma - carcinoma.

La sopravvivenza a 5 anni è correlata allo stadio della neoplasia: 90% circa nello stadio A di Dukes, 50 - 60% nel B, 35% circa nello stadio C e <5% nello stadio D che corrisponde alla malattia metastatica. Nel carcinoma del colon-retto la prognosi è in parte correlata alle dimensioni del tumore primitivo ed in modo particolare al grado di atipia istologica, all'invasione linfonodale e parietale. È acquisizione recente che lo sviluppo, la crescita e l'eventuale trasformazione maligna dei polipi adenomatosi sono associate all'accumulo di alterazioni attivanti di oncogeni e *silencing* di geni oncosoppressori. Talune alterazioni genetiche, quando ereditate e presenti in tutte le cellule dell'organismo, predispongono all'insorgenza dei carcinomi del colon-retto ereditari. Più frequentemente i fattori ambientali alterano direttamente, nel corso della vita, il DNA delle cellule epiteliali della mucosa intestinale, inducendo e sostenendo la progressione tumorale.

Il trattamento chemioterapico dopo resezione completa della neoplasia (terapia adiuvante) e della malattia avanzata si è arricchito nel tempo di nuovi farmaci ma ancora oggi la categoria più importante è costituita dal 5-fluorouracile e dai suoi profarmaci come fluorouracile e capecitabina.

Il loro meccanismo di azione è molto selettivo e consiste nell'inibizione della timidilato sintetasi, enzima della sintesi *de novo* dei nucleotidi, con conseguente deplezione del pool cellulare della timidina ed arresto della sintesi di DNA e della proliferazione. Tuttavia l'effetto del trattamento è variabile e limitato ad una percentuale della popolazione trattata. La variabilità di risposta e tollerabilità alla terapia con fluoropirimidine può dipendere da varie cause, tra cui fattori specifici del paziente (stato generale, età) e della malattia (stadio di diffusione, grading istologico). Da un punto di vista farmacologico, tuttavia, l'interazione del farmaco con il bersaglio cellulare rappresenta l'elemento più rilevante per spiegare, da un punto di vista farmacodinamico, gli effetti cellulari del farmaco. La caratterizzazione genetica della timidilato sintetasi ha permesso l'identificazione di polimorfismi nelle regioni 5' e 3' non trascritte (3'- e 5'-UTR). Questi polimorfismi hanno significato funzionale in quanto influenzano l'attività trascrizionale del gene e la quantità di proteina prodotta. Dal momento che la capacità del farmaco di inibire la funzione del bersaglio ad un livello incompatibile con la sopravvivenza cellulare rappresenta l'elemento critico per la risposta terapeutica, sono stati sviluppati metodi cellulari e molecolari per lo studio della timidilato sintetasi nelle cellule tumorali e nei tessuti sani al fine di predire l'efficacia della terapia e l'incidenza delle reazioni avverse nella popolazione di pazienti. La timidilato sintetasi è stata studiata con tecniche di immunocistochimica, espressione genica e attività enzimatica con contraddittori risultati di correlazione con

l'*outcome* clinico del trattamento. La revisione della letteratura suggerisce tuttavia che l'analisi del DNA possa rappresentare il metodo più affidabile per accertare il valore prognostico della timidilato sintetasi nei pazienti con neoplasia. Per tali motivi in questa tesi è stato sviluppato un metodo affidabile di genotipizzazione da applicare in clinica per la caratterizzazione molecolare dei pazienti affetti da carcinoma del colon-retto ed è stato applicato in via preliminare alla correlazione con la tossicità del trattamento.

Introduzione

1. Il carcinoma del colon-retto

Il carcinoma del colon-retto è stato stimato al terzo posto nel mondo come frequenza fra tutti i tumori solidi, con il 10-15% di nuove diagnosi all'anno rispetto a tutti i nuovi casi di neoplasia maligna ed una prevalenza mondiale superiore a 3,5 milioni di persone. Il termine "carcinoma del colon-retto" comprende propriamente le neoplasie del colon, del retto, della giunzione retto-sigmoidea e dell'ano.

Tale carcinoma mostra consistenti variazioni geografiche di incidenza, che risulta elevata nel Nord America, nell'Europa Nord-Occidentale ed in Nuova Zelanda e inferiore in Asia, Africa Equatoriale ed America Latina. Ogni anno nel mondo si registrano 600.000 nuovi casi di tali carcinomi (con un numero di decessi di circa 300.000 pazienti/anno) di cui 150.000 negli Stati Uniti (con 60.000 decessi) e 213.000 in Europa (con 110.000 decessi); in Italia i casi di nuova diagnosi ammontano a 32.000 circa, con 18.000 decessi/anno ed un tasso di mortalità preceduto soltanto dalle neoplasie polmonari.

Nonostante nel mondo ogni anno un individuo su 50 muoia a causa di questo tumore, sono stati osservati negli ultimi due decenni un costante aumento della sopravvivenza (stimato fra il 6 e l'8%) ed un'attesa di sopravvivenza a 5 anni di circa il 60%: ciò sembra dovuto sia all'identificazione della neoplasia in stadi più precoci, che all'efficacia delle terapie, soprattutto quelle impiegate in regime adiuvante, cioè dopo l'asportazione chirurgica della neoplasia (Bonadonna *et al*, 2003).

In un paziente operato di carcinoma del colon-retto ed attualmente libero da malattia, l'opzione di un trattamento chemioterapico adiuvante deve essere presa in

considerazione dopo aver esaminato il paziente per valutarne la prognosi e quindi deciderne l'iter terapeutico secondo linee guida riconosciute a livello internazionale e considerando i risultati ottenuti da studi clinici (*evidence based medicine*).

Le possibilità in questi pazienti consistono nell'effettuare un trattamento chemioterapico post-chirurgico (adiuvante) che ha lo scopo di ridurre l'incidenza delle recidive, oppure nel sottoporli soltanto a visite ed esami di controllo periodici presso un centro specializzato per almeno 5 anni (*follow-up*); la scelta fra le due opzioni si basa principalmente sulla classificazione post-chirurgica (o patologica) dello stadio del tumore secondo il sistema pTNM, sul *performance status* (PS), sull'età, sulla presenza o meno di perforazione o di occlusione intestinale.

Nella classificazione pTNM (**Tabella I**), T indica l'infiltrazione locale per estensione diretta del tumore primitivo asportato, N identifica l'interessamento linfonodale (è zero quando tutti i linfonodi asportati durante l'intervento sono indenni da infiltrazione neoplastica) ed M rappresenta la presenza (M_1) o l'assenza (M_0) di metastasi a distanza. Nella Tabella I il sistema pTNM viene confrontato con la precedente classificazione di Dukes, ancora oggi molto usata in oncologia.

La prognosi del paziente (**Tabella II**, Zaniboni *et al*, 2004) verrà quindi determinata tramite l'analisi di questi parametri, da cui deriverà anche l'iter terapeutico, che consisterà in visite di *follow-up* negli stadi 0 ed I, oppure in un trattamento chemioterapico precauzionale (adiuvante) nello stadio III.

Lo stadio II raggruppa pazienti a prognosi migliore (T3N0M0 o IIA) e altri a prognosi peggiore (T4N0M0 o IIB). Per i pazienti con carcinoma del retto in stadio IIA e IIB il trattamento standard prevede, rispettivamente, il *follow-up* per il primo ed un trattamento chemioterapico precauzionale per il secondo.

Tabella I. Classificazione TNM

Classificazione clinica				
T	<i>Tumore primitivo</i>			
Tx	Tumore primitivo non definibile			
T0	Non evidenza di tumore primitivo			
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : intraepiteliale o invasione della lamina propria ¹			
T1	Tumore che invade la sottomucosa			
T2	Tumore che invade la muscolare propria			
T3	Tumore che penetra attraverso la muscolare propria nella sottosierosa o nei tessuti non peritonealizzati pericolici o perirettali			
T4	Tumore che invade direttamente altri organi o strutture ¹ e/o perfora il peritoneo viscerale			
N	<i>Linfonodi regionali</i> ²			
Nx	Linfonodi regionali non valutabili			
N0	Linfonodi regionali liberi da metastasi			
N1	Metastasi in 1-3 linfonodi regionali			
N2	Metastasi in 4 o più linfonodi regionali			
M	<i>Metastasi a distanza</i>			
Mx	Metastasi a distanza non accertabili			
M0	Assenza di metastasi a distanza			
M1	Presenza di metastasi a distanza			
Classificazione patologica pTNM				
pN0	Le categorie pT, pN, pM corrispondono alle categorie T, N, M L'esame istologico del materiale ottenuto con una linfadenectomia regionale comprende abitualmente 12 o più linfonodi			
Suddivisione in stadi				
Dukes ³				
Stadio 0	Tis	N0	M0	
Stadio I	T1	N0	M0	
Stadio II	T2	N0	M0	A
	T3	N0	M0	
Stadio III	T4	N0	M0	B
	Ogni T	N1	M0	
Stadio IV	Ogni T	N2	M0	C
	Ogni T	Ogni N	M1	
<p>⁽¹⁾ L'invasione diretta in T4 comprende l'invasione di altri segmenti del colon-retto attraverso la sierosa: ad esempio invasione del colon sigmoideo da un carcinoma del ceco.</p> <p>⁽²⁾ Un nodulo neoplastico con un diametro maggiore di 3 mm nel tessuto adiposo perirettale, senza evidenza istologica di tessuto linfatico residuo, viene classificato come metastasi linfatica regionale perirettale o pericolica. Tuttavia, un nodulo neoplastico di diametro massimo di 3 mm viene classificato nella categoria come diffusione neoplastica discontinua, vale a dire T3.</p> <p>⁽³⁾ Il gruppo B di Dukes raggruppa casi a prognosi migliore (T3, N0, M0) con altri (T4, N0, M0) a prognosi peggiore; lo stesso per il gruppo C (ogni T, N1, M0 e ogni T, N2, M0).</p>				

Per i carcinomi del colon invece la questione se trattare o meno i pazienti in stadio II è ancora aperta, come anche quella se possono essere presi in considerazione altri

fattori. Anche le linee guida non risultano essere sempre univoche per questo stadio ed è quindi necessario prendere in considerazione, oltre ai criteri già descritti, il *grading* (G), cioè il grado di differenziazione istologica del tumore primitivo, il numero totale dei linfonodi esaminati, l'invasione vascolare e le eventuali patologie concomitanti, al fine di trattare soltanto quei pazienti che presentano i fattori prognostici peggiori.

Tabella II. Stadio della malattia e prognosi del paziente (i numeri indicano la percentuale di sopravvivenza a 5 anni)

Stadio	T	N	M	Dukes	Astler e Coller
stadio 0	Tis	N0	M0		
stadio 1	T1	N0	M0	A 82%	A 100%
	T2	N0	M0		
stadio 2	T3	N0	M0	B 73%	B1 67%
	T4	N0	M0		B2 54%
stadio 3	ogni T	N1	M0	C 27%	C1 43%
	ogni T	N2-3	M0		C2 22%
stadio 4	ogni T	N0-3	M1	D 0%	D 0%

In ogni caso è sempre necessario valutare da un lato a quale percentuale ammonta il beneficio che il paziente può ottenere dal trattamento chemioterapico, in termini di sopravvivenza libera da malattia (*Disease Free Survival*, DFS) e sopravvivenza totale (*Overall Survival*, OS); dall'altro, devono essere presi in considerazione i rischi che tale trattamento comporta sia in termini di tossicità acuta o cronica, come la neurotossicità, che di eventi avversi attesi o inattesi.

I tumori del colon-retto di stadio II sono il 30% fra tutte le neoplasie del colon (Cancer Statistics, 2004), con una OS che non è significativamente diversa fra chemioterapia e *follow-up* (78% vs 70% con terapia di 12 mesi, mentre lo standard è di 6 mesi, Taal *et al.*, 2001).

2. 5-fluorouracile

Il 5-fluorouracile (5-FU, **Figura 1**) è uno dei farmaci antitumorali più ampiamente utilizzati; esso è impiegato infatti, da solo o in associazione con altri farmaci, nel trattamento di varie neoplasie maligne, in particolare dei tumori del tratto gastroenterico, della mammella e dell'area testa-collo.

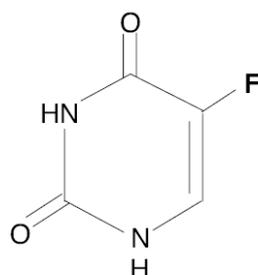


Figura 1. 5-Fluorouracile

Il 5-FU è stato ottenuto mediante sostituzione dell'atomo di idrogeno in posizione 5 della molecola di uracile con un atomo di fluoro e appartiene alla classe degli antimetaboliti. La molecola del 5-FU è stata razionalmente progettata sulla base delle conoscenze disponibili sulla biochimica dei tumori. Studi sperimentali avevano infatti dimostrato che alcuni tumori (epatomi del ratto) utilizzavano l'uracile esogeno per la sintesi degli acidi nucleici più attivamente dei tessuti sani (Rutman *et al.*, 1954). Si pensò quindi di sintetizzare un analogo delle pirimidine, dotato di proprietà chimico-

fisiche simili a quelle dell'uracile, che fosse in grado di interferire con la sintesi degli acidi nucleici e di rallentare la crescita del tumore (Heidelberger, 1975). La scelta di sostituire un atomo di idrogeno nella molecola dell'uracile con uno di fluoro ebbe varie motivazioni. Innanzitutto studi precedenti (Lubecq e Peters, 1949) avevano dimostrato che questo tipo di sostituzione era in grado di trasformare una molecola relativamente non tossica in una dotata di tossicità elevata; il raggio dell'atomo di fluoro (1,34 Å) inoltre è simile a quello dell'idrogeno (1,2 Å) e ciò comportava un minimo effetto sulla conformazione della molecola dell'uracile e quindi una maggior probabilità che la molecola di 5-FU venisse metabolizzata dagli stessi enzimi coinvolti nel metabolismo dell'uracile. La sostituzione dell'atomo di idrogeno in posizione 5' appariva particolarmente interessante dal momento che la maggior parte delle cellule di mammifero sintetizza la timidina-5'-trifosfato (dTTP), necessaria per la sintesi del DNA, dalla 2'-deossiuridina-5'-monofosfato (dUMP) mediante sostituzione dell'idrogeno in posizione 5' con un gruppo metilico per formare la deossitimidina-5'-monofosfato (dTMP). Infine il legame del fluoro con il carbonio in posizione 5' è più stabile rispetto a quello dell'idrogeno (Heidelberger, 1975), rendendo difficile la sostituzione con il gruppo metilico e le successive fosforilazioni in questa posizione necessarie per l'incorporazione del nucleotide negli acidi nucleici.

Il 5-FU è stato sintetizzato per la prima volta nel 1957 (Duschinsky *et al.*, 1957) a partire da precursori aciclici dell'uracile. Un metodo alternativo è rappresentato dalla sintesi per fluorazione diretta dell'uracile da parte di trifluorometil ipofluorito (Robins e Naik, 1971).

Nonostante i numerosi studi sul metabolismo del 5-FU rimangono ancora molte lacune nelle conoscenze su questo farmaco. In particolare non è stata tuttora completamente

chiarita l'importanza relativa dei vari bersagli intracellulari del farmaco stesso. Appare comunque evidente che, dal punto di vista farmacodinamico, l'efficacia terapeutica e l'induzione di effetti indesiderati tossici sono strettamente correlate al rapporto tra i processi anabolici e quelli catabolici (Myers, 1981), ovvero alla trasformazione in analoghi nucleosidici trifosfati, incorporati in seguito negli acidi nucleici o alla trasformazione in cataboliti inattivi. Il farmaco può infatti seguire diversi destini metabolici: più dell'80% della dose viene inattivata mediante biotrasformazione principalmente a livello epatico, circa il 15-20% del 5-FU viene eliminato come tale nelle urine e solo una piccola frazione resta disponibile per esercitare la sua azione tossica a livello cellulare. Questi processi, anabolici e catabolici, presentano una notevole variabilità interindividuale, con conseguenze importanti sulla risposta clinica dei diversi pazienti alla terapia.

2.1 Anabolismo

Il 5-FU di per sé è una molecola inattiva nei confronti delle cellule normali e tumorali; acquisisce la sua attività citotossica in seguito alle trasformazioni che subisce all'interno della cellula. La penetrazione del farmaco nella cellula avviene sia per diffusione passiva che attraverso il sistema di trasporto dell'uracile (Jacquez, 1962; Kessel e Hall, 1967; Wohlueter *et al.*, 1980; Bajetta *et al.*, 1996).

Nella cellula, il 5-FU può seguire le stesse vie metaboliche dell'uracile, in quanto la presenza del fluoro non interferisce con l'anabolismo (**Figura 2**).

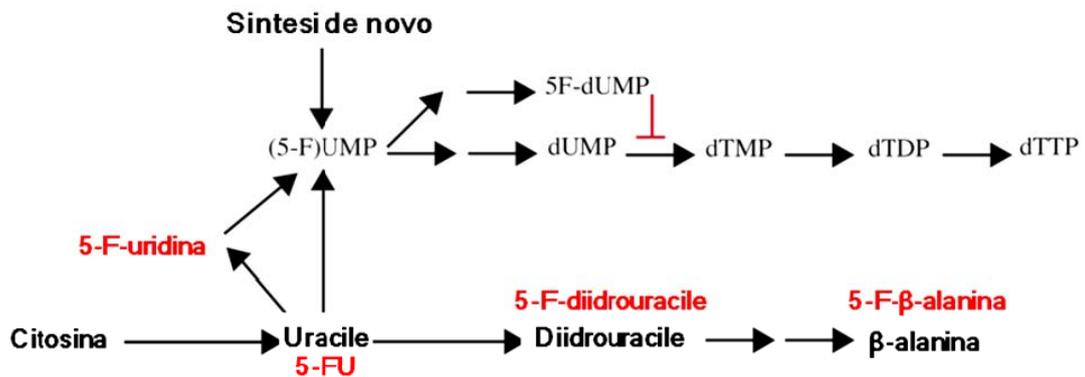


Figura 2. Via metabolica del 5-fluorouracile

Le tappe fondamentali sono le seguenti:

- 1) conversione, ad opera della timidina-fosforilasi (TP) e timidina-chinasi, in 5-fluorodesossiuridina monofosfato (FdUMP) che inibisce, bloccandolo, l'enzima timidilato-sintetasi (TS), determinando l'arresto della sintesi di timidina e quindi di DNA;
- 2) conversione diretta, ad opera della orotidina-5'-monofosfato-fosforibosil-transferasi in presenza di 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP), o dell'uridin-fosforilasi e uridin-chinasi in 5-fluorouridina monofosfato (FUMP), successivamente fosforilato a 5-fluorouridina trifosfato (FUTP) che viene incorporato nell'RNA nucleare e citoplasmatico con conseguente alterazione delle sue funzioni;
- 3) conversione di FUMP in desossiribonucleotide (FdUMP) che viene poi fosforilato (FdUTP) e incorporato nel DNA con compromissione della sua stabilità.

Le fluoropirimidine possono essere anche utilizzate come substrato nella biosintesi degli zuccheri fluorouridildifosfato (FUDP) come FUDP-esosi e FUDP-N-acetilesosoamine, necessari per la glicosilazione di proteine e lipidi implicati nel

metabolismo di membrane nucleari e citoplasmatiche. Non sono stati tuttavia definiti gli effetti biologici di questi zuccheri contenenti sostituzioni fluoropirimidiniche che potrebbero alterare le funzioni delle membrane cellulari (Chu *et al.*, 1993; Bajetta *et al.*, 1996).

2.2 Meccanismo d'azione

Malgrado i numerosi studi svolti e le conoscenze finora acquisite, non è stato tuttora definito se il 5-FU svolga un effetto citotossico letale o un transitorio effetto inibitore sulla proliferazione cellulare. Inoltre, non è chiaro se il 5-FU interferisca con la proliferazione delle cellule tumorali e delle cellule dell'organismo ospite con diversi meccanismi di citotossicità e se più di un meccanismo possa contribuire alla citotossicità del 5-FU.

Pur non essendo del tutto chiarite le molteplici funzioni biochimiche del 5-FU, quella a cui attualmente viene attribuita la maggiore importanza è l'inibizione di TS da parte di FdUMP, che rappresenta il meccanismo più studiato e meglio conosciuto del 5-FU (**Figura 3**, Machover, 1991).

La maggior parte delle cellule di mammifero utilizza TS per la sintesi di dTMP a partire da dUMP: questo processo dipende dalla metilazione dell'anello pirimidinico in posizione 5 in presenza di 5,10-metilentetraidrofolato (CH₂-THF) che si comporta da donatore di gruppi metilici (Grem, 1990).

Poiché FdUMP è caratterizzato da un'elevata affinità per l'enzima, maggiore rispetto a quella di dUMP, TS viene bloccata poichè risulta impedita la formazione di dTMP. TS rappresenta infatti l'unica fonte per la sintesi *de novo* di dTMP nelle cellule. Per

indurre questo effetto FdUMP deve formare un complesso ternario con CH₂-THF e TS attraverso interazione ad alta affinità.

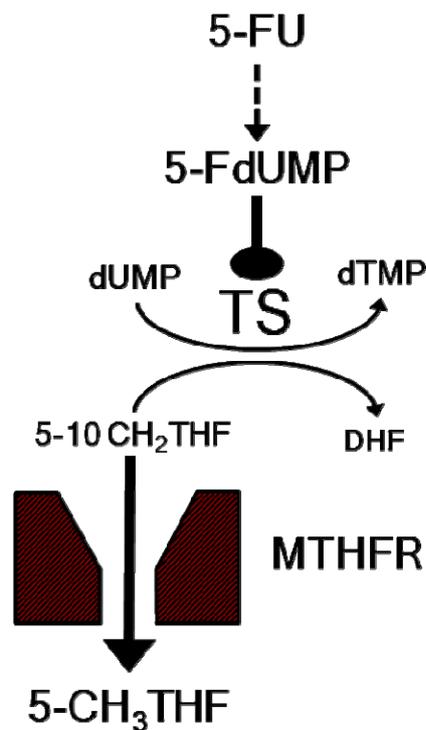


Figura 3. Meccanismo d'azione del 5-FU

Per la formazione di questo complesso è importante che sia disponibile un'adeguata concentrazione intracellulare di folati ridotti: se la concentrazione di cofattori ridotti aumenta, la dissociazione di FdUMP dal complesso ternario è impedita (Santi e McHenry, 1972; Santi *et al.*, 1974; Danenberg e Danenberg, 1978; **Figura 3**). Ciò è in accordo con la dimostrazione, ottenuta mediante studi sia clinici che sperimentali, che la mancanza di efficacia antitumorale può essere in alcuni casi superata per mezzo della somministrazione di folati ridotti, ad esempio l'acido folinico (Evans *et al.*, 1981; Hakala, 1984; Grem *et al.*, 1987; De Lap, 1988).

L'importanza clinica di TS nello sviluppo della resistenza tumorale al 5-FU è stata suggerita dalla dimostrazione che l'esposizione delle cellule neoplastiche all'azione del 5-FU induce un aumento di espressione di TS e che alti livelli di tale enzima sono correlati a resistenza verso il 5-FU (Johnston *et al.*, 1995).

Per quanto riguarda l'interazione tra 5-FU ed RNA, molti studi hanno dimostrato che FUTP viene inserito nell'RNA ribosomiale, messaggero e *transfer*, al posto di UTP (Mandel, 1969; Ramberg *et al.*, 1978; Dolnick e Pink, 1983; Herrick e Kufe, 1984; Cohen e Glezer, 1985; Armstrong *et al.*, 1986). Rimane da chiarire quale specifico danno funzionale possa essere causato da questa incorporazione e la conseguente correlazione con la citotossicità delle fluoropirimidine.

L'interesse per questo meccanismo d'azione è stato rinnovato dagli studi sui farmaci che possono modulare il metabolismo del 5-FU e la sua incorporazione nell'RNA. Scherf e collaboratori (2000) hanno studiato l'effetto di un ampio gruppo di farmaci con diverso meccanismo d'azione, utilizzando la tecnica dei *microarrays*: in questo studio il 5-FU si colloca tra i farmaci che agiscono sull'RNA piuttosto che in quello degli inibitori puri di TS.

È attualmente noto che sia l'uracile che il 5-FU possono essere inseriti nel DNA, dopo trasformazione nei rispettivi nucleotidi trifosfati, al posto di dTTP (Ingraham *et al.*, 1982). L'inibizione di TS da parte di FdUMP può favorire questa incorporazione in quanto viene bloccata la produzione di dTTP e di conseguenza aumenta il *pool* di FdUMP e di dUMP e quindi di FdUTP e dUTP (Myers *et al.*, 1975; Tanaka *et al.*, 1981; Cheng e Nakayama, 1983; Schuetz *et al.*, 1984). Dopo l'incorporazione di FdUTP e di dUTP nel DNA, ad opera della DNA polimerasi, l'uracilglicosilasi, un enzima di riparazione del DNA, può rimuovere l'uracile o il 5-FU incorporato

(Caradonna e Cheng, 1980). Sembra tuttavia che, se il 5-FU o l'uracile sono incorporati in quantità notevoli, il processo di riparazione possa produrre un danno alla struttura del DNA e che, se tale danno fosse abbastanza esteso, il DNA possa non essere riparato con conseguente frammentazione del DNA stesso (Lonn e Lonn, 1984; Schuetz e Diasio, 1985; Lonn e Lonn, 1986; Schuetz *et al.*, 1988A; Schuetz *et al.*, 1988B).

È noto inoltre che il 5-FU possa alterare le funzioni della membrana cellulare determinando variazioni del potenziale elettrico transmembranario (Walliser e Redman, 1978) e alterazioni strutturali della membrana attraverso un'interferenza con la sintesi delle glicoproteine (Kessel, 1980). Alcuni autori hanno dimostrato che questo effetto può essere associato ad un aumento del volume cellulare che rende le cellule più suscettibili alla lisi. L'importanza di questi effetti di membrana non è stata ben studiata ed il loro contributo alla citotossicità resta per ora non determinato.

2.3 Catabolismo

La disponibilità del 5-FU per l'anabolismo intracellulare dipende principalmente dal catabolismo del farmaco nei tessuti: più dell'80% della dose di 5-FU somministrata subisce infatti un processo di *clearance* metabolica (Haggie *et al.*, 1987).

Nelle cellule eucariote la prima delle tre tappe della via catabolica delle basi pirimidiniche timina e uracile, seguita anche dal 5-FU, è mediata dall'enzima diidropirimidina deidrogenasi (DPD). DPD agisce determinando la riduzione del doppio legame dell'anello pirimidinico con formazione di 5-fluoro-5,6-diidrouracile (5-FDHU, **Figura 4**).

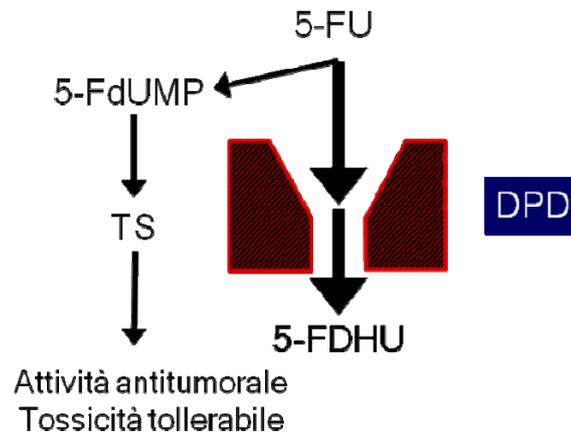


Figura 4. Catabolismo del 5-FU

Il 5-FDHU è un composto instabile in soluzione acquosa e viene rapidamente convertito ad opera della diidropirimidinasi (Maguire e Dudley, 1978) in acido 5-fluoro-ureidopropionico (FUPA) e quindi, ad opera della β -ureidopropionasi (Sanno *et al.*, 1979), in α -fluoro- β -alanina (FBAL) che è il principale metabolita urinario del 5-FU (**Figura 4**).

La prima tappa del catabolismo del 5-FU, mediata da DPD, costituisce la tappa limitante dell'intera via metabolica (Shiotani e Weber, 1981), DPD può quindi essere considerato l'enzima di regolazione di tale via. Questo enzima è espresso principalmente a livello epatico, ma anche in altri tessuti quali, per esempio, la mucosa intestinale: la degradazione del farmaco in siti extraepatici può spiegare il fatto che non è necessario ridurre le dosi di 5-FU in pazienti con funzione epatica alterata. Una piccola quantità di 5-FU, corrispondente al 2-3% della dose totale somministrata, è escreta anche attraverso la bile (Sweeny *et al.*, 1987): a questo livello si ritrova un composto che deriva dalla coniugazione di FBAL con acido colico ad opera

dell'enzima n-acil-CoA transferasi (Vassey, 1979). E' stato visto, infine, che nel fegato di ratto, oltre alle trasformazioni cataboliche sopra descritte, si può avere anche la trasformazione del 5-FU in composto inattivo per coniugazione con acido glucuronico (Sommadossi *et al.*, 1985).

2.4 Farmacocinetica

Lo studio della farmacocinetica del 5-FU riveste particolare importanza in considerazione dell'ampia scelta di modalità e vie di somministrazione disponibili per questo farmaco.

La somministrazione orale del 5-FU è stata abbandonata a causa della notevole variabilità della biodisponibilità, della concentrazione massima plasmatica e del tempo necessario per raggiungerla (Cohen *et al.*, 1974; Christophidis *et al.*, 1987). Dopo somministrazione orale, infatti, una frazione variabile di 5-FU, inferiore al 75%, raggiunge la circolazione sistemica. Le cause di questa variabilità dipendono probabilmente da ostacoli nell'assorbimento in relazione alle diverse condizioni di pH del tratto gastroenterico prossimale o al catabolismo da parte della DPD presente nella mucosa intestinale (Naguib *et al.*, 1985).

Per questa ragione il 5-FU è generalmente somministrato per via endovenosa: attraverso questa via il farmaco entra rapidamente nello spazio extracellulare, compreso il liquido cerebrospinale, apparentemente per diffusione semplice. Il 5-FU raggiunge livelli elevati e persistenti nei versamenti pleurici e nell'ascite (Clarkson *et al.*, 1964) e quantità significative penetrano anche nel sistema nervoso centrale, dove generalmente il 5-FU diffonde nel tessuto neoplastico più rapidamente rispetto al tessuto sano (Bourke *et al.*, 1973), che presenta una captazione piuttosto lenta. Il

volume di distribuzione è pari al 12-38% del peso corporeo, valore leggermente superiore a quello dello spazio extracellulare (MacMillan *et al.*, 1978).

La somministrazione endovenosa del 5-FU può essere effettuata in bolo o mediante infusione continua. Dopo iniezioni in bolo di dosi standard di 400-600 mg/m²/die (10-15 mg/Kg/die) si raggiunge un picco dei livelli plasmatici di 5-FU pari a 0,1-1,0 µM. La caduta delle concentrazioni ematiche del 5-FU è rapida, con una emivita di eliminazione ($t_{1/2}$) di 6-20 min, per cui si ottengono solo per poche ore livelli plasmatici sufficienti per ottenere effetti citotossici (Cohen *et al.*, 1974). La *clearance* plasmatica del 5-FU varia da 500 a 1500 ml/min (30-60 l/h), valore che eguaglia o supera il flusso epatico.

La farmacocinetica del 5-FU è considerata di tipo non lineare (Collins *et al.*, 1980): all'aumentare della dose, infatti, si osservano una riduzione della quota di estrazione epatica, un aumento della biodisponibilità e del $t_{1/2}$, una riduzione della *clearance* plasmatica e della *clearance* corporea totale. La non-linearità della cinetica del 5-FU riflette probabilmente la saturabilità dei processi metabolici o di trasporto a concentrazioni più elevate di farmaco e non permette di predire i livelli plasmatici o la tossicità ad alte dosi.

La somministrazione per infusione endovenosa continua di 1100 mg/m²/die determina livelli plasmatici di *steady-state* di 0,5-2,5 µM. Questi valori possono associarsi ad effetti indesiderati quali mucositi e diarrea, ma generalmente si osservano scarsi segni di tossicità midollare. Il rapporto fra il contenuto di 5-FU nel midollo osseo e i livelli plasmatici è infatti molto più basso nell'infusione endovenosa continua rispetto alla somministrazione in bolo e questo può spiegare la scarsa mielotossicità degli schemi basati sull'infusione continua (Fraile *et al.*, 1980).

La somministrazione mediante infusione endovenosa continua è, in generale, meglio tollerata rispetto alla somministrazione endovenosa in bolo, grazie anche all'impiego di pompe per infusione che consentono un miglior controllo delle concentrazioni e offrono la possibilità di effettuare anche infusioni cronomodulate nelle quali la quantità di 5-FU infusa varia nell'arco della giornata con incremento nelle ore serali, permettendo una maggiore tollerabilità del 5-FU (Lokich *et al.*, 1983).

Le vie intracarotidea e intratecale non sono raccomandate in quanto si associano ad aumentata formazione di metaboliti neurotossici quali fluoroacetato e fluorocitrato (Koenig e Patel, 1979).

Notevole interesse ha invece suscitato la possibilità di una somministrazione mediante infusione intrarteriosa epatica, nel tentativo di aumentare l'esposizione al farmaco delle lesioni tumorali epatiche primarie o secondarie e minimizzare la tossicità sistemica (Tono *et al.*, 2000). Questo metodo di somministrazione è particolarmente interessante considerando che molti tumori che metastatizzano al fegato sono sensibili al 5-FU, quali per esempio gli adenocarcinomi del tratto gastroenterico. Infatti, dal momento che il 5-FU ed in particolare la 5-fluoro-2'-deossiuridina, un altro farmaco appartenente alla classe delle fluoropirimidine sostituite, impiegato nella terapia antineoplastica, sono rapidamente captati e degradati dal fegato, l'infusione intrarteriosa epatica determina bassi livelli di concentrazione sistemica, che corrispondono a circa il 60% delle concentrazioni che si ottengono per infusione endovenosa periferica (Ensminger *et al.*, 1978). In questo modo il midollo osseo e la mucosa gastrointestinale sono protetti dagli effetti citotossici dei farmaci, dal momento che l'estrazione epatica di primo passaggio è pari al 19-51% per il 5-FU ed è anche più elevata per la 5-fluoro-2'-deossiuridina.

Al pari di quanto osservato con le infusioni continue sistemiche, l'infusione intrarteriosa epatica di 5-FU alla dose di 1110 mg/m²/die produce livelli plasmatici compresi tra 0,13 e 0,35 µM, spiegando in tal modo la mancanza di tossicità midollare con questo tipo di trattamento. Studi clinici hanno dimostrato che l'efficacia dell'infusione intrarteriosa epatica può raggiungere una percentuale di risposta maggiore del 50% (Ensminger e Gyves, 1983; Hohn *et al.*, 1986; Balch e Levin, 1987). Sfortunatamente, questo schema terapeutico non è però privo di effetti tossici: la principale tossicità è a livello biliare dove FBAL coniugato con acidi biliari determina colestasi (Hohn *et al.*, 1985; Sweeny *et al.*, 1988A; Sweeny *et al.*, 1988B). Un'alternativa è rappresentata dalla perfusione venosa portale: le metastasi di più piccole dimensioni possono infatti essere nutrite dal circolo portale anziché da quello arterioso.

Il 5-FU può essere somministrato per via intraperitoneale nel trattamento delle neoplasie ad interessamento peritoneale, quali i tumori gastrointestinali. In questo modo, grazie al drenaggio nel circolo portale e alla rapida metabolizzazione epatica, si ottiene un ridotto passaggio di farmaco nel circolo sistemico e quindi una ridotta incidenza di effetti indesiderati sistemici quali mielosoppressione e mucosite. L'efficacia di questo metodo di somministrazione resta tuttavia incerta a causa soprattutto delle frequenti alterazioni della superficie peritoneale indotte dal tumore stesso o da aderenze post-chirurgiche e post-radioterapiche che possono compromettere l'assorbimento e la *clearance* peritoneale del farmaco (Speyer *et al.*, 1980). Il 5-FU è stato utilizzato anche nel trattamento topico di varie malattie maligne e premaligne della pelle; questo metodo si è dimostrato utile nel trattamento della cheratosi attinica (Stoll, 1979) e si ritiene che possa essere efficace anche nel

carcinoma a cellule basali (Haynes *et al.*, 1985). La cinetica del 5-FU in questo tipo di somministrazione non è completamente nota, ma sembra che l'assorbimento nel circolo sistemico sia minimo.

2.5 Impieghi terapeutici

L'esperienza clinica indica che il 5-FU induce risposte parziali nel 10-30% dei pazienti con carcinoma metastatico della mammella e del tratto gastrointestinale; effetti benefici sono stati riportati anche nei tumori del fegato (sia primitivi che metastatici, soprattutto nel caso di neoplasie del tratto gastroenterico), del pancreas, dell'endometrio, della cervice uterina, dell'ovaio, della vulva e della vagina (per applicazioni topiche), della vescica e della regione testa-collo. Altre indicazioni per l'uso del 5-FU sono quelle per i carcinomi cutanei e lesioni precancerose della cute, corionepiteliomi, sindrome da carcinoide e malattie non neoplastiche quali il cheratoacantoma.

L'impiego principale del 5-FU è tuttavia rappresentato dal trattamento adiuvante di neoplasie del colon sottoposte a resezione chirurgica, che consiste nella somministrazione del 5-FU dopo la rimozione apparentemente radicale del tumore. Studi clinici condotti su un vasto numero di pazienti neoplastici hanno dimostrato un modesto, ma significativo aumento della sopravvivenza libera da malattia nei pazienti con carcinoma del colon in stadio Dukes C, che corrisponde ad ogni grado di T, N1-3, M0, sottoposti a trattamento con 5-FU associato a levamisolo, rispetto a quelli sottoposti al solo trattamento chirurgico (Moertel *et al.*, 1975; Laurie *et al.*, 1989). I pazienti con malattia localizzata al colon di stadio Dukes A e B1, corrispondenti a T1-2, N0, M0, mostrano un vantaggio minimo derivante dal trattamento adiuvante con 5-

FU per cui non si considerano buoni candidati a questo tipo di terapia, presentando inoltre una prognosi relativamente favorevole associata al trattamento chirurgico da solo. Maggiori indicazioni possono presentarsi per i pazienti con stadio Dukes B2 che hanno un rischio maggiore di recidiva di malattia a causa della infiltrazione della tonaca muscolare.

Il trattamento adiuvante con 5-FU, in associazione con quello radioterapico, è indicato anche nei carcinomi rettali di stadi Dukes C, corrispondente a ogni grado di T, N1-3, M0, e B2 (T3-4, N0, M0) che presentano un rischio di recidiva locale di malattia più alto (NIH Consensus Conference, 1990).

Nei carcinomi rettali il 5-FU è impiegato, in associazione al trattamento radiante, anche come terapia neoadiuvante, prima dell'intervento chirurgico, per ridurre le dimensioni della massa neoplastica in modo da effettuare un trattamento chirurgico meno demolitivo e con minori probabilità di recidive post-chirurgiche. Il 5-FU è in grado di interagire con vari farmaci e alcune di queste interazioni sono sfruttate per aumentare l'efficacia del trattamento antineoplastico. A questo scopo possono essere impiegati farmaci che mancano di una attività propria antitumorale, ma che determinano una biomodulazione del 5-FU favorendo, con vari meccanismi, la sua azione.

Tra le principali interazioni del 5-FU le più note sono quelle con il metotressato e con il leucovorin. L'associazione di due farmaci è utilizzata nel trattamento adiuvante del carcinoma mammario sia primario che metastatico e, occasionalmente, nel trattamento dei carcinomi della testa e del collo. L'efficacia del metotressato in associazione con il 5-FU dipende dalla sequenza con cui i due farmaci sono somministrati: infatti, solo la somministrazione di metotressato seguita da 5-FU ha un effetto sinergico, mentre i due

farmaci somministrati nella sequenza opposta interagiscono in maniera sfavorevole (Bertino *et al.*, 1977; Bowen *et al.*, 1978). Le basi biochimiche del sinergismo tra metotressato e 5-FU somministrati in sequenza sono rappresentate dall'aumento dell'*uptake* cellulare di 5-FU, con incremento dell'incorporazione nell'RNA e della formazione di FdUMP. Si pensa che la biomodulazione del 5-FU sia secondaria all'aumento della disponibilità di 5-fosforibosil-1-pirofosfato che fa seguito al pretrattamento con metotressato (Cadman *et al.*, 1979).

Più recentemente è cresciuto l'interesse per l'associazione del 5-FU con acido folinico (leucovorin, LV), basata sull'osservazione che l'inibizione di TS richiede la presenza di folati ridotti per un effetto ottimale (Ullmann *et al.*, 1978). Esperimenti su linee cellulari *in vitro* e studi clinici hanno dimostrato che la somministrazione di LV aumenta la citotossicità del 5-FU, ma non conferisce una maggiore selettività (Hakala, 1984; De Lap, 1988) e l'associazione del 5-FU con LV è indicata soprattutto nella terapia del carcinoma del colon-retto, anche a scopo adiuvante, nella dose di 370 mg/m² di 5-FU e 20-100 mg/m² di LV. Altre possibilità per la biomodulazione del 5-FU sono rappresentate dalla somministrazione di altre pirimidine, quali timina e uracile, che competono con la stessa via catabolica del 5-FU e determinano un aumento di concentrazione e del tempo di permanenza in circolo del 5-FU, oppure l'uso di farmaci che interferiscono con la biosintesi delle pirimidine (Martin *et al.*, 1978; Au *et al.*, 1982).

Gli studi più recenti sono rivolti alla valutazione dell'associazione del 5-FU con oxaliplatino e/o irinotecano. L'oxaliplatino (LOHP) è un complesso di coordinazione diamminocicloesano del platino che esercita il proprio effetto citotossico mediante la formazione di addotti nel DNA. In studi condotti su pazienti affetti da carcinoma

colorettale metastatico pretrattati con 5-FU, l'LOHP somministrato in dose di 130 mg/m² e.v. ogni 3 settimane ha prodotto risposte obiettive nel 10-11% dei casi (Machover *et al.*, 1996). In seguito studi di fase II hanno valutato l'attività e la fattibilità dell'associazione dell'LOHP al 5-FU/LV in pazienti con carcinoma colorettale metastatico, dimostrando una percentuale di risposte obiettive del 20-30% in pazienti pretrattati con 5-FU e del 40-50% in pazienti *naive* (Levi *et al.*, 1992; De Gramont *et al.*, 1997). Le tossicità dose-limitanti sono risultate essere la neutropenia di grado 3-4 (40% dei pazienti) e la neuropatia periferica di grado 2-3 (30-40% dei pazienti).

L'irinotecano (CPT-11) è un inibitore dell'enzima topoisomerasi I, grazie al suo innovativo meccanismo di azione, si è rivelato attivo sia in prima linea che in pazienti pretrattati con 5-FU, con un tasso di remissioni obiettive del 10-25%. Di particolare rilievo sono i risultati di due studi randomizzati di fase III che hanno confrontato un trattamento di prima linea con CPT-11+5-FU/LV con il solo 5-FU/LV (Douillard *et al.*, 2000; Saltz *et al.*, 2000). Il dato più interessante che emerge da questi due studi è l'evidenza che trattare pazienti con carcinoma colo-rettale avanzato con una terapia di prima linea più attiva comprendente CPT-11 e 5-FU/LV determina un significativo prolungamento della sopravvivenza, nonostante che in entrambi gli studi circa i 2/3 dei pazienti trattati con il solo 5-FU/LV avessero ricevuto una terapia di seconda linea spesso comprendente anche il CPT-11.

Più recentemente studi preclinici hanno dimostrato che la triplice associazione di irinotecano, oxaliplatino e 5-FU possiede una attività sinergica nel carcinoma colorettale (Fischel *et al.*, 2001). Inoltre studi clinici evidenziano che questi tre farmaci possiedono differenti tossicità dose-limitanti e, soprattutto, dimostrano come,

nel carcinoma colo-rettale metastatico, un trattamento di prima linea più attivo è associato ad un incremento della sopravvivenza e consente di riportare alla resecabilità chirurgica una quota di pazienti con malattia metastatica inizialmente non resecabile e che questi pazienti avranno una sopravvivenze a 5 anni del 30-40%, risultati del tutto sovrapponibili a quelli dei pazienti operabili sin dall'inizio (Buyse *et al.*, 2000; Adam *et al.*, 2001). È stato inoltre evidenziato che un miglior controllo della malattia si ottiene in quei pazienti che vengono esposti a tutti e tre i farmaci (Goldberg *et al.*, 2004; Tournigard *et al.*, 2004).

2.6 Meccanismi di resistenza

Tutte le tappe dell'anabolismo e del catabolismo del 5-FU possono teoricamente essere alterate in modo da determinare resistenza nei confronti di questo farmaco. A conferma di tale possibilità sono stati descritti vari meccanismi di resistenza al 5-FU, sia naturale che acquisita.

Un meccanismo di resistenza potenzialmente importante, ma tuttora poco studiato, è rappresentato da una rapida degradazione del 5-FU causata da un'elevata attività DPD tumorale. Molto più studiati sono invece i meccanismi di resistenza dovuti ad alterazioni degli enzimi della via anabolica, fra cui possiamo ricordare i seguenti:

- 1) deficit (assenza o attività ridotta) degli enzimi richiesti per l'attivazione del 5-FU (TP, uridinchinasi, uridinfosforilasi, acido orotico-fosforilasi) (Reichard *et al.*, 1959; Reichard *et al.*, 1962; Skold, 1963; Goldberg *et al.*, 1966; Ardalan *et al.*, 1978);
- 2) riduzione dell'incorporazione del 5-FU nell'RNA e nel DNA per ridotta attività della pirimidina-monofosfato-chinasi o maggior tolleranza verso l'incorporazione di analoghi fluorurati (Chu *et al.*, 1991);

3) alterazioni dell'enzima TS. Le alterazioni strutturali dell'enzima lo rendono insensibile all'inibizione da parte di FdUMP (Barbour *et al.*, 1990), consentendogli, per esempio, di discriminare con maggiore selettività il substrato naturale rispetto agli analoghi fluorurati (Houghton e Houghton, 1984) e riducendo l'affinità per FdUMP. Una produzione di TS in eccesso è un fenomeno di resistenza ben conosciuto e può dipendere da meccanismi di amplificazione genica (Berger *et al.*, 1985; Clark *et al.*, 1987). È stato infatti dimostrato che l'espressione di TS è controllata da un meccanismo di autoregolazione a *feedback*, per mezzo del quale è la proteina stessa a controllare l'efficienza della traduzione del proprio mRNA. Questo meccanismo provvede ad una rapida modulazione della quantità di TS necessaria per la divisione cellulare, ma può anche essere un importante meccanismo attraverso il quale le cellule maligne riducono rapidamente la loro sensibilità agli effetti del 5-FU (Swain *et al.*, 1989; Chu e Takimoto, 1993, **Figura 5**).

Un'ulteriore causa di resistenza al 5-FU è rappresentata dalla carenza di folati ridotti all'interno della cellula, che non consente la stabilizzazione del complesso ternario con TS (Ullman *et al.*, 1978). Studi sperimentali e clinici hanno dimostrato che l'aggiunta di 5-formiltetraidrofolato (leucovorin) aumenta l'efficacia del 5-FU. Fra tutti i meccanismi descritti, la carenza di folati e l'iperespressione di TS sono gli unici per cui sia stata dimostrata una correlazione con la resistenza al farmaco in campo clinico (Grem *et al.*, 1987).

L'incremento delle conoscenze sui meccanismi di resistenza ha promosso numerosi studi farmacologici volti ad aumentare la citotossicità dei farmaci attraverso la modulazione biochimica del loro metabolismo.

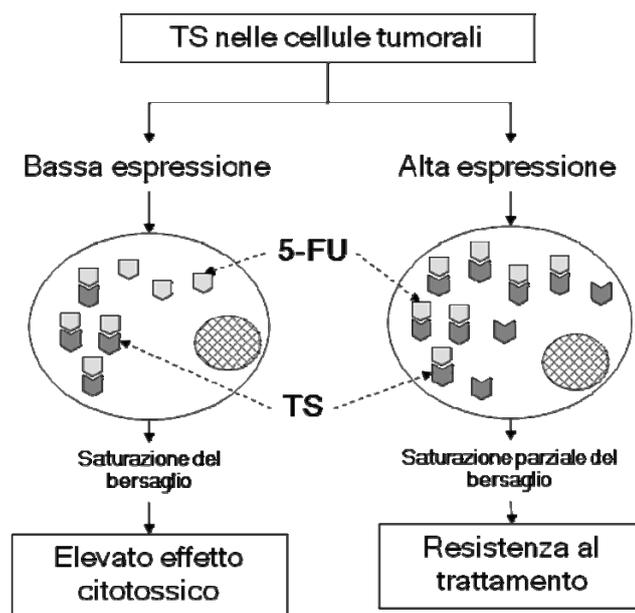


Figura 5. Effetto citotossico del 5-FU in relazione all'espressione di TS

2.7 Reazioni avverse

La tossicità del 5-FU si può manifestare a carico di vari organi e apparati e, nella maggior parte dei casi, compare dopo alcuni giorni dall'inizio del trattamento.

I primi sintomi a comparire nel corso del trattamento interessano soprattutto l'apparato gastroenterico: i più frequenti e precoci sono rappresentati da anoressia, nausea e vomito, seguiti da stomatite e diarrea. Le ulcerazioni del tratto gastroenterico, presenti anche dopo infusione del farmaco in arteria epatica, possono portare a diarrea grave, shock e morte, soprattutto in pazienti trattati con 5-FU in infusione continua o in quelli trattati con 5-FU e levofolinato di calcio.

Sul midollo emopoietico il farmaco, soprattutto se somministrato per via endovenosa in bolo, può causare mielodepressione con leuco- e trombo-citopenia, che determinano un aumento della suscettibilità alle infezioni e tendenza alle emorragie, con

conseguenze talvolta mortali. Il massimo livello di depressione midollare viene raggiunto dopo 10-14 giorni dall'inizio della terapia, con ritorno alla normalità dopo circa 1 mese; anche l'anemia è possibile, ma questa sembra essere meno frequente.

Sono possibili alterazioni degli annessi cutanei con modesta perdita di capelli, che raramente progredisce fino alla totale alopecia, distrofie ungueali, dermatiti, aumentata pigmentazione e atrofia della cute e infine pellagra per inibizione della conversione di triptofano ad acido nicotinico. Una grave manifestazione di tossicità secondaria alla somministrazione di 5-FU e profarmaci è la sindrome mano-piede, caratterizzata da infiammazione e desquamazione cutanea delle mani e dei piedi (eritrodismetria palmo-plantare). In seguito a somministrazione topica il 5-FU può esacerbare transitoriamente cloasma e acne rosacea. Altri effetti avversi indotti dal 5-FU sono rappresentati da: reazioni allergiche con *rash* cutanei, dermatiti eritemato-maculose e fotosensibilizzazione.

Sul sistema nervoso centrale il 5-FU può determinare alterazioni responsabili di atassia cerebellare acuta (circa nel 2% dei casi) ed altri sintomi quali confusione mentale, difficoltà di concentrazione, riduzione della memoria e deterioramento mentale nei pazienti anziani. Questi disturbi sono reversibili dopo sospensione del trattamento ed è importante la diagnosi differenziale con l'interessamento metastatico del cervelletto; un'altra possibile manifestazione neurologica è infine la mielopatia.

A carico dell'apparato visivo sono state descritte congiuntiviti e fibrosi del dotto lacrimale mentre a carico dell'apparato cardiovascolare sono stati riportati dolore toracico acuto e alterazioni di tipo ischemico all'ECG, infarto miocardico acuto, tachicardia, edema polmonare.

3. Profarmaci del 5-FU

3.1 Capecitabina

La capecitabina è un profarmaco del 5-FU che offre il vantaggio di poter essere somministrato per via orale grazie all'elevato assorbimento intestinale e alla biodisponibilità, che supera l'80% della dose somministrata (**Figura 6**). La molecola di capecitabina supera immodificata la mucosa intestinale, evitando in questo modo i problemi di tossicità locale che si hanno per esempio con la doxifluridina (5-DFUR), un altro profarmaco del 5-FU.

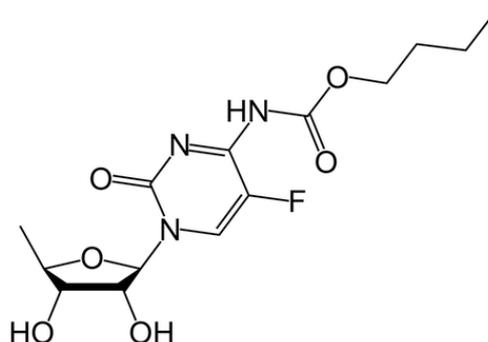


Figura 6. Struttura chimica della capecitabina

La capecitabina come tale, infatti, non ha effetto citotossico e gli enzimi della mucosa intestinale non sono in grado di attivarla come invece avviene con 5-DFUR. La capecitabina pertanto compare nel circolo portale nella sua forma inattiva e a livello epatico avviene la conversione in 5'-deossi-5-fluorocitidina (5-DFCR) ad opera dell'isoenzima A della acilamidasi epatica, per il quale ha un'affinità particolarmente elevata. A livello del tessuto neoplastico la 5-DFCR viene a sua volta convertita in 5-DFUR dalla citidina deaminasi e infine convertita in 5-FU ad opera della timidina fosforilasi (TP). L'attivazione intratumorale del profarmaco consente di minimizzare

l'esposizione dei tessuti al 5-FU e quindi di ridurre gli effetti tossici sistemici (Bajetta *et al.*, 1996).

L'attività antitumorale della capecitabina è stata dimostrata *in vivo* in modelli tumorali sensibili e resistenti al 5-FU; in particolare, l'efficacia antitumorale della capecitabina nei confronti di tumori umani xenotrapiantati in topi è maggiore rispetto al 5-FU e alla 5-DFUR.

La via di somministrazione di scelta è quella orale: dopo 1,2 ore dalla somministrazione di 2500 mg/m² si raggiunge la massima concentrazione plasmatica con un t_{1/2} di 0,77 ore. La conversione in 5-DFCR e successivamente in 5-DFUR è estremamente rapida e questi profarmaci rimangono in circolo per un periodo molto breve.

Gli effetti collaterali che si possono presentare in seguito alla somministrazione di capecitabina sono dello stesso tipo di quelli descritti per il 5-FU. Studi preclinici e clinici hanno però dimostrato un elevato indice terapeutico per la capecitabina, con l'osservazione di effetti collaterali rilevanti, soprattutto diarrea e tossicità ematologica, solo per dosaggi elevati, superiori a 179,7 mg/Kg/die (Bajetta *et al.*, 1996).

3.2 Tegafur

Il tegafur (**Figura 7**) è presente in due preparazioni farmaceutiche, in combinazione con uracile (UFT) e con 5-cloro-2,4-diidrossipiridina e acido oxonico (S-1). Il tegafur è un profarmaco del 5-FU attivo dopo somministrazione orale. Il tegafur viene metabolizzato lentamente per idrossilazione a 5-FU, e questo permette di mantenere costanti le concentrazioni di 5-FU nelle cellule tumorali prolungando l'effetto chemioterapico (Punt, 1998). In studi clinici condotti negli Stati Uniti, l'UFT non ha

dimostrato evidenti benefici clinici rispetto al 5-FU e la sperimentazione è stata interrotta a causa delle tossicità indotte dal trattamento.

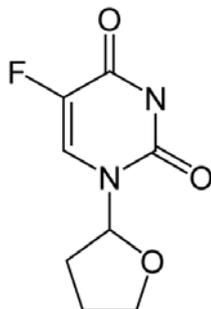


Figura 7. Struttura chimica del tegafur

Ulteriori ricerche hanno infatti dimostrato che dopo l'attivazione del tegafur a 5-FU, l'uracile può inibire l'attività diidropirimidino-deidrogenasica epatica, causando un incremento delle concentrazioni di 5-FU e conseguente tossicità; tale inibizione avviene anche nelle cellule tumorali, risultandone una aumentata esposizione delle cellule stesse al 5-FU. In studi condotti sugli animali è stato dimostrato che il miglior rapporto molare tra uracile e tegafur è di 4:1 (Punt, 1998).

I risultati di studi di fase I con UFT impiegato a una dose di 300-500 mg/m²/die hanno stabilito che lo schema terapeutico ottimale era quello che prevedeva la somministrazione al dosaggio di 400 mg/m²/die in tre dosi distinte ogni 4 settimane. Inoltre, studi farmacocinetici hanno dimostrato che le variazioni della distribuzione dell'UFT sono linearmente correlate alla dose somministrata, con un'emivita terminale di 6-7 ore. La comparsa di gravi effetti tossici, simili a quelli comunemente osservati dopo somministrazione di altre fluoropirimidine, è stata superata mediante frazionamento della dose giornaliera totale. Un aspetto interessante di UFT è che esso

ha indotto risposte cliniche anche in pazienti nei quali un precedente trattamento con 5-FU non aveva prodotto alcun miglioramento del quadro oggettivo di malattia. In altri studi clinici di fase I, la dose raccomandata era fissata a 800 mg/m²/die per 5 giorni o 360 mg/m²/die per 28 giorni, essendo le tossicità dose-limitanti costituite da granulocitopenia e diarrea, rispettivamente (Punt, 1998).

L'analisi farmacocinetica mostra che i parametri di distribuzione ottenuti somministrando UFT più acido folinico sono sovrapponibili a quelli calcolati dopo impiego del solo UFT, suggerendo che i folati non sono in grado di alterare le cinetiche di tegafur, uracile o 5-FU. In studi clinici di fase I, la dose massima tollerabile di UFT in associazione con acido folinico è stata 390 mg/m²/die in uno schema bisettimanale e 350 mg/m²/die in uno schema terapeutico di 28 giorni. In studi clinici di fase II la percentuale di risposte è stata del 25-42% in pazienti che non erano stati trattati precedentemente, con una sopravvivenza mediana di 12-13 mesi, mentre la percentuale di risposta completa in questi studi variava tra il 2 ed il 9%. Negli Stati Uniti sono stati approvati studi clinici randomizzati di fase III tesi a valutare l'efficacia dell'associazione UFT/LV confrontandola con quella di 5-FU/LV sia nel trattamento adiuvante che in quello di prima o seconda linea del carcinoma del colon-retto (Punt, 1998).

L'S-1 è una formulazione attiva per via orale costituita da tegafur, 5-cloro-2,4-diidrossipiridina, un inattivatore di DPD, e acido oxonico, un inibitore della fosforilazione del 5-FU nel tratto gastrointestinale, in un rapporto molare di 1:0,4:1, rispettivamente (Punt, 1998). Come con l'impiego dell'UFT, lo scopo della somministrazione di S-1 è quello di consentire un trattamento orale con fluoropirimidine e produrre un'esposizione plasmatica e tissutale prolungata al 5-FU.

In modelli di tumore di colon umano, S-1 ha un'attività antitumorale maggiore rispetto al 5-FU o all'UFT e, a causa della modulazione biochimica di DPD, ha mostrato un'attività citotossica sinergica con il cisplatino (Punt, 1998).

I risultati preliminari degli studi di fase I indicano che l'S-1, alla dose di 45 mg/m² somministrati in due dosi giornaliere per 4 settimane seguiti da una settimana di pausa, inibisce efficacemente DPD, e la diarrea rappresenta l'effetto tossico principale. In uno studio di fase II, la frequenza di risposte tumorali era del 17% in 30 pazienti con carcinoma del colon-retto trattati con S-1 alla dose di 100 mg/die per 4 settimane (Punt, 1998).

4. Farmacogenetica del 5-FU

La farmacogenetica è la disciplina che studia le basi genetiche della risposta ai farmaci. Le cause più frequenti di variabilità genetica consistono in polimorfismi della regione 5'-UTR e degli esoni. Cause meno importanti di variabilità di risposta ai farmaci sono i polimorfismi intronici e della regione 3'-UTR (**Figura 8**).

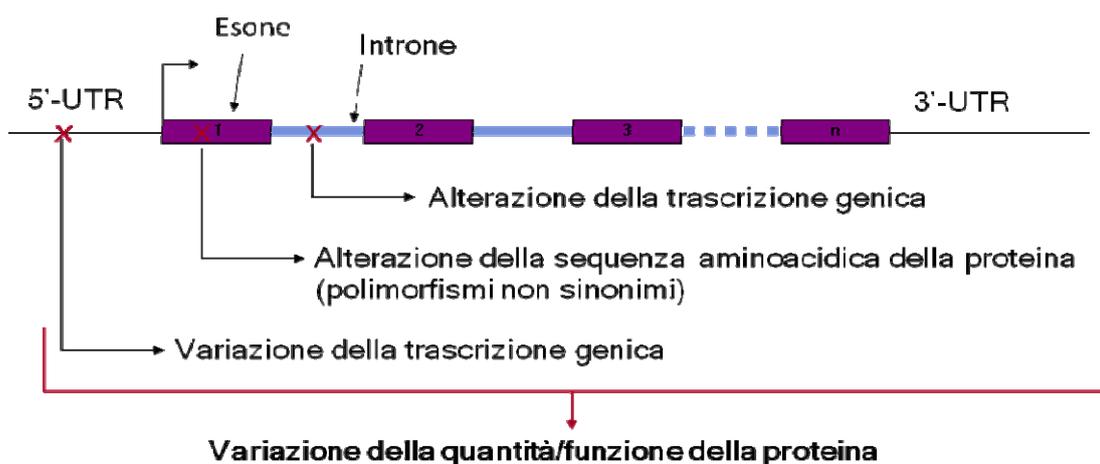


Figura 8. Cause di variabilità genetica

Tra i determinanti molecolari della risposta al 5-FU quelli più studiati sono rappresentati dagli enzimi diidropirimidina deidrogenasi (DPD), timidilato sintetasi (TS) e timidina fosforilasi (TP, **Figura 9**).

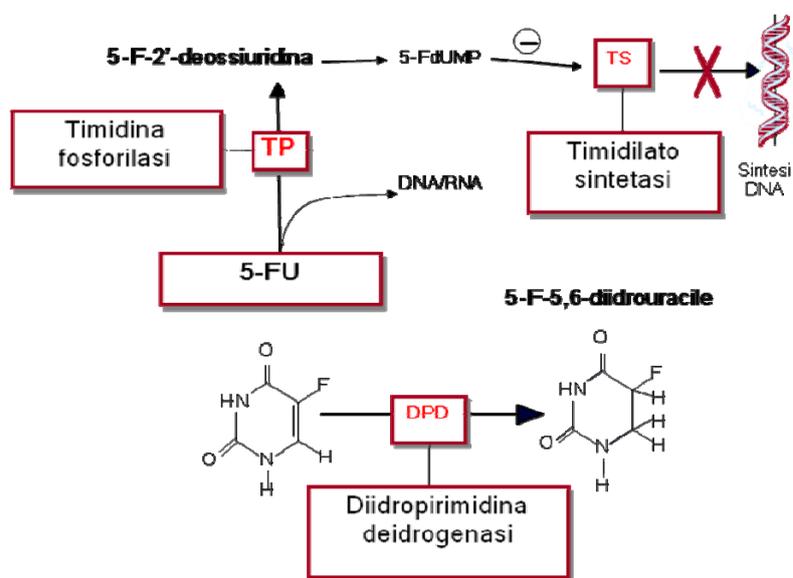


Figura 9. Principali determinanti molecolari dell'attività del 5-fluorouracile

4.1 Diidropirimidina deidrogenasi

La diidropirimidina deidrogenasi (DPD) è il principale enzima regolatore del metabolismo del 5-FU, poichè catalizza la tappa limitante della sua inattivazione. I substrati fisiologici di questo enzima sono rappresentati dalle pirimidine uracile e timina che vengono degradati con formazione finale di β -alanina.

La DPD è un omodimero a localizzazione citosolica con un peso molecolare di 200-216 kDa, a seconda della specie di mammifero considerata, (Van Kuilenburg *et al.*, 1997A) e la reazione enzimatica catalizzata implica una riduzione NADPH-dipendente delle pirimidine.

La clonazione e il sequenziamento del cDNA suino e umano hanno mostrato che DPD è una proteina composta da 1025 aminoacidi con un peso molecolare stimato di 111

kDa. Nella sequenza della proteina DPD ci sono alcune porzioni conservate che corrispondono ai siti di legame per il NADPH e per il FAD e a due gruppi ferro-solfuro. Una sequenza di 17 aminoacidi che contiene un sito di legame per il NADPH è stata individuata nella metà NH₂-terminale della proteina con inizio con l'aminoacido valina in posizione 335 e termine con l'aminoacido alanina in posizione 351, mentre il sito di legame per il FAD è rappresentato da una sequenza di 11 aminoacidi con inizio con l'aminoacido treonina in posizione 471 e fine con l'aminoacido aspartato in posizione 481 (Eggink *et al.*, 1990). Inoltre, le sequenze di 12 aminoacidi per il legame con gruppi ferro-solfuro [4Fe-4S] sono localizzati all'estremità COOH-terminale, tra i residui 953 e 964 e i residui 986 e 997 rispettivamente (Dupuis *et al.*, 1991). Il sito di legame per l'uracile è stato localizzato tra il sito di legame per il FAD e i gruppi ferro-solfuro in una regione corrispondente alla sequenza compresa fra l'aminoacido glicina in posizione 661 e l'aminoacido arginina in posizione 678 (Yokota *et al.*, 1994). La cinetica dell'enzima dimostra che il 5-FU costituisce il substrato a maggior affinità rispetto all'uracile. Naguib e collaboratori (1985) hanno misurato l'attività dell'enzima DPD in vari tessuti normali e neoplastici, trovando valori più elevati nel fegato e nei leucociti rispetto a quelli di altri tessuti quali polmone, pancreas e mucosa intestinale, dove DPD è tuttavia presente. Sono stati dimostrati valori misurabili e variabili di attività enzimatica DPD in differenti tumori umani xenotrapiantati in topi nudi e in linee cellulari tumorali umane.

Le cellule mononucleate del sangue periferico possono essere utilizzate come tessuto facilmente accessibile per la valutazione *in vivo* dell'attività DPD, sebbene le informazioni sulla correlazione tra attività DPD in tali cellule e nelle lesioni

neoplastiche siano scarse, per cui non è nota l'affidabilità della valutazione dell'attività DPD nei mononucleati del sangue periferico per predire la capacità del tumore di catabolizzare il 5-FU (McLeod *et al.*, 1998).

Il gene che codifica per l'enzima DPD è localizzato sul cromosoma 1, nella posizione 22 del suo braccio corto (1p22); tale gene è costituito da 23 esoni e 22 introni che, nell'insieme, danno luogo ad una sequenza nucleotidica pari a circa 150 Kb (Fernandez-Salguero *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 1997). L'esone 15, costituito da 69 bp, è l'esone più piccolo, mentre l'esone 23, costituito da 1404 bp, è quello più grande. Il sito d'inizio della traslazione è rappresentato dal codone ATG (*start codon*), che è stato individuato nell'esone 1; l'esone 23 contiene 168 nucleotidi della sequenza codificante seguiti dal codone di stop della trascrizione (TAA) e da una regione non tradotta di 1236 nucleotidi all'estremità 3'. Oltre agli esoni sono state determinate la lunghezza e la sequenza degli introni e delle regioni di confine fra introni ed esoni (siti di *splicing*). La conoscenza della struttura e organizzazione del gene DPD ha consentito l'identificazione e l'analisi molecolare di mutazioni che possono interferire con la regolare espressione ed attività catalitica dell'enzima.

La più nota fra le mutazioni del gene DPD consiste in una mutazione puntiforme con sostituzione della guanina (G) in posizione 1986 con una adenina (A). La mutazione si localizza nella sequenza GT del sito di riconoscimento per lo *splicing* all'estremità 5' dell'introne 14 (Meinsma *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1996; Vreken *et al.*, 1996A; Vreken *et al.*, 1996B; Van Kuilenburg *et al.*, 1997B). Tale mutazione, insieme a molte altre che caratterizzano il gene DPD, è indicata come IVS14+1G>A (**Figura 10**).

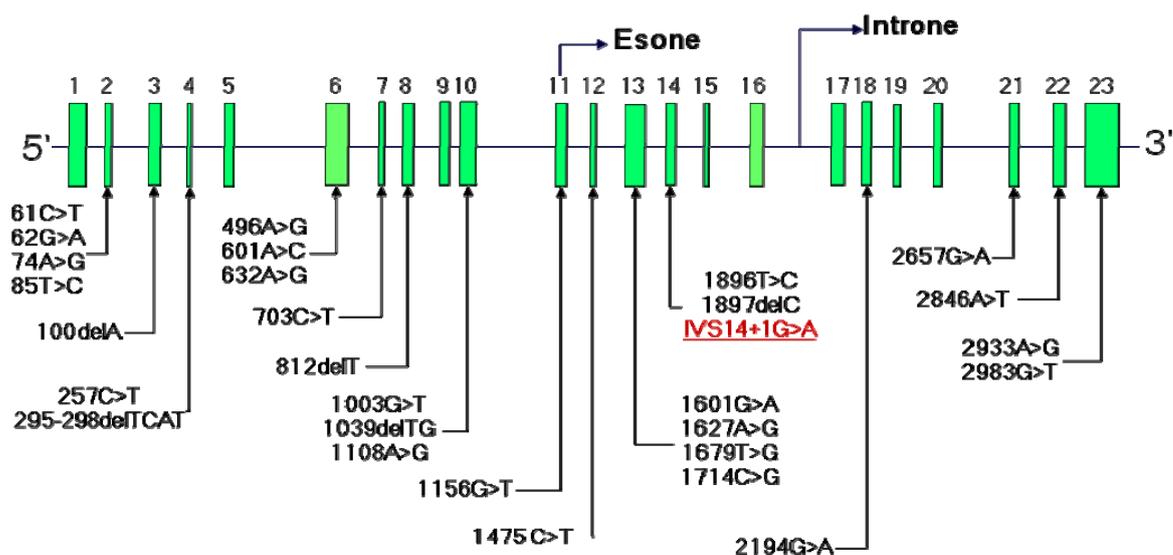


Figura 10. Polimorfismi del gene DPD

La mutazione non permette il riconoscimento del sito al momento dello *splicing* del pre-mRNA e ciò causa la delezione dell'intero esone che precede la mutazione con conseguente perdita di 165 bp. La delezione dell'esone 14 nell'RNA messaggero ha come risultato la delezione di 55 residui aminoacidici, dal 581 al 635, nella sequenza primaria della proteina DPD (**Figura 11**). Nella condizione di eterozigosi per la mutazione nel sito di *splicing* si riscontra una riduzione dell'attività DPD che diventa completa nei soggetti omozigoti e tale da determinare lo sviluppo di una grave tossicità se questi soggetti venissero trattati con 5-FU.

Questi dati indicano che la mutazione nel sito di *splicing* ha come risultato la sintesi di un enzima funzionalmente inattivo e inoltre confermano la modalità di trasmissione autosomica recessiva della mutazione, come già ipotizzato in base agli studi sull'attività catalitica.

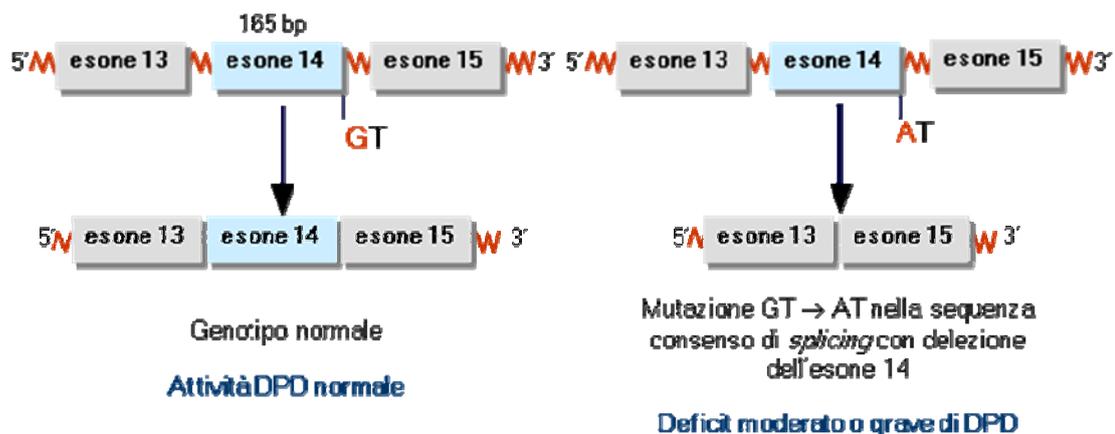


Figura 11. Mutazione nel sito di *splicing* dell'esone 14 del gene DPD

Il contenuto di proteina DPD, misurato con la tecnica del *Western blot* nei fibroblasti di membri delle famiglie in cui è presente la mutazione, correla con la ridotta attività catalitica. La mutazione determina quindi un mancato accumulo della proteina nella cellula. È interessante tuttavia notare che, anche se la proteina non si accumula nella cellula, il suo mRNA è comunque presente, indicando che la mancata produzione della proteina DPD non è dovuta a una particolare instabilità dell'mRNA difettoso rispetto a quello che codifica per la proteina attiva.

La frequenza dell'allele mutato nel sito di *splicing* calcolata in una popolazione di pazienti con neoplasia del colon-retto è stata dello 0,7% (Ridge *et al.*, 1998). Il riscontro della mutazione con una certa frequenza e in famiglie diverse, tra loro non correlate, indica una certa omogeneità nella distribuzione dell'allele mutato nel Nord Europa.

Oltre a quella del sito di *splicing* sono state descritte altre mutazioni del gene DPD, sebbene non tutte siano associate a un deficit di attività DPD. L'identificazione di diverse mutazioni nella popolazione normale implica non solo l'esistenza di diversi

alleli DPD, ma anche che diverse combinazioni di questi potrebbero spiegare l'ampia variabilità di attività DPD osservata rispetto alla media della popolazione.

Le altre mutazioni del gene DPD finora descritte sono:

- 1) tre diverse mutazioni puntiformi che producono sostituzioni di aminoacidi in regioni non conservate della molecola di DPD (Wei *et al.*, 1996).
- 2) Una mutazione puntiforme con sostituzione di G con A nel codone 534 che determina la sostituzione dell'aminoacido serina con asparagina. Nello studio di Ridge e collaboratori (1998) la mutazione è stata trovata allo stato di eterozigosi in 2 su 75 pazienti con neoplasie del colon-retto, con un'incidenza dell'allele mutato pari all'1,3%. Tuttavia in questi soggetti non sono stati riscontrati bassi livelli di attività DPD, e ciò suggerisce che la mutazione non influenza significativamente l'attività catalitica dell'enzima.
- 3) Una mutazione puntiforme con sostituzione di A con G nel codone 543 che determina la sostituzione dell'aminoacido isoleucina con una valina. Questa mutazione è stata descritta in associazione alla mutazione nel sito di *splicing*, sullo stesso allele, nello studio di Ridge e collaboratori (1998). Su 23 pazienti con neoplasie del colon-retto, sono stati descritti 10 eterozigoti e 1 omozigote per questa mutazione, con una frequenza dell'allele mutato nella popolazione del 26%. L'attività DPD nei soggetti in cui è presente questa mutazione varia in un intervallo molto ampio, da valori molto bassi, sicuramente associati a rischio di grave tossicità indotta da 5-FU, a valori normali. Si deve comunque considerare la frequente associazione di questa mutazione con la mutazione nel sito di *splicing* che sicuramente comporta una bassa attività enzimatica, per cui si ritiene che la mutazione nel codone 543 da sola non abbia un effetto

significativo sull'attività catalitica della DPD. Per questo motivo e per l'elevata frequenza dell'allele mutato nella popolazione, la mutazione nel codone 543 può essere considerata un comune polimorfismo del gene non particolarmente influente sul rischio di tossicità indotta da 5-FU.

- 4) Una mutazione puntiforme nel codone 974 con sostituzione dell'aminoacido aspartato con un residuo di valina, descritta in un paziente che aveva mostrato grave tossicità dopo trattamento con 5-FU (Ridge *et al.*, 1997). L'aminoacido sostituito non si trova in un sito catalitico dell'enzima; l'incidenza dell'allele mutato nella popolazione non è nota ma si tratta comunque di una mutazione rara.
- 5) Una delezione di 4 basi (TCAT) in posizione 296-299 descritta da Vreken e collaboratori (1997A) in una famiglia con deficit enzimatico. La delezione di 4 basi determina uno spostamento nella sequenza di lettura (*frameshift*) che porta ad un codone di stop prematuro nella sequenza codificante. Poiché il codone di stop si localizza prima del sito di legame del NADPH e dell'uracile (rispettivamente codificati dai nucleotidi 1001-1053 e 1960-1993) la proteina DPD codificata è completamente inattiva. Questo è in accordo con l'assenza di attività DPD nei fibroblasti degli individui omozigoti per questa mutazione. La delezione interessa una sequenza TCAT ripetuta in tandem, coinvolta nei processi di riarrangiamento del DNA. È probabile quindi che la mutazione si generi in conseguenza di *crossing-over* ineguale o di un errato appaiamento. Nella famiglia in cui la mutazione è stata descritta non esiste correlazione fra genotipo e fenotipo. Infatti, non tutti i soggetti nei quali la mutazione è stata descritta e che presentano bassi livelli di attività DPD mostrano le

manifestazioni cliniche legate al deficit enzimatico: è probabile quindi che altri fattori incidano sull'espressione del fenotipo clinico. Si ritiene che uno di questi fattori possa essere rappresentato dall'omeostasi della β -alanina.

- 6) Un *frameshift* ΔC 1897 che porta ad un prematuro arresto della traduzione prima del sito di legame dell'uracile (Vreken *et al.*, 1997A). La proteina mutante quindi non può esprimere nessuna attività catalitica residua e questo è in accordo con l'assenza di attività riscontrata nei fibroblasti dei soggetti portatori della mutazione.
- 7) Mutazioni non-senso C29R, R235W, R886H (Vreken *et al.*, 1997B). La mutazione C29R interessa un residuo di cisteina e determina un'alterazione della struttura secondaria e terziaria della proteina per alterazione di un ponte disolfuro; ciò determina la perdita di qualsiasi attività catalitica dell'enzima. La mutazione R235W determina la produzione di una proteina DPD mutante inattiva ma comunque stabile. La mutazione R886H non interessa un sito catalitico dell'enzima ma determina una modificazione della conformazione che ne riduce l'attività catalitica. La frequenza di queste mutazioni non è nota, ma si tratta comunque di mutazioni rare.

Il ruolo chiave svolto dall'enzima DPD nel metabolismo del 5-FU ha indotto ad ipotizzare che questo possa essere importante non soltanto a livello sistemico, nella detossificazione del farmaco, ma anche a livello dei tessuti, ed in particolare del tumore, dove può determinare una rapida inattivazione del farmaco e quindi la minore sensibilità al trattamento con fluoropirimidine. Questa ipotesi è stata verificata da Etienne e collaboratori (1994) in uno studio su linee cellulari e su tessuti tumorali, dove si dimostra l'associazione tra alta attività dell'enzima DPD e resistenza al 5-FU.

In modelli sperimentali *in vivo* di tumore xenotrapiantato in topi nudi è stata descritta una correlazione tra la sensibilità al 5-FU, l'attività enzimatica DPD e l'espressione genica, misurata con la tecnica della RT-PCR (Ichikawa *et al.*, 1999). Pertanto, i livelli di attività enzimatica e di mRNA di DPD sono fra loro correlati e sono predittivi di sensibilità al 5-FU.

Questa correlazione è stata confermata in altri studi nell'uomo. I livelli di mRNA di DPD quantificati con la tecnica della PCR competitiva sono risultati più bassi nel tessuto di tumori coloretali ed epatici rispetto al tessuto normale adiacente (Johnston *et al.*, 1999, McLeod *et al.*, 1998, Jiang *et al.*, 1997). Esiste una correlazione fra l'attività catalitica DPD e i livelli di mRNA determinati con la PCR competitiva (Johnston *et al.*, 1999), ma i livelli di mRNA nel tumore sono molto più bassi rispetto al tessuto normale di quanto non lo siano i livelli di proteina e l'attività enzimatica. Questo suggerisce l'esistenza di meccanismi di regolazione post-trascrizionale che possono modulare la traduzione dell'mRNA in proteina. Tali meccanismi erano già stati ipotizzati in uno studio di Takechi e collaboratori (1998), i quali avevano osservato in tumori coloretali xenotrapiantati in topi nudi l'assenza di correlazione fra i livelli di proteina e quelli dell'mRNA di DPD. Questa assenza di correlazione è confermata dalla valutazione di DPD con la metodica della immunistochemica che dà risultati concordanti con i livelli di proteina ma non con quelli dell'mRNA di DPD (Takenoue *et al.*, 2000).

In un gruppo di pazienti affetti da carcinoma del colon in stadio II o III sottoposti a terapia adiuvante con 5-FU non è stata descritta una differenza significativa nei livelli di mRNA di DPD fra i pazienti che presentavano o meno recidive né in associazione alla sopravvivenza, anche se l'intervallo libero da malattia tende ad essere più lungo in

presenza di bassi livelli di mRNA (Kornmann *et al.*, 2002). Il valore predittivo di risposta alle fluoropirimidine tuttavia aumenta in maniera significativa quando alla valutazione dei livelli di mRNA di DPD si associa quella di TS (Ishikawa *et al.*, 2003).

4.2 Timidina fosforilasi

La timidina fosforilasi (TP) è un enzima coinvolto nel metabolismo dei nucleosidi pirimidinici, catalizzando la reazione di fosforolisi reversibile della timidina, della dosossiiuridina e dei loro analoghi, portando alla formazione delle rispettive basi e di 2-desossiribosio-1-fosfato. L'enzima può anche determinare il trasferimento del residuo di desossiribosio da un desossinucleotide a una base per formare un secondo desossinucleotide.

Nelle cellule di mammifero la proteina consiste in un omodimero, formato da due subunità identiche, ognuna del peso molecolare di 55 kDa e non legate da ponti disolfuro. La proteina è labile al calore e in ambiente acido, ha un punto isoelettrico di 4,5 e non contiene residui glicosilati. Il gene che codifica per l'enzima TP è localizzato sul cromosoma 22, nella posizione 13 del suo braccio lungo (22q13). Tale gene è costituito da 10 esoni e 9 introni.

L'enzima è ampiamente espresso in molte cellule e tessuti umani, inclusi leucociti e piastrine, dove svolge il suo ruolo principale di regolazione dei livelli di TP nel plasma (Zimmerman *et al.*, 1964; Shaw *et al.*, 1988).

In seguito a studi che hanno mostrato la presenza di un'attività timidino-fosforilasica nel fattore di crescita endoteliale derivato dalle piastrine (PD-ECGF) è stata ipotizzata l'identità fra questo e l'enzima TP. Questa ipotesi è stata successivamente sostenuta dall'evidenza di uno stesso peso molecolare, una equivalente attività enzimatica e una

completa *cross*-reattività immunologica, e il confronto diretto della sequenza del PD-ECGF con un clone parziale di TP umana ha rivelato la completa identità di 120 residui aminoacidici. PD-ECGF stimola la chemiotassi e l'incorporazione di timidina triziata nelle cellule endoteliali *in vitro* e ha attività angiogenica *in vivo*. Sembra tuttavia che il suo meccanismo d'azione non sia quello classico dei fattori di crescita, mediato dalla attivazione di un recettore con conseguente attivazione di una cascata di segnali intracellulari, ma le attività chemiotattica e angiogenica sembrano piuttosto essere dovute alla molecola di 2-desossi-ribosio, prodotto di degradazione della reazione di fosforilazione; questo spiegherebbe l'importanza dell'attività timidino-fosforilasica per l'azione angiogenica di PD-ECGF. D'altra parte alcuni studi hanno dimostrato per TP la presenza di attività angiogenica e chemiotattica *in vitro*: la trasfezione dell'enzima nelle cellule di carcinoma mammario MCF7 o nelle cellule NIH 3T3 aumenta sia la vascolarizzazione che la crescita dei tumori che si sviluppano nei topi nudi dopo inoculo sottocutaneo di tali cellule (Moghaddam *et al.*, 1995).

La somministrazione di capecitabina genera il metabolita 5'-DFUR il quale, in quanto substrato di TP, può antagonizzare la biotrasformazione della timidina risultandone una inibizione indiretta dell'angiogenesi (**Figura 12**).

La regolazione dell'espressione di TP/PD-ECGF da parte di attivatori delle piastrine suggerisce il ruolo nella risposta al danno endoteliale (Shaw *et al.*, 1988). Oltre al suo presunto ruolo nel metabolismo e nell'omeostasi della timidina, TP ha una parte importante nell'attivazione metabolica del 5-FU, catalizzando la conversione dell'analogo pirimidinico in 5-fluoro-2'-desossiuridina, che rappresenta la prima tappa della via anabolica del 5-FU (Birnie *et al.*, 1963). TP catalizza inoltre la trasformazione nella forma attiva di alcuni profarmaci del 5-FU; in particolare la

capecitabina, dopo conversione in 5'-deossi-5-fluorocitidina (5-DFCR) ad opera dell'isoenzima A della acilamidasi epatica, nel tessuto neoplastico viene convertita in doxifluridina (5-DFUR) dalla citidina deaminasi e infine attivata a 5-FU da TP.

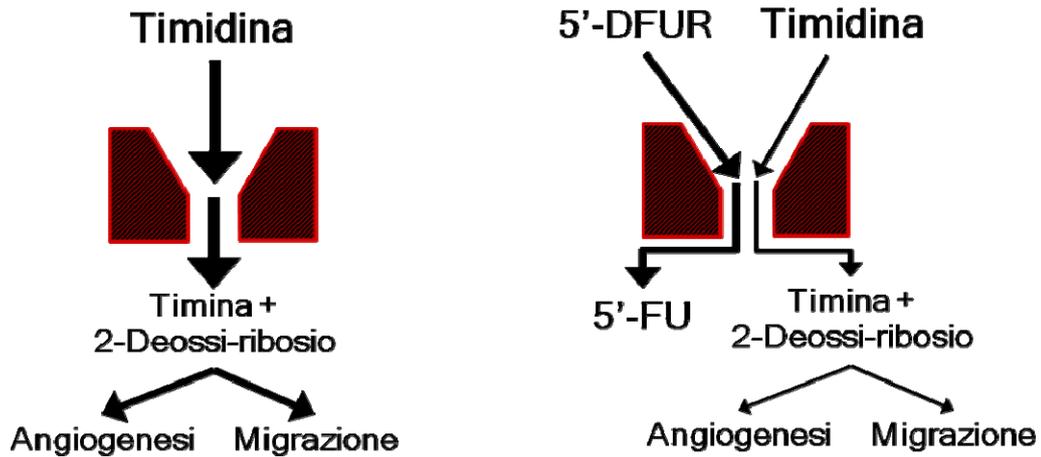


Figura 12. Effetto antiangiogenico del metabolita 5'-DFUR della capecitabina

Il livello di espressione di TP varia fino a 15 volte nei diversi tessuti umani (Zimmerman *et al.*, 1964; Yoshimura *et al.*, 1990; Luccioni *et al.*, 1994) e tra individui diversi. L'esame immunistochimico e la misurazione dell'attività enzimatica in numerosi tumori umani, inclusi il carcinoma della vescica (O'Brien *et al.* 1995), della mammella (Fox *et al.* 1996), dell'esofago (Igarashi *et al.* 1998), dello stomaco (Takebayashi *et al.*, 1996A) e del colon-retto (Takebayashi *et al.*, 1996B), hanno rivelato livelli di TP più elevati nel tessuto neoplastico rispetto all'adiacente tessuto non tumorale. In quasi tutti i campioni biotipici esaminati provenienti da carcinomi del colon, stomaco e ovaio, i livelli di TP erano superiori fino a 10 volte rispetto al tessuto non neoplastico degli stessi organi e più elevati livelli di TP sono stati misurati nel

plasma di animali portatori di tumore e di pazienti affetti da carcinoma (Peters *et al.*, 1991). Elevati livelli di TP sono correlati con la densità microvascolare nei tumori solidi inclusi il carcinoma della mammella, del rene e della regione testa-collo (Giatromanolaki *et al.*, 1998). L'attività TP varia sensibilmente nei diversi tessuti e tra i diversi individui. Questo suggerisce che in alcuni casi il livello di espressione di TP potrebbe essere un importante determinante del grado di responsività di quel particolare tumore al 5-FU. Inoltre, dal momento che nella maggior parte dei casi di carcinomi del colon-retto esaminati sono stati descritti livelli di TP più elevati nel tumore rispetto al tessuto normale, questo potrebbe essere uno dei fattori responsabili della selettività dell'azione del 5-FU nel tessuto tumorale e contribuire all'efficacia clinica delle fluoropirimidine nel trattamento del carcinoma del colon-retto. Se da un lato elevati livelli di TP si associano ad una maggiore efficacia della terapia con fluoropirimidine, dall'altro tuttavia questi predispongono anche ad una maggiore aggressività della malattia. Uno studio su 91 campioni di carcinoma colo-rettale primitivo ha descritto l'associazione fra elevata espressione di TP e profondità dell'invasione tumorale, maggiore frequenza di metastasi e minore sopravvivenza (Takebayashi *et al.*, 1995), in accordo con la funzione svolta dall'enzima come fattore angiogenico.

Lo studio di Schwartz e collaboratori (1995) ha fornito l'evidenza diretta del ruolo di TP nel determinare la sensibilità al 5-FU: in cellule transfettate con TP, infatti, l'aumento dell'attività enzimatica determinava un incremento della sensibilità al 5-FU attraverso un'aumentata formazione del metabolita attivo FdUMP. Inoltre, in accordo con quanto descritto in studi precedenti, è stato osservato che la resistenza al 5-FU può essere dovuta alla perdita di attività di TP. In una linea cellulare di

carcinoma ovarico derivata da un tumore resistente al 5-FU è stata descritta una riduzione del 70% dell'attività di TP e dei livelli di FdUMP rispetto alla linea cellulare derivata dal tumore nello stesso paziente prima dello sviluppo della resistenza al 5-FU. Il ruolo dell'enzima TP nella resistenza al 5-FU è stato confermato *in vitro* dallo studio di Mader e collaboratori (1997) su linee cellulari tumorali di colon: i cloni resistenti avevano una minore attività dell'enzima e l'inibizione di TP per mezzo di nucleotidi antisense riduceva l'effetto citotossico del 5-FU del 79%.

La produzione di TP è modulata da parte di INF- α ed altre citochine che ne determinano un'aumentata espressione (Schwartz *et al.*, 1992). Il trattamento di cellule di carcinoma del colon con INF- α determina un incremento da cinque a dieci volte dei livelli di mRNA e dell'attività enzimatica di TP ed un aumento dell'espressione è stato descritto anche in pazienti trattati con INF- α . L'induzione dell'espressione di TP da parte di INF- α era accompagnato, nelle cellule trattate con 5-FU, da un aumento dei livelli intracellulari del metabolita attivo del farmaco, FdUMP, probabilmente dovuto all'azione sequenziale di TP e dell'enzima timidina chinasi sul 5-FU (Elias e Sandoval, 1989). In studi clinici pazienti affetti da carcinoma del colon-retto metastatico trattati con 5-FU e INF- α in associazione hanno mostrato una risposta maggiore rispetto ai controlli trattati con 5-FU da solo. Studi *in vitro* hanno suggerito che l'induzione dell'espressione di TP da parte di INF- α sia il meccanismo biochimico alla base della modulazione dell'attività antitumorale del 5-FU da parte di INF- α . L'aumentata espressione di TP da parte di INF- α sembra essere dovuta sia ad un'aumentata efficienza di trascrizione del gene che ad una stabilizzazione dell'mRNA (Schwartz *et al.*, 1998).

L'incremento nell'attività di TP è stato descritto anche con altri farmaci, in particolare con ciclofosfamide e con i taxani (Endo *et al.*, 1999). Questo spiega l'effetto sinergico di questi composti in associazione non solo al 5-FU, ma anche, e soprattutto, alle fluoropirimidine come capecitabina e doxifluridina di cui TP catalizza la trasformazione nelle forme attive. Sembra tuttavia che questo effetto induttivo sia maggiore su cellule che presentano basalmente bassi livelli di TP (Fukushima *et al.*, 2002).

Il ruolo di TP nel processo di attivazione delle fluoropirimidine e nei meccanismi di resistenza alle stesse ha fatto supporre la possibilità di prevedere la risposta alla terapia con questi farmaci sulla base dei livelli di TP misurati nel tessuto tumorale. Vari studi condotti nell'uomo confermano l'associazione dei diversi livelli di espressione con l'efficacia della terapia con fluoropirimidine in vari tipi di tumore, tra cui il carcinoma del colon, dello stomaco, del rene e della mammella (Morita *et al.*, 2003; Takiguchi *et al.*, 2003; Yamaue *et al.*, 2003). La correlazione è maggiore per l'efficacia dei profarmaci del 5-FU attivati da TP come la doxifluridina (De Bruin *et al.*, 2003; Yamaue *et al.*, 2003). La valutazione di più di un enzima coinvolto nell'attivazione delle fluoropirimidine può aumentare l'efficacia predittiva dell'analisi (Salonga *et al.*, 2000; Terashima *et al.*, 2002).

4.3 Timidilato sintetasi

L'enzima timidilato sintetasi (TS) è una proteina citosolica con una struttura dimerica composta da due unità identiche di circa 38,5 KDa e costituisce il primo bersaglio delle fluoropirimidine (**Figura 13**).

TS rappresenta il principale enzima della sintesi *de novo* della 2'-deossitimidina-5'-monofosfato (dTMP), grazie alla reazione di metilazione della 2'-deossiuridina-5'-monofosfato (dUMP) a dTMP, dove i gruppi metilici sono forniti dalla molecola di 5,10-metilen-tetraidrofolato (CH₂-THF) (**Figura 5**).

Questa conversione è essenziale per la produzione di timidina, un nucleotide necessario per la sintesi e la riparazione del DNA, poiché l'altra sorgente di dTMP possibile è costituita dal recupero della timidina da dTMP, reazione catalizzata dalla timidina chinasi citosolica (TK1) o mitocondriale (TK2).

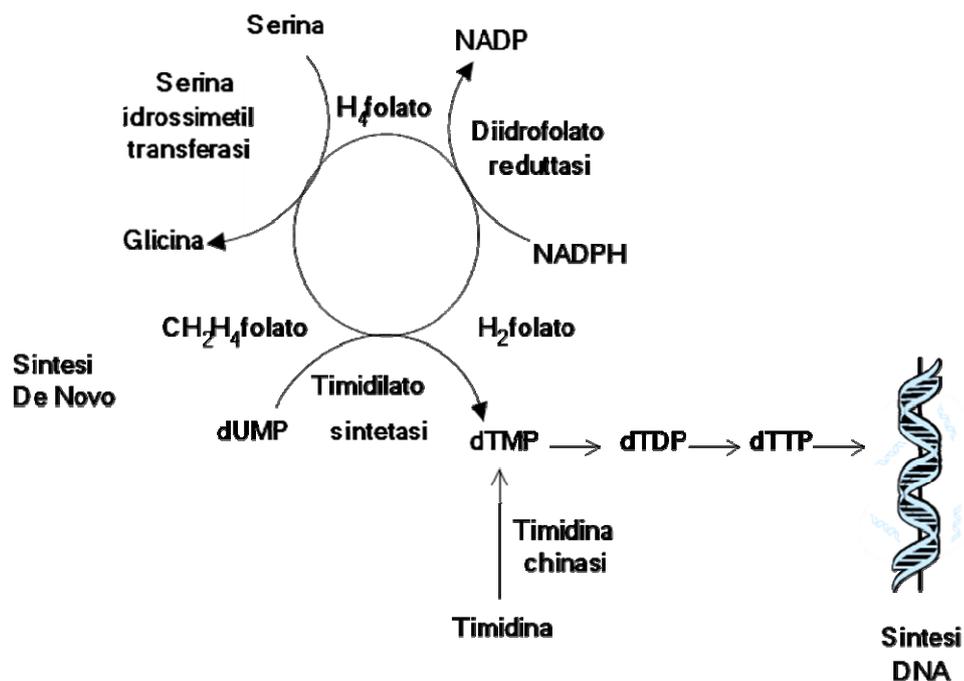


Figura 13. Reazione catalizzata dall'enzima TS

dTMP viene successivamente metabolizzato a livello intracellulare nella forma fosforilata dTTP, un precursore della biosintesi del DNA importante per la proliferazione e la crescita cellulare. Di conseguenza TS rappresenta un bersaglio per

vari farmaci antitumorali, fra cui le già citate fluoropirimidine e vari analoghi dei folati. Esistono numerose evidenze di supporto al concetto che TS sia un importante bersaglio chemioterapico (Danenberg, 1977): studi clinici *in vivo*, oltre che *in vitro*, documentano una forte correlazione dei livelli di attività e di espressione della proteina TS con la risposta alle fluoropirimidine (Johnston *et al.*, 1991). Le linee cellulari e i tumori maligni che esprimono alti livelli di TS sono relativamente più resistenti all'effetto citotossico dei farmaci antitumorali quali le fluoropirimidine e analoghi dei folati che hanno come bersaglio TS. Inoltre, esiste una significativa correlazione tra l'inibizione dei livelli di TS nei pazienti trattati con 5-FU e la risposta clinica (Swain *et al.*, 1989). L'elevata risposta osservata con la combinazione di 5-FU e leucovorin (LV), un precursore del 5,10-metilentetraidrofolato (CH₂-THF), è stata confrontata con la singola somministrazione di 5-FU, dimostrando così che l'inibizione dell'enzima TS è massima quando si verifica un incremento della concentrazione di CH₂-THF (Santi *et al.*, 1974). Infine, studi clinici con raltitrexed, un analogo folico specifico inibitore di TS, hanno rivelato sorprendentemente una buona attività in nel tumore coloretale avanzato con un tasso di risposta del 25-30% (Cunningham *et al.*, 2002).

TS ha quindi un importante ruolo nella terapia poiché è essenziale nella regolazione del *pool* dei nucleotidi per la normale replicazione del DNA e gioca un ruolo centrale nel metabolismo dei folati. L'importanza di un adeguato rifornimento di folati per la prevenzione tumorale è stata dimostrata nel corso di studi recenti, che mostrano un elevato rischio di tumori del colon, adenomi coloretali, tumori pancreatici e probabilmente anche tumori della mammella, associati con bassi livelli di folati, in modo particolare se combinati con un alto consumo di etanolo.

TS è inibita dagli analoghi dei folati come il raltitrexed e il pemetrexed e da analoghi nucleotidici come il 5-fluoro-dUMP (FdUMP), che rappresenta il metabolita attivo del 5-FU. FdUMP è un potente inibitore competitivo, essendo in grado di agire anche a concentrazioni molto basse dell'ordine di nanomoli per litro. L'inibizione di TS da parte di FdUMP è considerato il principale meccanismo d'azione del 5-FU. Tale inibizione avviene attraverso la formazione di un complesso ternario covalente tra TS, FdUMP e CH₂-THF. La durata dell'inibizione dipende da vari fattori, fra cui anche dal rapporto tra i livelli di dUMP libero e FdUMP. Una bassa sensibilità al 5-FU è stata messa in relazione alla rapida scomparsa di FdUMP, mentre una elevata concentrazione di dUMP o uno scarso legame di FdUMP a TS possono ridurre la durata dell'inibizione di TS.

La resistenza tumorale al 5-FU è in larga parte dipendente dalla insufficiente inibizione dell'enzima TS, come riportato nella **Tabella III**. La stabilità del complesso ternario è altamente dipendente dalla disponibilità di CH₂-THF o di una sua forma poligluttammata (5,10-CH₂H₄PteGlu_n) (Houghton e Houghton, 1983), sintetizzata dall'enzima folilpoligluttammato sintetasi (FPGS), e il LV può aumentare le concentrazioni tissutali di CH₂-THF. Dopo il trasferimento attraverso la membrana, mediato da un trasportatore di folati ridotti (Jansen *et al.*, 1999), LV è metabolizzato a CH₂-THF che viene poligluttammato e causa una maggiore inibizione di TS (Radparvar *et al.*, 1989). Una minore attività dell'enzima FPGS e una sua bassa espressione genica conferiscono resistenza al 5-FU (Wang *et al.*, 1993), probabilmente perché la riduzione delle concentrazioni intracellulari di 5,10-CH₂H₄PteGlu_n destabilizzano il complesso ternario inibitore TS-FdUMP-5,10-CH₂H₄PteGlu_n; per questo motivo anche un alterato legame di FdUMP a TS è associato ad una resistenza

acquisita al 5-FU (Priest *et al.*, 1980). Un *pool* di folati ridotti e un alto livello di enzima TS prima del trattamento determinano quindi resistenza intrinseca al 5-FU (Peters *et al.*, 1996), mentre l'amplificazione del gene TS o la comparsa di mutazioni portano a resistenza acquisita (Berger *et al.*, 1988).

Tabella III. Meccanismi di resistenza al 5-FU

Ridotto accumulo di metaboliti attivi	<ul style="list-style-type: none"> • Ridotta produzione • Aumentata inattivazione
Fattori legati al bersaglio	<ul style="list-style-type: none"> • Ridotto effetto sull'RNA • Ridotta inibizione di TS per: <ul style="list-style-type: none"> ✓ Aberrante cinetica enzimatica ✓ Aumentati livelli di dUMP ✓ Ridotto accumulo di FdUMP ✓ Ridotta stabilità del complesso ternario ✓ Deplezione dei folati intracellulari ✓ Ridotta poliglutamazione dei folati ✓ Amplificazione genica ✓ Induzione enzimatica
Resistenza farmacocinetica	<ul style="list-style-type: none"> • Aumentata eliminazione • Alterata distribuzione del farmaco • Scarsa distribuzione del farmaco nel tessuto tumorale

L'espressione di TS in condizioni fisiologiche è legata al ciclo cellulare e presenta un'alta attività nella fase S che si riduce quando le cellule non proliferano (Navelgund *et al.*, 1980). Diversi fattori di trascrizione e chinasi ciclo-dipendenti (CDK) controllano l'aumento dei livelli di TS nel ciclo cellulare. La progressione nel ciclo dalla fase G1 alla fase S è strettamente regolata da complessi ciclina/CDK che sono a loro volta attivati per fosforilazione. La fosforilazione di diversi complessi ciclina/CDK determina il rilascio del fattore di trascrizione E2F che può successivamente attivare la trascrizione di proteine coinvolte nella sintesi di DNA fra

cui TS. Studi su cellule in coltura hanno indicato che ad un incremento dell'espressione di E2F-1 è associato un aumento dei livelli di TS. L'espressione di TS è quindi in relazione con gli eventi cellulari, con la proliferazione e con la risposta a vari agenti citotossici (Berger *et al.*, 1985) e sembra che meccanismi molecolari di regolazione quali l'amplificazione genica e la modulazione della trascrizione, della traduzione e degli eventi post-traduzionali siano tutti coinvolti nel controllo dell'espressione. Tale controllo può richiedere l'azione di più meccanismi anche in coordinazione l'uno con l'altro.

La traduzione dell'mRNA di TS sembra essere regolata dal suo stesso prodotto terminale, la proteina TS, con un meccanismo di autoregolazione (Chu *et al.*, 1991). Questo fenomeno probabilmente contribuisce alle ampie variazioni dei livelli di TS non solo nei tessuti normali, ma anche fra i diversi tumori e all'interno dello stesso tumore. L'evidenza di una modulazione a livello traduzionale dell'espressione di TS durante il ciclo cellulare e in risposta a vari agenti citotossici ha indotto a studiare più in dettaglio la regolazione della traduzione di TS-mRNA. TS, oltre a svolgere un'essenziale attività catalitica, riveste un importante ruolo come proteina legante l'RNA. TS ha infatti la capacità di legare con un'alta affinità il proprio mRNA e regolare direttamente la propria biosintesi con un meccanismo di autoregolazione traduzionale a *feedback*. La proteina TS agisce contemporaneamente anche su altri mRNA cellulari, inclusi quelli corrispondenti al gene *p53* e al fattore di trascrizione *myc*. In ognuno di questi casi TS funziona come un repressore della traduzione degli specifici mRNA, regolando l'espressione e/o la funzione di questi importanti geni. TS ha quindi mostrato la capacità di agire come fattore regolatore del ciclo cellulare, dell'apoptosi e della chemiosensibilità.

Tra i fattori in grado di modificare l'espressione di TS è stato dimostrato che la proteina *p53* normale (wt-*p53*) può inibire l'attività del promotore di TS (Lee *et al.*, 1997) e che viceversa si ha una maggiore induzione di TS nelle cellule con *p53* mutato (mt-*p53*). Tali evidenze si sono riscontrate anche nel tumore del colon dove, in presenza di alti livelli di TS associati a mutazioni di *p53*, *p16*, *bax* e *p14^{ARF}*, peraltro frequenti in questo tipo di neoplasia, il tumore risulta essere particolarmente aggressivo (Zhang *et al.*, 2000). Molti enzimi coinvolti nella sintesi dei nucleotidi sono maggiormente espressi nei tumori rispetto ai tessuti normali corrispondenti e questo si verifica anche per TS. Tuttavia il rapporto dell'espressione di TS nei tumori del colon rispetto alla mucosa normale varia da valori poco superiori a 1 a valori anche molto più elevati (Peters *et al.*, 1991); l'espressione di TS è inoltre sempre più alta nelle metastasi rispetto ai tumori del colon primari (Banerjee *et al.*, 2000). Questo aumento è stato associato con l'aumento di *p53* e delle proteine del ciclo cellulare. Di conseguenza, nelle linee cellulari tumorali di colon e nei tumori è stata osservata una ampia variabilità dei livelli di TS (Van der Wilt *et al.*, 1999).

4.2.1 Polimorfismi del promotore del gene TS

Nella regione *enhancer* del gene TS (TSER, *thymidylate synthase enhancer region*) si trova una ripetizione di 28 paia di basi (*variable number of tandem repeats*, VNTR), (Horie *et al.*, 1995, Kaneda *et al.*, 1987). Ogni ripetizione contiene una sequenza specifica (5'-CACTTG-3') denominata *upstream stimulatory factor-1 (USF-1)* alla quale si lega il fattore che stimola la trascrizione del gene TS. La ripetizione può essere ripetuta in due o tre copie. Vengono quindi a crearsi tre principali genotipi della regione *promoter* del gene TS (*thymidylate synthase enhancer region* o TSER): un

omozigote per l'allele con tre ripetizioni (TSER*3/3), un omozigote per l'allele con due ripetizioni (TSER*2/2) ed un eterozigote, con entrambi gli alleli (TSER*2/3) (Figura 14).

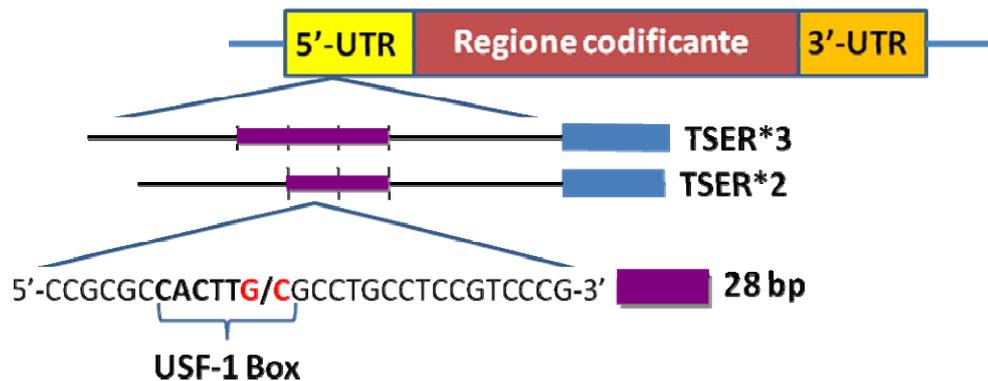


Figura 14. Rappresentazione schematica delle ripetizioni di 28 bp nella regione 5'UTR e sequenza dell'USF-1 box con indicato il polimorfismo G/C

Sono stati descritti anche alleli contenenti quattro, cinque o nove ripetizioni della sequenza, ma sono molto rari nella popolazione (Kawakami *et al.*, 1999). Studi *in vitro* hanno dimostrato che la presenza di tre copie della sequenza di 28 paia di basi (TSER*3/3) si associa a livelli di espressione più elevati (2,6 volte) rispetto a quelli che si hanno con due copie di tale sequenza (TSER*2/2) (Marsh *et al.*, 2001). Al contrario, uno studio condotto da Peters e collaboratori (1991) su un pannello di quindici linee cellulari sembra mostrare che lo stato del polimorfismo del promoter TS non influenza i livelli di TS, anche se varianti delle cellule H630 resistenti al 5-FU presentano un genotipo omozigote TSER*3/3 associato a livelli di TS molto alti.

Il polimorfismo del *promoter* TS è stato studiato anche nei pazienti. Marsh e collaboratori (2001) hanno dimostrato che il polimorfismo del *promoter* del gene TS è

in relazione con l'espressione della proteina: dei 121 pazienti affetti da carcinoma del colon-retto sottoposti allo studio, il 29% aveva il genotipo TSER*3/3, il 16% il genotipo TSER*2/2 e il 55% era eterozigote (TSER*2/3). In 45 pazienti sono stati studiati contemporaneamente il tessuto tumorale e la mucosa normale, e 44 di questi presentavano un analogo stato del promoter TS nei due campioni. I pazienti omozigoti TSER*2/2 avevano una sopravvivenza maggiore rispetto ai pazienti omozigoti TSER*3/3. Anche Villafranca e collaboratori (2001) hanno osservato che pazienti omozigoti TSER*2/2 o eterozigoti avevano una sopravvivenza maggiore dei pazienti omozigoti TSER*3/3 (81% vs 41%, $p=0,17$). Iacopetta e collaboratori (2001) hanno osservato in 221 pazienti con carcinoma del colon in stadio C di Dukes che il 26% era omozigote TSER*3/3 e non aveva alcun beneficio dal trattamento con 5-FU mentre i pazienti omozigoti TSER*2/2 o eterozigoti TSER*2/3 avevano un aumento significativo della sopravvivenza ($p=0,005$) se trattati con 5-FU. In contrasto con questi dati, Etienne e collaboratori (2002), in uno studio su pazienti affetti da carcinoma del colon in fase avanzata, hanno osservato che il polimorfismo del *promoter* TS non è in grado di predire la risposta al trattamento con 5-FU ma rappresenta comunque un fattore prognostico di sopravvivenza, probabilmente per l'associazione a una diversa aggressività della malattia. In questo stesso studio, inoltre, il genotipo eterozigote TSER*2/3 era quello che presentava la maggiore attività TS, in contrasto con quanto descritto in studi precedenti.

Come già descritto precedentemente da Marsh e collaboratori (2001), analizzando il tessuto tumorale e il corrispondente tessuto normale di pazienti affetti da carcinoma colo-rettale, Kawakami e collaboratori (2002) hanno osservato che nei pazienti con genotipo omozigote TSER*3/3 o TSER*2/2 esiste sempre corrispondenza con il

genotipo espresso dal tessuto tumorale, a indicare che il numero di ripetizioni è stabile anche attraverso il processo della cancerogenesi. Viceversa, nel tessuto tumorale di alcuni soggetti eterozigoti si trova solo l'allele con due o tre ripetizioni a causa del fenomeno della perdita di eterozigosi (*loss of heterozygosity*, LOH), frequente nel tessuto neoplastico. La perdita di un allele e quindi la presenza di un genotipo diverso nel tumore rispetto al tessuto normale si accompagna ad una diversa espressione della proteina TS. Più recentemente è stato scoperto un nuovo polimorfismo all'interno di TSER (**Figura 14**), che è stato proposto come ulteriore fattore predittivo dell'efficacia della chemioterapia con 5-FU (Kawakami e Watanabe, 2003). Si tratta di uno SNP G>C osservato a livello della **prima ripetizione** dell'allele 2R e della **prima e seconda ripetizione** dell'allele 3R (Mandola *et al.*, 2003). Tale SNP altera la capacità delle ripetizioni di funzionare come promotori della trascrizione e potrebbe essere utile a spiegare le discrepanze nel predire la risposta al trattamento con 5-FU che si hanno utilizzando il solo polimorfismo del *promoter* di TS come indicatore (Mandola *et al.*, 2003). Di conseguenza, sia lo SNP che il polimorfismo del *promoter* di TS dovrebbero essere considerati contemporaneamente per poter utilizzare il genotipo di TS per indirizzare la scelta chemioterapica (Kawakami e Watanabe, 2003). Un ulteriore polimorfismo è stato descritto nel gene che codifica l'enzima TS. Si tratta di una delezione di 6 paia di basi localizzata nella regione 3'-UTR dell'mRNA (Ulrich *et al.*, 2000); tale mutazione compare con una frequenza del 29% in un campione di popolazione di razza caucasica. Si ritiene che la regione 3'-UTR abbia un ruolo importante nel mantenimento della stabilità dell'mRNA, e quindi che la delezione descritta possa alterare la stabilità o la struttura secondaria dell'mRNA e di conseguenza i livelli e i meccanismi di regolazione dell'espressione di TS. Studi finora

effettuati, tuttavia, non hanno confermato l'esistenza di una correlazione fra la delezione e i livelli di espressione di TS (Yousef *et al.*, 2001).

Dal momento che TS è il principale bersaglio dell'azione del 5-FU, è stato da tempo ipotizzato che le ampie variazioni nei livelli di TS si associno a una diversa sensibilità al farmaco. Questa ipotesi è stata dapprima valutata *in vitro*: in uno studio su linee cellulari, di cui alcune resistenti al 5-FU, Johnston e collaboratori (1991) hanno dimostrato una relazione fra i livelli di TS e la sensibilità al farmaco, anche se l'esclusione delle linee resistenti rende tale relazione molto più debole. Peters e collaboratori (1999) hanno misurato i livelli di TS in un gruppo di 13 linee cellulari tumorali di colon, includendo anche cellule con resistenza acquisita al 5-FU. L'attività catalitica di TS è correlata in maniera significativa sia al numero di siti di legame per FdUMP che alla quantità di proteina TS che può essere determinata con la tecnica del *Western blot* (Van Triest *et al.*, 1999), e risulta associata alla sensibilità al 5-FU, soprattutto nelle linee cellulari resistenti. In questo studio i livelli di TS risultano anche correlati all'espressione dell'mRNA di TS. In contrasto con questi risultati, Grem e collaboratori (2001) hanno osservato in un insieme di 60 linee cellulari che i livelli di TS valutati sia come quantità di proteina che come espressione di mRNA non erano correlati alla sensibilità al 5-FU. Questa mancanza di correlazione può avere varie spiegazioni, per esempio le condizioni di esposizione continua delle cellule in coltura che non sono probabilmente rappresentative di quanto avviene nell'uomo per una valutazione della relazione fra livelli di TS e sensibilità al 5-FU (Scherf *et al.*, 2000). Inoltre la sensibilità al 5-FU può dipendere da meccanismi diversi e indipendenti dai livelli di TS, come per esempio l'entità del danno al DNA (Van Triest *et al.*, 2000) o la tossicità mediata dall'incorporazione del 5-FU nell'RNA. Sembra comunque che solo

livelli di TS molto elevati siano correlati con la resistenza al 5-FU, mentre in altre cellule TS può avere un ruolo minore.

L'attenzione è stata indirizzata all'analisi della relazione fra livelli di TS e sensibilità al 5-FU nei tessuti, con la prospettiva di individuare possibili indicatori di risposta al trattamento con questo farmaco. Uno dei problemi principali nello studio di fattori tumorali da utilizzare come predittori di risposta alla terapia con fluoropirimidine è rappresentato dalla scelta della metodica d'analisi. I limiti possono essere di ordine tecnico, per esempio la necessità di disporre di grosse quantità di tessuto, ma la questione principale è soprattutto la significatività dell'indagine. Vari studi hanno dimostrato una correlazione fra la risposta alla terapia con 5-FU e i livelli intrinseci di TS valutati attraverso la determinazione dell'attività catalitica dell'enzima (Peters *et al.*, 1994). L'espressione della proteina TS, valutata con immunistochimica o *Western blot*, può riflettere l'attività catalitica di TS nei tessuti e rappresenta un buon indice di sensibilità al 5-FU (Backus *et al.*, 2001). Più controverso è il valore predittivo della determinazione dei livelli di mRNA di TS nei tessuti. Se infatti in alcuni studi si dimostra l'esistenza di una correlazione tra i livelli di mRNA con l'attività catalitica di TS (Metzger *et al.*, 1998), e quindi con la sensibilità al 5-FU, altri autori escludono tale correlazione (Ishida *et al.*, 2002) anche alla luce dei fenomeni di regolazione post-trascrizionale che intervengono nella modulazione dell'espressione della proteina TS. Se la risposta alla terapia adiuvante con 5-FU di tumori primitivi del colon è valutata in termini di sopravvivenza o intervallo libero da malattia, la correlazione con i livelli di TS nel tumore è talvolta meno chiara. Elder e collaboratori (2002) hanno infatti osservato una sopravvivenza maggiore e un maggior beneficio dal trattamento con 5-FU nei pazienti che avevano una elevata espressione di

TS. È possibile che nella malattia primitiva altri fattori come i *markers* di proliferazione o gli enzimi di riparazione giochino un ruolo importante (Watanabe *et al.*, 2001) e che i livelli di TS nel tumore abbiano un valore prognostico in sé. La correlazione tra livelli di TS e risposta al 5-FU nella malattia avanzata è invece sicuramente provata da vari studi (Aschele *et al.*, 2000). Tutti concordano tuttavia nel dimostrare che tale correlazione esiste solo per i livelli di TS misurati nella metastasi (Johnston *et al.*, 2003), e quindi che lo studio del tumore primitivo non può servire per predire la risposta al trattamento nella malattia metastatica. Il valore predittivo della valutazione dei livelli di TS nel tumore, infine, aumenta se ad esso si associa lo studio dell'espressione dell'enzima DPD (Salonga *et al.*, 2000): pazienti con elevata espressione sia di TS che di DPD risponderanno poco al 5-FU e per essi potrebbe essere più indicata una terapia con farmaci alternativi come ad esempio l'irinotecano o l'oxaliplatino.

Un rapido incremento nell'attività dell'enzima TS è stato descritto in vari studi *in vitro*, *in vivo* e in modelli clinici in seguito ad un breve periodo di esposizione alle fluoropirimidine (Van der Wilt *et al.*, 1994). Sebbene il preciso meccanismo con il quale il 5-FU induca l'espressione di TS non sia stato ancora ben caratterizzato in questi studi iniziali, l'incremento della trascrizione, l'aumento della stabilità dell'mRNA di TS, l'incremento dell'efficienza della trascrizione di TS-mRNA e l'aumento di stabilità della proteina TS sono stati tutti proposti come potenziali meccanismi.

L'aumento di TS nelle cellule dopo esposizione al 5-FU o agli analoghi folici inibitori di TS è un dato accertato, ma i risultati degli studi *in vitro* non definiscono se questo incremento si accompagni allo sviluppo di resistenza al 5-FU o agli inibitori di TS.

Probabilmente la continua presenza dell'inibitore determina l'induzione di TS, ma è anche sufficiente ad inibire completamente l'attività catalitica dell'enzima e questo potrebbe spiegare la mancanza di correlazione tra livelli di proteina TS e sensibilità al 5-FU e agli analoghi folici. La mancata correlazione tra livelli di proteina TS e sensibilità al 5-FU e agli analoghi dei folati che è stata osservata *in vitro* potrebbe non verificarsi *in vivo*. Spears e collaboratori (1982) hanno osservato una minore sensibilità al 5-FU in tumori sperimentali del colon con un'alta attività TS. Altri studi confermano questo dato mostrando che tumori sperimentali sensibili al 5-FU hanno una minore attività TS rispetto a tumori resistenti: questi, oltre ad avere livelli iniziali di TS più elevati, mostrano un'induzione di due o tre volte in seguito al trattamento con 5-FU. Tale fenomeno d'induzione non si osserva nei tumori sensibili al 5-FU nei quali si aveva invece una ulteriore riduzione dopo la seconda e terza somministrazione del farmaco.

L'induzione di TS è stata osservata non solo nei tumori, ma anche nei tessuti normali: la somministrazione di 5-FU per infusione in arteria epatica determina un' elevata inibizione di TS nelle metastasi epatiche (>70%), mentre nel tessuto epatico non tumorale si ha un aumento di sei o sette volte dei livelli di TS (Van der Wilt *et al.*, 1995). Questo può spiegare l'assenza di tossicità epatica nonostante il fatto che con questo tipo di somministrazione anche il tessuto sano sia esposto ad elevate concentrazioni di farmaco. È inoltre interessante osservare che tale induzione di TS si osserva anche nella mucosa gastrointestinale. Risultati analoghi sono stati ottenuti da Welsh (2000) con la somministrazione di analoghi dei folati inibitori di TS, i quali causano una induzione dei livelli di TS maggiore nel tessuto normale rispetto al

tessuto tumorale. La somministrazione di LV, inoltre, non solo aumenta l'inibizione di TS da parte di 5-FU, ma ne previene anche l'effetto di induzione (Peters *et al.*, 2002). L'espressione di TS, valutata come quantità dello specifico mRNA con la tecnica della *RT-PCR*, aumenta progressivamente nelle 45 ore successive alla somministrazione di 5-FU; l'aumento è ancora maggiore se viene presa in considerazione l'attività catalitica di TS (aumento del rapporto attività catalitica TS/TS-mRNA), mentre l'aumento si stabilizza dopo 23 ore se sono esaminati i livelli di proteina TS (rapporto proteina TS/TS-mRNA). È probabile che inizialmente il legame di FdUMP a TS inibisca l'autoregolazione della traduzione del TS-mRNA da parte di TS con conseguente aumento della sintesi dell'enzima. La quantità di proteina TS aumenta, stabilizzata anche dalla formazione del complesso ternario, raggiungendo un *plateau* dopo 23 ore. L'ulteriore aumento dell'attività catalitica, che si ha fino alle 45 ore successive alla somministrazione di 5-FU, indica che aumenta la quota di proteina funzionalmente attiva (Peters *et al.*, 2002).

4.2.2 Correlazione tra genotipo e tollerabilità della capecitabina

L'impiego clinico del 5-FU si è sostanzialmente ridotto dopo l'introduzione della capecitabina. Soltanto uno studio clinico ha esaminato la predittività del genotipo TSER e la tollerabilità del trattamento in pazienti con tumore della mammella (Sharma *et al.*, 2008). Gli Autori hanno esaminato 54 pazienti con diagnosi di tumore coloretale metastatico trattati con dose fissa di capecitabina. Il DNA è stato estratto da sangue ed è stato genotipizzato per 5'-UTR TSER, inserzioni e delezioni di 6pb nella regione 3'-UTR e polimorfismi 677C>T e 1298A>C dell'enzima metilene-tetraidrofolato reduttasi per mezzo di PCR ed RFLP. I genotipi della MTHFR 677C>T

e 1298A>C sono fattori predittivi per una tossicità di grado 2/3, mentre il genotipo TSER risulta non influente. Pertanto questo studio suggerisce che le varianti comuni di MTHFR, ma non TS, possono essere utilizzate per predire la tossicità della capecitabina in pazienti con tumore coloretale in stadio avanzato.

Scopo della tesi

Dal momento che la capacità del farmaco di inibire la funzione del bersaglio ad un livello incompatibile con la sopravvivenza cellulare rappresenta l'elemento critico per la risposta terapeutica, sono stati sviluppati metodi cellulari e molecolari per lo studio della timidilato sintetasi nelle cellule tumorali e nei tessuti sani al fine di predire l'efficacia della terapia e l'incidenza delle reazioni avverse nella popolazione di pazienti. La timidilato sintetasi è stata studiata con tecniche di immunoistochimica, espressione genica e attività enzimatica con contraddittori risultati di correlazione con l'*outcome* clinico del trattamento. La revisione della letteratura suggerisce tuttavia che l'analisi del DNA possa rappresentare il metodo più affidabile per accertare il valore prognostico della timidilato sintetasi nei pazienti con neoplasia. A questo scopo il metodo più frequentemente utilizzato è la RFLP (restriction fragment length polymorphism) che, da un punto di vista analitico, consiste nell'amplificazione PCR e successiva digestione del DNA prodotto dalla reazione PCR con un enzima di restrizione per generare frammenti la cui lunghezza dipende dalla presenza o meno del polimorfismo nel sito di restrizione. Questa tecnica ha il vantaggio della rapidità ma lo svantaggio della lettura del risultato che può essere incerta a causa della produzione di frammenti multipli che possono generare sovrapposizioni ed errori di interpretazione. Per tale motivi in questa tesi è stato sviluppato un metodo affidabile di genotipizzazione di TSER da applicare in clinica per la caratterizzazione molecolare dei pazienti affetti da carcinoma del colon-retto che è stato applicato in via preliminare alla correlazione con la tossicità del trattamento.

Pazienti e Metodi

1. Pazienti

Il reclutamento dei pazienti affetti da carcinoma del colon-retto è stato effettuato presso l'U.O. di Oncologia Medica dell'Azienda U.S.L. 6 di Livorno diretta dal Prof. Alfredo Falcone. I pazienti sono stati invitati a dare la loro adesione volontaria allo studio GENETINE, approvato dal Comitato Etico della stessa Azienda U.S.L. 6, ed hanno firmato un consenso informato. La partecipazione allo studio consisteva esclusivamente nella donazione di 3 ml di sangue. In totale sono stati arruolati 70 pazienti di cui è stato esaminato il DNA proveniente dai campioni di sangue. Tra questi pazienti è stata valutabile la tossicità in 50 che erano trattati come segue: capecitabina (dose iniziale 2500 mg/die p.o.; 21 pazienti), 5-FU, levofolinato e oxaliplatino (dose iniziale 5-FU 400 mg/m² in bolo i.v. seguiti da 600 mg/m² in i.c. con levofolinato 100 mg/m² per 2 giorni e oxaliplatino 85 mg/m²; 13 pazienti), capecitabina e oxaliplatino (capecitabina 2000 mg/die p.o. e oxaliplatino 130 mg/m² i.v.; 10 pazienti), capecitabina, oxaliplatino e irinotecano (capecitabina 2000 mg/die p.o., oxaliplatino 85 mg/m² i.v. e irinotecano 165 mg/m² i.v.; 2 pazienti), 5-FU infusione (400 mg/m² in bolo i.v. seguiti da 600 mg/m² in i.c. con levofolinato 100 mg/m² per 2 giorni; 1 paziente), irinotecano e oxaliplatino (oxaliplatino 85 mg/m² i.v. e irinotecano 165 mg/m² i.v.; 1 paziente) e combinazioni di capecitabina, oxaliplatino e radioterapia (2). È stata inoltre valutata la possibile associazione tra genotipo e tossicità del trattamento.

2. Analisi dei polimorfismi della regione 5'UTR del gene TS

Lo sviluppo del metodo PCR e di sequenziamento è stato svolto presso l'U.O. di Citogenetica e Genetica Molecolare dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana diretta dal Dott. Paolo Simi.

2.1 Estrazione del DNA genomico

L'estrazione di DNA da 200 µl di sangue, fresco o scongelato, è stata effettuata con kit QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN). Il campione è stato trasferito in una provetta da 1,5 ml contenente 20 µl di Proteasi Qiagen e lisato con 200 µl di buffer di lisi. I campioni sono stati agitati su vortex per 15 secondi, quindi incubati per almeno 10 min a 56°C. Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 200 µl di etanolo assoluto, i campioni sono stati agitati di nuovo su vortex per 15 secondi e il lisato è stato trasferito nella provetta contenente la colonna Qiamp. Dopo aver centrifugato per 1 min a 8 000 rpm (6 000 g), è stato eliminato il filtrato e sono stati aggiunti 500 µl del primo buffer di lavaggio e i campioni sono stati centrifugati nuovamente per 1 min a 8 000 rpm. Senza eliminare il filtrato, sono stati aggiunti 500 µl del secondo buffer di lavaggio e le colonne sono state centrifugate per 3 min a 14 000 rpm. Successivamente le colonne, trasferite su provette da 2 ml, sono state centrifugate nuovamente a 14 000 rpm (20 000 g) per 1 min. Infine il campione è stato trasferito in provette da 1,5 ml e vi sono stati aggiunti 200 µl di buffer di eluizione; dopo un'eluizione di 1 min a temperatura ambiente, le colonne sono state centrifugate per 1 min a 8 000 rpm. Il DNA eluito è stato quindi trasferito in una provetta sterile da 1.5 ml e quantificato allo spettrofotometro.

La concentrazione del DNA nella soluzione ottenuta è stata determinata attraverso la misurazione della densità ottica per mezzo di uno spettrofotometro Uvikon (Kontron Instruments) alla lunghezza d'onda di 260 nm, dopo diluizione 1:500 (volume/volume) della stessa soluzione in acqua distillata sterile. La concentrazione di DNA, espressa in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, è stata calcolata per mezzo della seguente formula:

$$\text{concentrazione} = (A_{260\text{nm}} \times 50 \times 500) / 1000$$

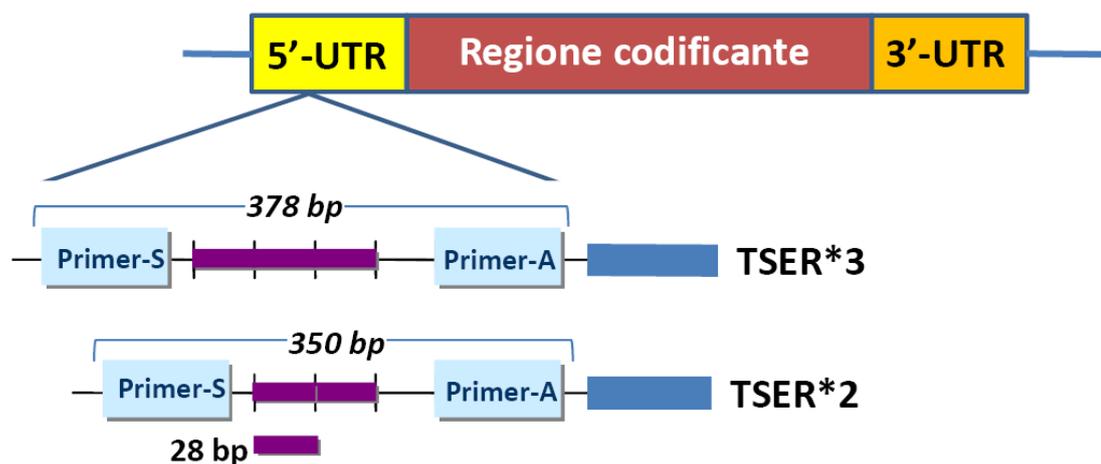
dove $A_{260\text{nm}}$ rappresenta il valore dell'assorbanza misurata alla lunghezza d'onda di 260 nm, 50 il coefficiente di assorbimento del DNA a doppio filamento a 260 nm e 500 il fattore di diluizione della soluzione di DNA.

È stata inoltre effettuata una stima della purezza del DNA estratto, sulla base del rapporto tra l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm e quella alla lunghezza d'onda di 280 nm, che sono rispettivamente le lunghezze d'onda di assorbimento degli acidi nucleici e delle proteine. Il DNA è considerato puro quando tale rapporto è compreso fra 1,6 e 2,0. Infine, l'integrità del DNA genomico è verificata tramite elettroforesi su gel di agarosio al 2%. Il DNA è stato utilizzato per l'analisi dei polimorfismi del gene codificante per la per la timidilato sintetasi.

2.2 Amplificazione PCR del DNA genomico

L'analisi del polimorfismo della 5'-*untranslated region* (UTR, **Figura 15**) del gene che codifica per l'enzima timidilato sintetasi (TS) è stata effettuata sul DNA genomico proveniente dai campioni ematici con la tecnica della *polymerase chain reaction* (PCR). La PCR permette l'amplificazione esponenziale in vitro di una sequenza di acido nucleico. Lo stesso metodo può essere usato per modificare la sequenza amplificata (mutagenesi). È necessario che le estremità della sequenza da amplificare

siano conosciute con precisione per poter sintetizzare oligonucleotidi che saranno ibridizzati ad esse, e che una piccola quantità della sequenza da amplificare sia disponibile per dare inizio alla reazione. Non è necessario che la sequenza da sintetizzare enzimaticamente sia inizialmente presente in forma pura; essa può anche essere una frazione minoritaria di una miscela complessa, come un segmento di un gene a singola copia nel DNA totale. Il prodotto della reazione sarà una molecola di dsDNA con estremità corrispondenti a quelle 5' degli oligomeri utilizzati.



TCCGTTCTGTGCCACACCCGTGGCTCCTGCGTTTTCCCCCTGGCGCACGCTCTCTAGAGCGGGG
 GCCGCCGCGACCCCGCGGAGCAGGAAGAGGCGGAGCGCGGGACGGCCGCGGGAAAAGGCGCGC
 GGAAGGGGTCCTGCCA**CCGCGCCACTTGGCCTGCCTCCGTCCCG****CCGCGCCACTTGGCCTGCC**
TCCGTCCCGCCGCGCCACTTCGCCTGCCTCCGTCCCCCGCCCGCGCCATGCCTGTGGCCG
 GCTCGGAGCTGCCGCGCCGGCCCTTGCCCCCGCCGCACAGGAGCGGGACGCCGAGCCGCGTC
 CGCCGCACGGGGAGCT**GCAGTACCTGGGGCAGATC**

Figura 15. Polimorfismo della regione 5'-UTR di TS e sequenza del frammento amplificato con PCR. I primers sono indicati in grassetto/sottolineato all'inizio e alla fine della sequenza, mentre le due ripetizioni sono indicate con il colore

I *primers* per la reazione di PCR sono stati scelti nella regione TSER, in modo da includere nell'amplificato la sequenza di 28 paia di basi che può essere presente in

numero di due o tre ripetizioni. Le sequenze dei *primers* utilizzati sono state le seguenti:

Primer senso: TCCGTTCTGTGCCACACC

Primer antisenso: GCAGTACCTGGGGCAGATC

La lunghezza del frammento amplificato è stato di 350 bp in presenza di due ripetizioni di 28 bp (genotipo TSER*2/2) e di 378 bp in presenza di tre ripetizioni (genotipo TSER*3/3), mentre in condizioni di eterozigosi si produrranno entrambi i frammenti (genotipo TSER*2/3).

La reazione di PCR è stata eseguita in un volume totale di 50 µl comprendenti:

- | | |
|---|----------|
| • DNA genomico (0,2 µg) | 5 µl |
| • Acqua DNAsi/RNAsi <i>free</i> | 24,75 µl |
| • tampone per Taq DNA polimerasi (10 X) | 5 µl |
| • DMSO 10% | 5 µl |
| • MgCl ₂ (2 mM) | 4 µl |
| • Deossinucleotidi trifosfati (dNTPs 10 mM) | 4 µl |
| • <i>primer</i> senso (20 pmol/µl) | 1 µl |
| • <i>primer</i> antisenso (20 pmol/µl) | 1 µl |
| • AmpliTaq pol Gold | 0,25 µl |

L'amplificazione è stata eseguita nelle seguenti condizioni: denaturazione iniziale a 95 °C per 12 minuti, seguita da 30 cicli di denaturazione a 94 °C per 60 secondi, annealing a 60 °C per 60 secondi, sintesi a 72 °C per 60 secondi (**Figura 16**), con un tempo di estensione finale a 72 °C di 7 minuti.

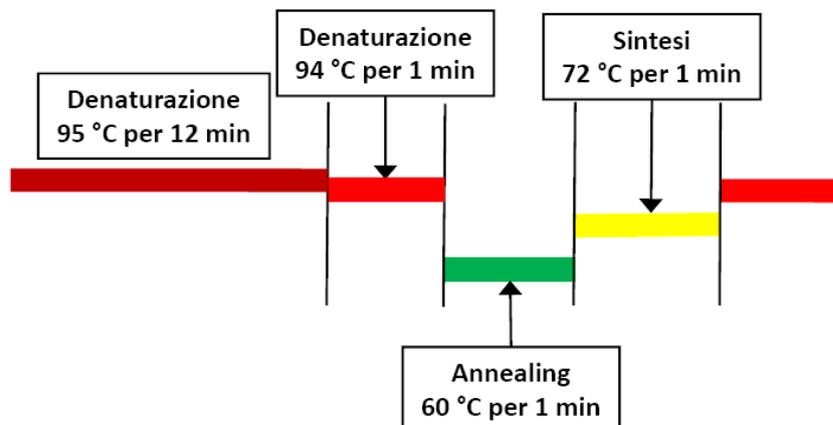


Figura 16. Schema del ciclo termico per amplificazione di TS

Per la reazione è stato utilizzato un termociclatore GENE AMP PCR SYSTEM 9700 (Applied Biosystems).

2.3 Analisi della ripetizione nella regione 5'-UTR

La separazione dei segmenti di DNA amplificati mediante PCR è stata ottenuta con elettroforesi su gel di agarosio al 3% in presenza di tampone TBE (tris base acido borico 0,04 M, EDTA 0,001 M) a pH 8 contenente etidio bromuro. La visualizzazione del DNA è stata ottenuta per mezzo di un transilluminatore a raggi ultravioletti. La migrazione dei frammenti di DNA nel gel di agarosio permette di valutare la loro lunghezza e pertanto identificare il numero di ripetizioni presenti: l'allele 2R corrisponde ad un frammento amplificato di 363 bp, mentre l'allele 3R corrisponde ad un frammento di 391 bp.

2.4 Analisi con RFLP del polimorfismo G>C nelle ripetizioni TSER*2 e *3

L'analisi dello SNP G>C è stata effettuata con la tecnica *RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*); 15 µl del prodotto amplificato sono stati sottoposti a reazione

di digestione in presenza di 2 unità dell'enzima *HaeIII* (New England BioLabs) e del tampone specifico dell'enzima, in un volume totale di 25 μ l. La miscela ottenuta è stata incubata a 37 °C per 1 ora e il prodotto è stato infine sottoposto ad elettroforesi su gel di agarosio al 3% in presenza di tampone TBE (tris-base acido borico 0,04 M, EDTA 0,001 M) a pH 8 contenente etidio bromuro. La visualizzazione del DNA è stata ottenuta per mezzo di un transilluminatore a raggi ultravioletti. L'enzima *HaeIII* riconosce il sito GGCC e digerisce il frammento amplificato (GG/CC) con produzione di diversi frammenti più piccoli a seconda del genotipo specifico.

2.5 Analisi di VNTR e del polimorfismo G>C con sequenziamento automatico

Il principio sul quale si basa il sequenziamento automatico è il metodo enzimatico di Sanger. Per far avvenire la reazione si usa un'enzima, la DNAPol del fago T7 caratterizzato da elevata processività, attività esonucleasica 3' \rightarrow 5' e 5' \rightarrow 3' praticamente nulla e bassa discriminazione tra ddNTPs e dNTPs.

Il materiale di partenza è un frammento di DNA amplificato tramite PCR: si utilizza un oligomero che viene usato come *primer*, per permettere l'inizio della reazione di polimerizzazione della DNAPol. Dal momento che la DNAPol sintetizza nella direzione 5' \rightarrow 3', il primer dovrà avere un'estremità 3'-OH libera da cui inizierà la polimerizzazione. Nella miscela di reazione vengono aggiunti i quattro dNTPs naturali che consentono di sintetizzare il nuovo filamento di DNA. Nel corso della polimerizzazione i nucleotidi vengono aggiunti all'estremità 3'-OH del nucleotide precedentemente inserito. Insieme ai dNTPs naturali verranno aggiunti nella miscela di reazione anche i dideossinTPs (ddNTPs) ovvero i *terminatori di catena*. Questi, non presentando il gruppo OH sul C3' del ribosio; una volta inseriti nel filamento

nascente di DNA bloccano la DNAPol e la reazione si arresterà in corrispondenza del ddNTP inserito. La concentrazione dei ddNTPs sarà inferiore ai dNTPs naturali in quanto la reazione deve essere parziale per permettere comunque un'elongazione del DNA sintetizzato. Il risultato sarà quello di avere una miscela di nucleotidi che terminano la sintesi del DNA in tutte le posizioni in cui sul *template* era presente una T, A, G o C.

I ddNTPs vengono marcati con 4 diversi fluorocromi che assorbono tutti alla stessa lunghezza d'onda (λ_1) in modo da permettere l'uso di 1 solo laser per l'eccitazione. I fluorocromi riemettono la radiazione fluorescente a λ_2 distinguibili tra di loro con spettri di emissione non sovrapposti; questo permette di eseguire la marcatura di un singolo campione di DNA con le quattro basi contenute nella stessa miscela di reazione e distinguere i nucleotidi in base alle diverse emissioni.

I frammenti di DNA risultanti vengono separati con elettroforesi capillare e le emissioni fluorescenti, risultanti dall'eccitazione dei fluorocromi legati ai ddNTPs, vengono trasformate in segnali leggibili per mezzo di algoritmi di rilevazione. Il tracciato elettroforetico risultante sarà costituito da una serie di picchi di fluorescenza parzialmente sovrapposti l'uno all'altro corrispondenti ciascuno ad un segnale che viene emesso da un singolo frammento di DNA. L'algoritmo di *base-coding* (rivelazione) è un algoritmo di analisi del segnale che consente di identificare con precisione i picchi, separarli e attribuire loro direttamente le basi.

Il DNA risultante dalla reazione di PCR deve essere purificato per rimuovere elementi contaminanti come dNTPs liberi, primers, enzima Taq pol e sali delle soluzioni tampone prima della reazione di Cycle sequencing. Senza purificazione il sequenziamento viene compromesso da rumore di fondo, da picchi sovrapposti e da

segnale generalmente debole e non leggibile. Per la purificazione del prodotto di PCR vengono usate colonne Centricon-100 alle quali vengono aggiunti 2 ml di acqua deionizzata e l'intero campione di PCR. Le colonne vengono centrifugate su una centrifuga ad angolo fisso a $3000 \times g$ per 10 minuti. Il filtrato raccolto nella provetta inferiore viene eliminato e viene inserita la provetta di raccolta del DNA.

La colonna viene invertita e centrifugata a $270 \times g$ per 2 minuti per raccogliere il campione di DNA (generalmente 40–60 μ l). Viene aggiunta acqua deionizzata per riportare il campione di PCR al volume originale.

Il template di DNA purificato viene successivamente sottoposto alla reazione di *Cycle sequencing* per amplificare il prodotto di PCR con inserimento dei ddNTPs marcati ed assicurare un segnale sufficientemente intenso nella fase di elettroforesi e rivelazione.

Come reagenti per la marcatura e amplificazione (*Cycle Sequencing*) è stato utilizzato il BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v. 3.1 di Applied Biosystems. I primers utilizzati per il sequenziamento sono gli stessi utilizzati per l'amplificazione con PCR e descritti nel precedente paragrafo. La reazione di sintesi e marcatura è stata eseguita in un volume di 12,4 μ l utilizzando lo stesso primer senso (o antisenso) della PCR:

- *Template* di DNA da PCR (3–10 ng) 2,4 μ l
- H₂O DNAsi/RNAsi *free* 3 μ l
- Tampone BigDye Sequencing 3 μ l
- Ready Reaction Premix 2 μ l
- *Primer* (5 pmol/ μ l) 1 μ l

Le provette contenenti i campioni di DNA e le miscele di reazione sono state sottoposte al seguente ciclo termico (**Figura 17**) in un termociclatore GENE AMP PCR SYSTEM 9700 (Applied Biosystems):

- denaturazione iniziale a 96 °C per 1 minuto
- seguita da 25 cicli di denaturazione a 96 °C per 10 secondi
- annealing a 50 °C per 6 secondi
- sintesi a 60 °C per 2 minuti

I campioni sono stati raffreddati a temperatura ambiente e il loro volume portato a 20 μ l per aggiunta di acqua.

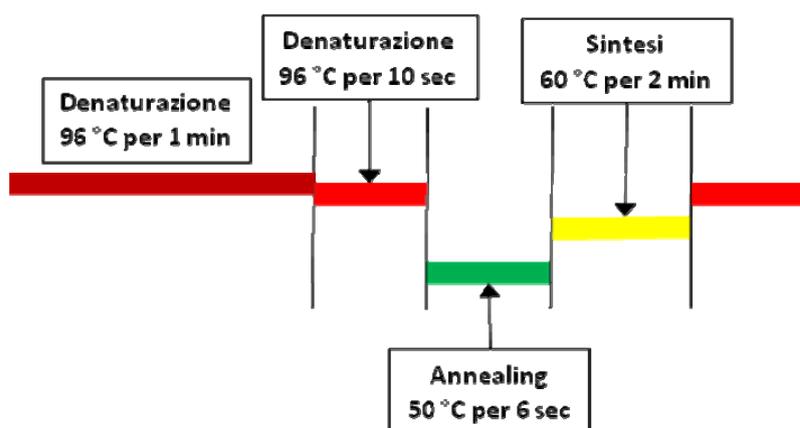


Figura 17. Schema del ciclo termico per amplificazione di TS

I campioni sono stati successivamente trattati con SDS come segue:

- sono stati aggiunti 2 μ l di una soluzione 2,2% di SDS per raggiungere una concentrazione finale di 0,2% di SDS.
- Le provette sono state agitate e riscaldate per 5 minuti a 98 °C nel termociclatore.
- Le provette sono state raffreddate a temperatura ambiente e purificate mediante colonne.

La purificazione su colonna contenente gel si rende necessaria per eliminare sostanze contaminanti che possono interferire con la lettura in fluorescenza. Le colonne vengono preparate con aggiunta di 0,8 ml di acqua deionizzata e successivamente agitate su vortex per permettere l'idratazione del gel per 2 ore. Deve essere posta

particolare attenzione all'eliminazione completa di bolle d'aria nel gel che deve essere poi lasciato depositare sul fondo della provetta.

L'acqua aggiunta alle provette per l'idratazione del gel deve essere completamente rimossa e successivamente la colonna deve essere inserita nella provetta di lavaggio per essere centrifugata in microcentrifuga a $730\times g$ per 2 minuti per eliminare il liquido residuo. La colonna viene infine rimossa dalla provetta di lavaggio e inserita in una nuova provetta da 1,5 ml per la raccolta del campione.

Il campione diluito in SDS viene adesso trasferito nella colonna di purificazione che viene centrifugata a $730\times g$ per 2 minuti. La colonna viene eliminata e il campione risultante viene disidratato per 10-15 minuti in una centrifuga a vuoto.

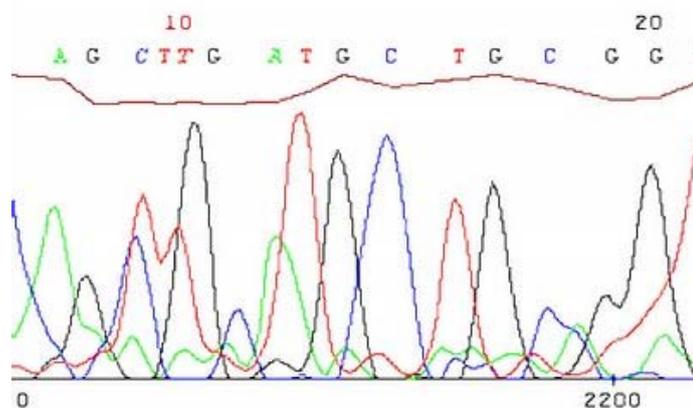


Figura 18. Tracciato grafico di sequenziamento automatico (elettroferogramma)

Il campione viene di nuovo idratato con acqua e esaminato con ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer il cui output grafico (elettroferogramma) è rappresentato in **Figura 18.**

Risultati

Il risultato dell'amplificazione PCR del DNA ha mostrato che le condizioni prescelte garantivano una buona resa in assenza di amplificazioni aspecifiche e che il frammento di DNA prodotto era delle dimensioni attese (**Figura 19**). In particolare, gli accorgimenti tecnici che hanno permesso il raggiungimento di questo risultato sono stati l'impiego di 1) DMSO e 2) concentrazioni elevate di Mg^{++} nella miscela di reazione, nonché 3) temperatura iniziale di denaturazione elevata e per un tempo prolungato. In assenza di queste modifiche, la reazione PCR non produceva i frammenti della dimensione attesa ed erano presenti molti ampliconi aspecifici.

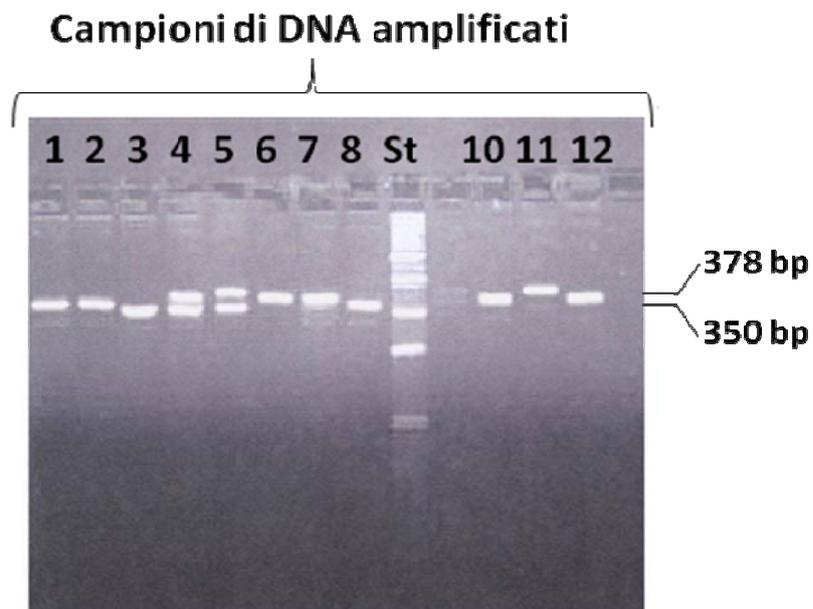


Figura 19. Separazione di prodotti di PCR su gel di agarosio. I campioni 1, 2, 6, 7, e 11 sono omozigoti 3R/3R, i campioni 3, 8, 10 e 12 sono omozigoti 2R/2R e i campioni 4 e 5 sono eterozigoti 2R/3R.

L'ottimizzazione delle condizioni di amplificazione PCR permette di distinguere con facilità le ripetizioni della regione TSER sulla base della diversa migrazione dei prodotti di amplificazione nel gel di agarosio. La fase successiva consisteva nel riconoscimento dei polimorfismi presenti all'interno delle sequenze USF-1.

Tabella IV. Prodotti di restrizione dopo digestione con enzima *HaeIII* dei diversi alleli (<http://www.restrictionmapper.org/>)

Allele	Sequenza	Posizione del sito di restrizione (▼)
2RGC	TCCGTTCTGTGCCACACCCGTGGCTCCTGCGTTTCCCCCTGGCGCA CGCTCTCTAGAGCGGGG▼CCGCCGCGACCCCGCCGAGCAGGAAGA GGCGGAGCGCGGGACGG▼CCGCGGGAAAAGGCGCGCGGAAGGGGTC CTGCCA CCGCGCCACTTGG▼CCTGCCTCCGTCCCGCCGCGCCACTT CGCTGCCTCCGTCCCG CCGCGCCACTTTCGCTGCCTCCGTCCCC GCCCCGCGGCCATGCCTGTGG▼CCGGCTCGGAGCTGCCGCGCCGG▼ CCCTTGCCCCCGCCGCACAGGAGCGGGACGCCGAGCCGCGTCCGC CGCACGGGGAGCTGCAGTACCTGGGGCAGATC	64, 108, 155, 249, 272
2RCC	TCCGTTCTGTGCCACACCCGTGGCTCCTGCGTTTCCCCCTGGCGCA CGCTCTCTAGAGCGGGG▼CCGCCGCGACCCCGCCGAGCAGGAAGA GGCGGAGCGCGGGACGG▼CCGCGGGAAAAGGCGCGCGGAAGGGGTC CTGCCA CCGCGCCACTTGCCTGCCTCCGTCCCGCCGCGCCACTTC GCCTGCCTCCGTCCCG CCGCGCCACTTTCGCTGCCTCCGTCCCCG CCCCGCGCGCCATGCCTGTGG▼CCGGCTCGGAGCTGCCGCGCCGG▼C CCTTGCCCCCGCCGCACAGGAGCGGGACGCCGAGCCGCGTCCGCC GCACGGGGAGCTGCAGTACCTGGGGCAGATC	64, 108, 249, 272
3RGGC	TCCGTTCTGTGCCACACCCGTGGCTCCTGCGTTTCCCCCTGGCGCA CGCTCTCTAGAGCGGGG▼CCGCCGCGACCCCGCCGAGCAGGAAGA GGCGGAGCGCGGGACGG▼CCGCGGGAAAAGGCGCGCGGAAGGGGTC CTGCCA CCGCGCCACTTGG▼CCTGCCTCCGTCCCGCCGCGCCACTT GG▼CCTGCCTCCGTCCCGCCGCGCCACTTGCCTGCCTCCGTCCCG CCGCGCCACTTTCGCTGCCTCCGTCCCCCGCCCCGCGGCCATGCC TGTGG▼CCGGCTCGGAGCTGCCGCGCCGG▼CCCTTGCCCCCGCCGC ACAGGAGCGGGACGCCGAGCCGCGTCCGCCGCACGGGGAGCTGCAG TACCTGGGGCAGATC	64, 108, 155, 183, 277, 300
3RGCC	TCCGTTCTGTGCCACACCCGTGGCTCCTGCGTTTCCCCCTGGCGCA CGCTCTCTAGAGCGGGG▼CCGCCGCGACCCCGCCGAGCAGGAAGA GGCGGAGCGCGGGACGG▼CCGCGGGAAAAGGCGCGCGGAAGGGGTC CTGCCA CCGCGCCACTTGG▼CCTGCCTCCGTCCCGCCGCGCCACTT CGCTGCCTCCGTCCCGCCGCGCCACTTGCCTGCCTCCGTCCCG C CGCGCCACTTTCGCTGCCTCCGTCCCCCGCCCCGCGGCCATGCCT GTGG▼CCGGCTCGGAGCTGCCGCGCCGG▼CCCTTGCCCCCGCCGCA CAGGAGCGGGACGCCGAGCCGCGTCCGCCGCACGGGGAGCTGCAGT ACCTGGGGCAGATC	64, 108, 155, 277, 300

L'analisi RFLP con enzima *HaeIII* produceva un *pattern* complesso di prodotti di digestione a causa dei numerosi siti di restrizione nella sequenza amplificata e dalla presenza o meno del polimorfismo G>C all'interno delle ripetizioni, secondo quanto riportato in **Tabella IV**. Risulta evidente che i numerosi frammenti creano sostanziali difficoltà interpretative a causa dell'elevato numero delle bande corrispondenti, delle loro piccole dimensioni e delle differenze di poche decine di bp tra i frammenti. Pertanto l'impiego di tale metodo non assicura sufficiente precisione analitica e il suo impiego non è raccomandabile in un contesto clinico.

Per quanto riguarda invece il risultato analitico ottenuto con sequenziatore automatico, era evidente che la qualità dell'elettroforesi capillare dei prodotti di marcatura era eccellente e non si presentavano difficoltà interpretative nella lettura della sequenza, dato che il rapporto segnale/rumore di fondo era molto elevato. Inoltre il tempo necessario per l'analisi di campioni clinici era ridotto e l'elevata produttività, assicurata dalla possibilità di analizzare campioni multipli, erano elementi tali da permettere l'applicazione del metodo in un contesto analitico clinico. In **Figura 20** è riportato il tracciato corrispondente ad una ripetizione di 28 bp con un USF-1 box CACTTC in omozigosi. Si può notare che l'intensità del rumore di fondo (picchi molto vicini alla linea di base) è basso rispetto al segnale (altezza dei picchi relativi ai nucleotidi della sequenza). Questo ha permesso al programma software di gestione della macchina e impiegato per l'elaborazione dei risultati di identificare automaticamente i singoli nucleotidi della sequenza, svincolando il risultato dall'interpretazione da parte del tecnico/operatore. Pertanto il risultato della messa punto della metodica poteva dirsi soddisfacentemente raggiunto.

Con il metodo di sequenziamento descritto precedentemente sono stati esaminati i campioni di DNA provenienti da 70 pazienti e sono stati riscontrati i seguenti alleli: 2RGC, 2RCC, 3RGGC e 3RGCC la cui frequenza è descritta nella **Tabella V**.

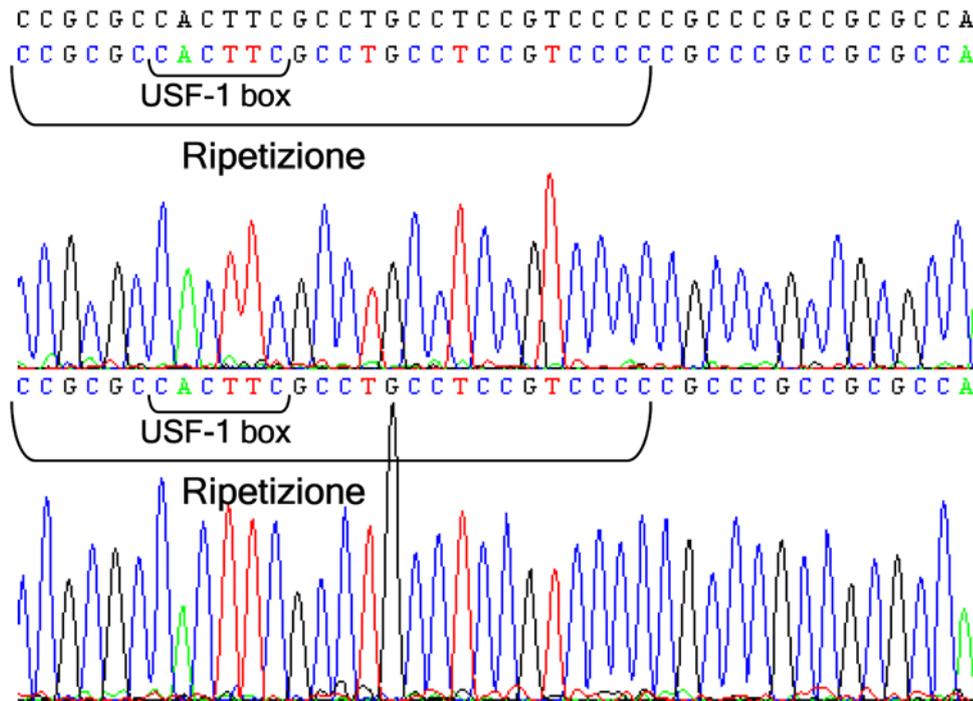


Figura 20. Tracciato elettroferografico con indicazione di ripetizione e USF-1 box omozigote CC

Nella popolazione, i genotipi di maggiore frequenza sono stati: 2RGC/3RGCC (15,7%), 2RCC/2RCC (20%), 3RGCC/3RGGC (21,4%) e 2RGC/3RGGC (27,2%, **Tabella V**). La presenza degli SNPs e delle ripetizioni provoca la differenza di espressione nei vari genotipi poichè comporta la variazione del numero di USF-1 boxes all'interno della sequenza, anche se in alcuni casi, a seconda dello SNP riscontrato, il numero di USF-1 boxes risulta equivalente. Nella popolazione studiata gli USF-1 boxes relativi ai genotipi sono stati i seguenti: 2RCC/2RCC = 0 USF boxes; 2RGC/3RGCC, 3RGCC/3RGCC, 2RGC/2RGC = 2 USF boxes, 3RGCC/3RGGC,

2RGC/3RGGC, 3RGGC/3RGCC = 3 USF boxes, 3RGGC/3RGGC = 4 USF boxes. La frequenza osservata degli USF-1 boxes è riportata in **Tabella V**.

Tabella V. Correlazione tra genotipi e USF-1 boxes funzionali

Numero di USF-1 boxes	Genotipo	N (%)
0	2RCC/2RCC	14 (20%)
	<i>TOTALE</i>	14 (20%)
1	2RGC/2RCC	0 (0%)
	2RCC/3RGCC	0 (0%)
	<i>TOTALE</i>	0 (0%)
2	2RGC/2RGC	4 (22,2%)
	3RGCC/3RGCC	3 (16,6%)
	2RGC/3RGCC	11 (61%)
	2RCC/3RGGC	0 (0%)
	<i>TOTALE</i>	18(25,71%)
3	3RGGC/3RGCC	16 (22,8%)
	2RGC/3RGGC	19 (27,2%)
	<i>TOTALE</i>	35 (50%)
4	3RGGC/3RGGC	3 (4,3%)
	<i>TOTALE</i>	3 (4,3%)
Frequenza allelica		
	2RGC	76 (27,2 %)
	2RCC	56 (20%)
	3RGGC	82 (29,2%)
	3RGCC	66 (23,6%)

Dal momento che i genotipi con 3 e 4 USF boxes sono quelli a più alta espressione, mentre quelli con 0 e 2 USF boxes sono quelli ad espressione più bassa, questo comporta che i pazienti con un genotipo appartenente al primo gruppo potrebbero rispondere in modo minore, mentre i pazienti che mostrano uno dei genotipi del

secondo gruppo dovrebbero sopravvivere più a lungo se trattati con fluoropirimidine orali dopo la chirurgia.

Tabella VI. Prevalenza di tossicità di grado ≥ 2 e genotipo

Trattamento	Tossicità	USF-1 boxes	
		0-2	3-4
Capecitabina			
	Nausea/vomito	15%	-
	Diarrea	20%	-
	Sindrome HF	-	5%
	Neutropenia	-	-
CAPOX	Nausea/vomito	20%	10%
	Diarrea	20%	20%
	Sindrome HF	20%	10%
	Neutropenia	-	10%
FOLFOX	Diarrea	20%	30%
	Neutropenia	-	30%

Abbreviazioni: CAPOX, capecitabina/oxaliplatino; FOLFOX, 5-FU/levofolinato/oxaliplatino; HF, sindrome hand-foot (sindrome mano-piede) una tossicità cutanea di particolare rilievo e associata all'impiego di fluoropirimidine in infusione continua o di capecitabina.

Lo SNP G>C è stato anche associato con la risposta alla chemioterapia con 5-FU e alla sopravvivenza nei pazienti affetti da tumore colo-rettale (Morganti et al., 2005). Infine è stata osservata una maggiore prevalenza delle reazioni avverse tipiche delle fluoropirimidine (nausea/vomito, diarrea) nei pazienti con 0-2 USF-1 boxes funzionali rispetto a quelli con maggior numero di USF-1 boxes (**Tabella VI**).

Questo risultato, coerente con i principi di ordine farmacologico, era più evidente con il trattamento di capecitabina da sola, rispetto alle combinazioni, ad esempio con oxaliplatino, dato che altri tipi di tossicità (esempio, la neutropenia) possono essere associate anche all'uso di farmaci non nucleotidici (come appunto oxaliplatino), dato

che essa è particolarmente presente nei pazienti trattati con uno schema chemioterapico di combinazione.

Discussione

Studi sperimentali e clinici hanno dimostrato la presenza di vari polimorfismi del promotore di TS che influenzano l'efficienza di trascrizione del gene e conseguentemente i livelli di espressione di mRNA e proteina TS ed è stato dimostrato che il genotipo TS ha un ruolo predittivo dei livelli di espressione del suo prodotto nel tessuto tumorale e conseguentemente della risposta al trattamento con fluoropirimidine.

Il primo di questi polimorfismi, situato a livello della regione enhancer del promotore del gene TS (locus cromosomico 18p11.32) è rappresentato dalla variazione nel numero di ripetizioni di una sequenza di 28 paia di basi. Pazienti omozigoti per la variante caratterizzata da 3 sequenze ripetute TSER*3 (TSER*3/*3) tendono ad avere una minore probabilità di risposta al trattamento con 5-fluorouracile rispetto a pazienti omozigoti per la variante con 2 sequenze ripetute TSER*2 (TSER*2/*2) o eterozigoti (TSER*2/*3). Inoltre, i pazienti omozigoti TSER*3/*3 risultano avere, in seguito al trattamento con 5-FU, un beneficio inferiore in termini di sopravvivenza rispetto a pazienti portatori dell'allele TSER*2. Questi dati mostrano che il polimorfismo a livello del promotore per il gene TS può influenzare sia la risposta del tumore al trattamento chemioterapico basato su 5-FU, sia la sopravvivenza. L'analisi del genotipo per questo polimorfismo può essere utile da un punto di vista clinico per individuare e selezionare quei pazienti che possono beneficiare maggiormente della chemioterapia a base di 5-FU.

Il secondo è un polimorfismo a singolo nucleotide rappresentato dalla transizione G>C a livello del dodicesimo nucleotide della seconda sequenza ripetuta nell'allele TSER*3 che può abolire l'aumento dell'efficienza trascrizionale indotto da questa variante.

È stato inoltre descritto un terzo polimorfismo rappresentato dalla delezione di 6 paia di basi a partire dal nucleotide 1494 della 3'UTR che è associato ad instabilità e a diminuiti livelli di mRNA del gene TS a livello tumorale, la cui rilevanza clinica deve ancora essere confermata.

La possibilità di valutare il genotipo di un paziente in relazione ai polimorfismi noti della regione promoter rappresenta quindi un importante aspetto sia della ricerca medica e farmacologica che dell'assistenza ai pazienti affetti da tumori solidi (non solo dal carcinoma coloretale) e candidati al trattamento con fluoropirimidine. Infatti, poter pianificare lo schema chemioterapico sulla base del genotipo del paziente e/o del tumore rappresenta l'endpoint finale attraverso cui raggiungere la massima efficacia terapeutica e la maggiore tollerabilità possibile.

Per far ciò è però necessario un metodo di analisi farmacogenetica che sia sensibile e preciso, ovvero che dia pochi falsi negativi e pochi falsi positivi. Inoltre, il metodo deve essere affidabile ed il risultato riproducibile.

Nel presente lavoro di tesi la genotipizzazione della regione promoter di TS è stata eseguita con due tecniche, ovvero la PCR-RFLP ed il sequenziamento genico automatico.

La prima tecnica prevede l'amplificazione della regione di interesse e la successiva digestione mediante un'endonucleasi di restrizione. I frammenti ottenuti dalla digestione del prodotto di PCR sono poi separati su gel di agarosio (o di poliacrilammide) e visualizzati con luce ultravioletta in presenza di un agente

intercalante il DNA come l'etidio bromuro. Tale tecnica è abbastanza semplice, è non richiede apparecchiature complesse e costose, per cui essa è generalmente diffusa in molti laboratori. Il risultato ottenuto, però non sempre è soddisfacente, dato che la discriminazione allelica dipende dalla possibilità di visualizzare correttamente (e completamente) il pattern di frammentazione del prodotto di PCR digerito dall'endonucleasi. Appare evidente, perciò, che è l'operatore stesso (con la sua esperienza) a dover interpretare la presenza delle diverse bande all'interno del gel di agarosio, e una bassa resa della PCR o una incompleta digestione del prodotto di amplificazione può portare ad un risultato non corrispondente al genotipo reale del paziente.

La ricerca svolta nel presente lavoro di tesi ha portato alla elaborazione e validazione di un altro metodo di analisi genetica, che è rappresentato dal sequenziamento automatico. Tale tecnica prevede sicuramente costi maggiori rispetto alla precedente, sia in termini di materiale di consumo e di reagenti, che di strumentazione, il che fa del sequenziamento automatico una tecnica meno diffusa della precedente. I vantaggi di questo metodo rispetto all'altro però sono molteplici: innanzitutto, il metodo si è dimostrato sensibile e specifico. Infatti, l'analisi a posteriore delle sequenze visualizzate nell'elettroferogramma mostrava una compatibilità assoluta con quella relativa alla regione promoter del gene TS, escludendo in tal modo qualsiasi altra sequenza genica. Inoltre, a prescindere dal primo prodotto di PCR visualizzato nel gel di agarosio, l'elettroferogramma confermava non solo il numero di ripetizioni di 28 bp, ma anche il polimorfismo G>C. Un vantaggio del sequenziamento che deve essere ricordato è la possibilità di scoprire ulteriori polimorfismi (o mutazioni casuali)

all'interno della sequenza casuale, potendo attingere ai risultati anche in futuro, dato che gli elettroferogrammi sono registrati in files di dati.

E' importante sottolineare, però, che il sequenziamento automatico secondo la tecnica di Sanger impiegata nel presente lavoro di tesi (ovvero usando deossinucleotidi fluorescenti) in alcuni casi non porta a risultati univoci e chiaramente identificabili. Questo accade quando il rapporto segnale/rumore di fondo è sufficientemente elevato, cosicché non è possibile dirimere con certezza lo status di eterozigote per una determinata posizione nella sequenza genica. Ciò può dipendere da vari fattori, quali la parziale purificazione del prodotto della PCR di sequenziamento (cosicché sono analizzati campioni "inquinati" da piccoli frammenti incompleti, deossinucleotidi liberi, etc) o una bassa resa della stessa PCR di sequenziamento. In riferimento all'analisi della regione promoter di TS, la condizione di eterozigosi 2R/3R poteva rendere ancor più difficile l'analisi, dato che la terza ripetizione di 28 paia di basi dell'allele 3R era completamente sfalsata rispetto alla sequenza nucleotidica dell'altro allele. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la PCR di sequenziamento e la successiva purificazione dell'amplificato permettevano di ottenere un rapporto segnale/rumore ottimale per l'identificazione automatica da parte del software dei singoli nucleotidi, così da rendere obiettivo il risultato che non dipendeva più dall'interpretazione da parte del tecnico/operatore.

Infine, il sequenziamento automatico, oltre a permettere l'analisi di un numero sufficientemente elevato di campioni (fino a 192), è in grado di analizzare una sequenza nucleotidica in tempi relativamente brevi per poter essere applicato nella pratica clinica.

Al fine di poter validare il metodo di sequenziamento elaborato, è stato analizzato il genotipo TSER di 70 pazienti affetti da tumori coloretali e candidati al trattamento con fluoropirimidine. Il sequenziamento ha permesso di genotipizzare tutti i pazienti senza problemi di interpretazione del risultato, sebbene la numerosità del campione non ha permesso di trarre delle informazioni esaustive sul rapporto tra tossicità indotta in particolare da capecitabina e polimorfismo TSER. Nonostante ciò, è apparso evidente che le tossicità di tipo gastrointestinale (diarrea e stomatite) erano più frequenti nei pazienti con un ridotto numero di USF box, in accordo a quanto osservato in precedenti lavori. In futuro sarà necessario aumentare la numerosità della popolazione analizzata per poter stabilire con sufficiente accuratezza e potenza se esiste effettivamente un'associazione tra genotipo TSER e tossicità da fluoropirimidine, calcolando eventualmente il rischio. Infine, poiché TS è solo uno dei possibili fattori genetici coinvolti nella tossicità da fluoropirimidine, sarà necessario analizzare i risultati considerando altre possibili cause farmacogenetiche (DPD e TP), cliniche (performance status del paziente) e farmacologiche (farmaco, dose e modalità di somministrazione).

In conclusione, i dati di questa tesi dimostrano che il metodo di sequenziamento di TS sviluppato e validato su 70 pazienti è affidabile e preciso e l'analisi del genotipo TS in 50 pazienti trattati con terapia a base di fluoropirimidine dimostra una tendenza a sviluppare reazioni avverse nei pazienti con genotipi associati a basso numero di USF-1 boxes. Questi dati preliminari dovranno essere validati in studi clinici prospettici con un adeguato numero di pazienti.

Bibliografia

Adam R, Avisar E, Ariche A, et al. Five year survival following hepatic resection after neoadjuvant chemotherapy for non resectable colorectal (liver) metastases. *Ann Surg Oncol* 8(4): 347-353 (2001)

Ardalan B, Buscaglia MD, Schein PS. Tumor 5-fluorodeoxyuridylate concentrations as a determinant of 5-fluorouracil response. *Biochem Pharmacol* 27: 2009-2013 (1978)

Armstrong RD, Lewis M, Stern SG, et al. Acute effect of 5-fluorouracil on cytoplasmatic and nuclear dihydrofolate reductase messenger RNA metabolism. *J Biol Chem* 261: 7366-7371 (1986)

Aschele C, Debernardis D, Tunesi G, Maley F, Sobrero A. Thymidylate synthase protein expression in primary colorectal cancer compared with the corresponding distant metastases and relationship with the clinical response to 5- fluorouracil. *Clin Cancer Res* 6(12): 4797-4802 (2000)

Au JL, Rustum YM, Ledsma EJ, et al. Clinical pharmacological studies of concurrent infusion of 5-fluorouracil and thymidine in treatment of colorectal carcinoma. *Cancer Res* 42: 2930-2937 (1982)

Backus HHJ, Van Riel JMGH, Van Groeningen CJ, et al. Rb, mcl-1 and p53 expression correlate with clinical outcome in patients with liver metastases from colorectal cancer. *Ann Oncol* 12(6): 779-785 (2001)

Bajetta E, Rimassa L, Di Bartolomeo M, et al. Le fluoropirimidine: dal fluorouracile alle nuove molecole. *Argomenti di Oncologia* 17: 1-17 (1996)

Balch CM, Levin B. Regional and systemic chemotherapy for colorectal metastases to the liver. *World J Surg* 11: 521-526 (1987)

Banerjee D, Gorlick R, Liefshitz A, et al. Levels of E2F-1 expression are higher in lung metastasis of colon cancer as compared with hepatic metastasis and correlate with levels of thymidylate synthase. *Cancer Res* 60(9): 2365-2367 (2000)

Barbour KW, Berger SH, Berger FG. Single aminoacid substitution defines a naturally occurring genetic variant of human thymidylate synthase. *Mol Pharmacol* 37: 515 519 (1990)

Berger SH, Barbour KW, Berger FG. Effect of polyglutamylation of 5,10-methylenetetrahydrofolate on the binding of 5-fluoro-2'-deoxyuridylate to thymidylate

synthase purified from a human colon adenocarcinoma xenograft. *Mol Pharmacol* 34: 480-484 (1988)

Berger SH, Jenh CH, Johnson LF, et al. Thymidylate synthase overproduction and gene amplification in fluorodeoxyuridine-resistant human cells. *Mol Pharmacol* 28: 461-467 (1985)

Bertino JR, Sawiki WL, Linqvist CA, et al. Schedule-dependent antitumor effects of methotrexate and 5-fluorouracil. *Cancer Res* 37: 327-328 (1977)

Birnie GD, Kroeger H, Heidelberger C. Studies of fluorinated pyrimidines. The degradation of 5-fluoro-2'-deoxyuridine and related compounds by nucleoside phosphorylase. *Biochemistry* 13: 566-572 (1963)

Bonadonna G, Robustelli Della Cuna G, Valagussa P. *Medicina Oncologica*, settima edizione, Masson, Milano (2003)

Bourke RS, West CR, Cheda G, et al. Kinetics of entry and distribution of 5-fluorouracil in cerebrospinal fluid and brain following intravenous injection in a primate. *Cancer Res* 33: 1735-1740 (1973)

Bowen D, White JC, Goldman ID. A basis for fluoropyrimidine-induced antagonism to methotrexate in Ehrlich ascites tumor cells *in vitro*. *Cancer Res* 38: 219-222 (1978)

Buyse M, Thirion P, Carlson RW, et al: Relation between tumor response to first-line chemotherapy and survival in advanced colorectal cancer: a metaanalysis. *Lancet* 356: 373-378 (2000)

Cadman E, Hermer R, Davis L. Enhanced 5-fluorouracil nucleotide formation after methotrexate administration: explanation for drug synergism. *Science* 205: 1135-1137 (1979)

Caradonna SJ, Cheng YC. The role of deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase, uracil-DNA polymerase in the metabolism of FUdR in human tumor cells. *Mol Pharmacol* 18: 513-520 (1980)

Cheng YC, Nakayama K. Effects of 5-fluoro-2'-deoxyuridine on DNA metabolism in HeLa cells. *Mol Pharmacol* 23: 171-174 (1983)

Christophidis N, Vajda FJE, Lucas I, et al. Fluorouracil therapy in patients with carcinoma of the large bowel: a pharmacokinetic comparison of various rates and routes of administration. *Clin Pharmacokinet* 3: 330-336 (1987)

Chu E, Johnston PG, Takimoto CH. Antimetabolites. In: *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers*, vol. 14, p. 1, Pinedo MM, Longo DL, Chabner BA (editors), Elsevier Science Publisher, Amsterdam (1993)

Chu E, Koeller DM, Casey JL, et al. Autoregulation of human thymidylate synthase messenger RNA translation by thymidylate synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88: 8977-8981 (1991)

Chu E, Takimoto CM. Antimetabolites. In: *Cancer Principles and Practice of Oncology*, p. 358, De Vita VT, Hellman J, Rosenberg SA (editors), JB Lippincott, Philadelphia (1993)

Clark JL, Berger SH, Mittelman A, Berger FG. Thymidylate synthase gene amplification in a colon tumor resistant to fluoropyrimidine chemotherapy. *Cancer Treatment Report* 71: 261-265 (1987)

Clarkson B, O'Connor A, Winston L, et al. The physiologic disposition of 5-fluorouracil and 5-fluoro-2'-deoxyuridine in man. *Clin Pharmacol Ther* 5: 581-610 (1964)

Cohen JL, Irwin LE, Marshall GJ, et al. Clinical pharmacology of oral and intravenous 5-fluorouracil (NSC-19893). *Cancer Chemotherapy Report* 58: 723-731 (1974)

Cohen MB, Glezer RI. Cytotoxicity and the inhibition of ribosomal RNA processing in human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 27: 308-313 (1985)

Collins JM, Dedrick RL, King FG, et al. Nonlinear pharmacokinetic models for 5-fluorouracil in man: intravenous and intraperitoneal routes. *Clin Pharmacol Ther* 28: 235-243 (1980)

Cunningham D, Zalcborg J, Maroun J, et al. Efficacy, tolerability and management of raltitrexed (Tomudex) monotherapy in patients with advanced colorectal cancer. a review of phase II/III trials. *Eur J Cancer* 38:478-86 (2002)

Danenberg PV, Danenberg KD. Effect of 5-10-methyltetrahydrofolate on the dissociation of 5-fluoro-2'-deoxyuridylate from thymidylate synthase: evidence for an ordered mechanism. *Biochemistry* 17: 4018-4024 (1978)

Danenberg PV. Thymidylate synthase: a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochim Biophys Acta* 473: 73-79 (1977)

De Bruin M, van Capel T, Van der Born K, et al. Role of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in fluoropyrimidine sensitivity. *Br J Cancer*. 88(6): 957-964. (2003)

De Gramont A, Vignoud J, Tournigand C, et al. Oxaliplatin with highdose leucovorin and 5-fluorouracil 48h-continuous infusion in pretreated metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 33: 214-219 (1997)

De Lap RJ. The effect on the therapeutic index of fluorouracil in cancer patients. *Yale J Biol Med* 61: 23-34 (1988)

Di Paolo A., Danesi R., Falcone A., et al. Relationship between 5- fluorouracil disposition, toxicity and dihydropyrimidine dehydrogenase activity in cancer patients. *Ann Oncol* 12: 1301-1306 (2001)

Di Paolo A., Ibrahim T., Danesi R., et al. Relationship between plasma concentrations of 5-Fluorouracil and 5-fluoro-5,6-dihydrouracil and toxicity of 5-Fluorouracil infusions in cancer patients. *Ther Drug Monitor* 24: 588-593(2002)

Dolnick BJ, Pink JJ. 5-Fluorouracil modulation of dihydrofolate reductase RNA levels in methotrexate-resistant KB cells. *J Biol Chem* 258: 13299-13306(1983)

Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 355: 1041- 1047 (2000)

Dupuis A, Skehel JM, Walker JE. A homologue of a nuclear-coded ironsulfur protein subunit of bovine mitochondria complex I is encoded in chloroplast genomes. *Biochemistry* 30: 2954-2960 (1991)

Duschinsky R, Plevin E, Heidelberger C. The synthesis of 5- fluoropyrimidines. *J Am Chem Soc* 79: 4559-4560 (1957)

Eggink G, Engel H, Vriend G, et al. Rubedoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*. Structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints. *J Mol Biol* 212: 135-142 (1990)

Elder D, Glimelius B, Hallstrom M, et al. Thymidylate Synthase expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy *J Clin Oncol* 20 (7): 1721-1728 (2002)

Elias L, Sandoval JM. Interferon effects upon fluorouracil metabolism by HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 163(2): 867-874 (1989)110

Endo M, Shinbori N, Fukase Y, et al. Induction of thymidine phosphorylase expression and enhancement of efficacy of capecitabine or 5'- deoxy-5-fluorouridine by cyclophosphamide in mammary tumor models. *Int J Cancer* 83(1): 127-134 (1999)

Ensminger WD, Gyves JW. Clinical pharmacology of hepatic arterial chemotherapy. *Semin Oncol* 10: 176-182 (1983)

Ensminger WD, Rosowsky A, Raso V, et al. A clinical-pharmacological evaluation of hepatic arterial infusions of 5-fluoro-2'-deoxyuridine and 5- fluorouracil. *Cancer Res* 38: 3784-3792 (1978)

Etienne M.C, Lagrange JL, Dassonville O, et al. Population study of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer patients. *J Clin Oncol* 12: 2248- 2253 (1994)

Etienne MC, Chazal M, Laurent-Puig P, et al. Prognostic value of tumoral thymidylate synthase and p53 in metastatic colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based chemotherapy: phenotypic and genotypic analyses. *J Clin Oncol* 20(12): 2832-2843 (2002)

Fernandez-Salguero P., Kimura S., Gonzalez F.J., Yamada K. Assignment of the dihydropyrimidine dehydrogenase gene to chromosome region 1p22 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 24: 613-614 (1994)

Fischel JL, Rostagno P, Formento P, et al. Ternary combination of irinotecan, fluorouracil-folinic acid and oxaliplatin: results on human colon cancer cell lines. *Br J Cancer* 84: 579-585 (2001)

Fox SB, Westwood M, Moghaddam A, et al. The angiogenic factor platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase is upregulated in breast cancer epithelium and endothelium. *Br J Cancer* 73(3):275-280 (1996)

Fraile RJ, Baker LH, Buroker TR, et al. Pharmacokinetics of 5- fluorouracil administered orally, by rapid intravenous and by slow infusion. *Cancer Res* 40: 2223-2228 (1980)

Fukushima M, Okabe H, Takechi T, et al. Induction of thymidine phosphorylase by interferon and taxanes occurs only in human cancer cells with low thymidine phosphorylase activity. *Cancer Lett* 187(1-2): 103-110 (2002)

Giatromanolaki A, Fountzilias G, Koukourakis MI, et al. Neo-angiogenesis in locally advanced squamous cell head and neck cancer correlates with thymidine phosphorylase expression and p53 nuclear oncoprotein accumulation. *Clin Exp Metastasis* 16: 665-672 (1998)

Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6: 995-1001 (1996)

Goldberg AR, Machledt JH Jr, Perdee AB. On the action of fluorouracil on leukemia cells. *Cancer Res* 26: 1611-1615 (1966)

Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, et al. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 22: 23-30 (2004)

Grem J, Danenberg KD, Behan K, et al. Thymidine kinase, thymidylate synthase, and dihydropyrimidine dehydrogenase profiles of cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen. *Clin Cancer Res* 7(4): 999- 1009 (2001)

Grem J, Hoth D, Hamilton JM. Overview of current status and future direction of clinical trials with 5-fluorouracil in combination with folinic acid. *Cancer Treatment Report* 12: 1249-1264 (1987)

Grem J. Fluorinated pyrimidines. In: *Cancer Chemotherapy. Principles and Practice*, p 180, Chabner BA, Collins JM (editori), JB Lippincott, Philadelphia (1990)

Haggie GD, Sommadossi JP, Cross DS, et al. Metabolism of 5-fluorouracil in cancer patients with quantitation of 5-fluorouracil catabolites in plasma, urine, and bile over time. *Cancer Res* 47: 2203-2206 (1987)

Hakala MT. Basis for the effect of leucovorin on the activity and site of action of 5-fluorouracil in human cells. In: *The current status of 5-fluorouracil-leucovorin calcium combination*, pp. 33-39, Bruckner J, Restum YM (editori), John Wiley & Sons, New York (1984)

Haynes HA, Mead KW, Goldwyn RM. Cancer of the skin. In: *Cancer, principles and practice of oncology*, seconda ed., pp. 1343-1369, De Vita et al. (editori), JB Lippincott, Philadelphia (1985)

Heidelberger C. Fluorinated pyrimidines and their nucleosides. In: *Antineoplastic and immunosuppressive agents*, parte II, pp. 193-231, Sartorelli e Johns (editori), Springer-Verlag, New York (1975)

Herrick D, Kufe DW. Lethality associated with incorporation of 5-fluorouracil into preribosomal RNA. *Mol Pharmacol* 26: 135-140 (1984)

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: realtime monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11: 1026-1030 (1993)

Hohn DC, Melnick J, Stagg R, et al. Biliary sclerosis in patients receiving hepatic arterial infusion and floxuridine. *J Clin Oncol* 3: 98-102 (1985)

Hohn DC, Rayner AA, Economou JS, et al. Toxicities and complication of implanted pump hepatic arterial infusions and intravenous floxuridine infusion. *Cancer* 57: 465-470 (1986)

Horie N, Aiba H, Oguro K, et al. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 25: 191-197 (1995)

Houghton JA, Houghton PJ. Elucidation of pathways of 5-fluorouracil metabolism in xenografts of human colorectal adenocarcinoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19(6): 807-815 (1983)

Houghton JA, Houghton PJ. 5-Halogenated pyrimidines and their nucleosides. In: Antitumor drug resistance, pp. 515-549, Fox e Fox (editori), Springer-Verlag, New York (1984)

Iacopetta B, Grieu F, Joseph D, Elsaleh H. A polymorphism in the enhancer region of the thymidylate synthase promoter influences the survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil. *Br J Cancer* 85(6): 827- 830 (2001)

Ichikawa W, Uetake H, Shirota Y. Combination of Dihydropyrimidine Dehydrogenase and Thymidylate Synthase Gene Expressions in Primary Tumors as Predictive Parameters for the Efficacy of Fluoropyrimidine-based Chemotherapy for Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 9(2): 786-791 (2003)

Ichikawa Y, Kubota T, Otani Y, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and messenger RNA level may be related to the antitumor effect of 5- fluorouracil on human tumor xenografts in nude mice *Clin Cancer Res* (5): 883-889 (1999)

Igarashi M, Dhar DK, Kubota H, et al. The prognostic significance of microvessel density and thymidine phosphorylase expression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 82(7): 1225-1232 (1998)

Ingraham HA, Tseng BY, Goulian M. Nucleotide levels and incorporation of 5-fluorouracil and uracil into DNA of cells treated with 5-fluorodeoxyuridine. *Mol Pharmacol* 21: 211-216 (1982)

Ishida Y, Kawakami K, Tanaka Y, et al. Association of thymidylate synthase gene polymorphism with its mRNA and protein expression and with prognosis in gastric cancer. *Anticancer Res* 22(5): 2805-2809 (2002)

Jansen G. In: Antifolate drugs in cancer therapy, pp. 293-321, Jackman AL (editore), Humana press, Totowa, NJ (1999)

Jiang W., Lu Z., He Y, Diasio R. Dihydropyrimidine Dehydrogenase activity in hepatocellular carcinoma: implication in 5-fluorouracil based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 3: 395-399 (1997)

Johnson MR, Wang K, Tillmanns S, et al. Structural organization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Cancer Res* 57: 1660-1663 (1997)

Johnston PG, Benson AB 3rd, Catalano P, Rao MS, O'Dwyer PJ, Allegra CJ. Thymidylate synthase protein expression in primary colorectal cancer: lack of correlation with outcome and response to fluorouracil in metastatic disease sites. *J Clin Oncol* 21(5): 815-819 (2003)

Johnston PG, Drake JC, Trepel J, Allegra CJ. Thymidylate synthase level as the main predictive parameter for sensitivity to 5-fluorouracil, but not for folate-based

thymidylate synthase inhibitors, in 13 nonselected colon cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 5(3): 643-654 (1999)

Johnston PG, Lenz MJ, Leiechman CG, et al. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5- fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res* 55: 1407-1412 (1995)

Johnston PG, Liang CM, Henry S, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies that localize thymidylate synthase in the cytoplasm of human cells and tissue. *Cancer Res* 51: 6668-6676 (1991)

Kaneda S, Nalbantoglu J, Takeishi K, et al. Structural and functional analysis of the human thymidylate synthase gene. *J Biol Chem* 265(33): 20277- 20284 (1990)

Kaneda S, Takeishi K, Ayusawa D, et al. Role in translation of a triple tandemly repeated sequence in the 5' untranslated region of human thymidylate synthase mRNA. *Nucleic Acids Res* 15: 1259-1270 (1987)

Kawakami K, Ishida Y, Danenberg KD, et al. Functional polymorphism of the thymidylate synthase gene in colorectal cancer accompanied by frequent loss of heterozygosity. *Jpn J Cancer Res* 93(11): 1221-1229 (2002)

Kawakami K, Omura K, Kanehira E, et al. Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancer. *Anticancer Res* 19: 3249-3252 (1999)

Kawakami K, Watanabe G. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of Thymidylate synthase gene. *Cancer Res* 63: 6004-6007 (2003)

Kempin S, Gutierrez J, Wilson E, Lowery C, Diasio R. Raltitrexed (Tomudex): an alternative choice in patients intolerant to 5-fluorouracil. *Cancer Invest* 20: 992-995 (2002)

Kessel D. Cell surface associated with exposure of leukemia L1210 cells to 5-fluorouracil. *Cancer Res* 40: 322-324 (1980)

Koenig II, Patel A. Biochemical basis for fluorouracil neurotoxicity. *Arch Neurol* 23: 155-163 (1979)

Kornmann M, Link KH, Galuba I, et al. Association of time to recurrence with thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression in stage II and III colorectal cancer. *J Gastrointest Surg* 6(3): 331-337 (2002)

Laurie JA, Moertel CG, Fleming TR, et al. Surgical adjuvant therapy of large bowel carcinoma: an evaluation of levamisole and the combination of levamisole and fluorouracil. *J Clin Oncol* 7: 1447-1456 (1989)

- Lee Y, Johnson LF, Chang LS, Chen Y. Inhibition of mouse thymidylate synthase promoter activity by the wild-type p53 tumor suppressor protein. *Exp Cell Res* 234(2): 270-276 (1997)
- Lèvi F, Misset JL, Brienza S, et al. A chronopharmacologic phase II clinical trial with 5-fluorouracil, folinic acid and oxaliplatin using an ambulatory multichannel programmable pump. High antitumor effectiveness against metastatic colorectal cancer. *Cancer* 69: 893-900 (1992)
- Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Ana* 114: 143-149 (1999)
- Lokich J, Fine N, Perri J, Bothe A. Protracted ambulatory venous infusion of 5-fluorouracil. *Am J Clin Oncol* 6: 103-107 (1983)
- Lonn U, Lonn S. DNA lesions in human neoplastic cells and cytotoxicity of 5-fluoropyrimidines. *Cancer Res* 46: 3866-3870 (1986)
- Lonn U, Lonn S. Interaction between 5-fluorouracil and DNA of human colon adenocarcinoma. *Cancer Res* 44: 3414-3418 (1984)
- Lubecq C, Peters RA. The toxicity of fluoroacetate and the tricarboxylic acid cycle. *Biochimica Biophysica Acta* 3: 215-230 (1949)
- Luccioni C, Beaumatin J, Bardot V, Lefrancois D. Pyrimidine nucleotidem metabolism in human colon carcinomas: comparison of normal tissues, primary tumors and xenografts. *Int J Cancer* 58(4): 517-522 (1994)
- Machover D, Diaz-Rubio E, de Gramont A, et al. Two consecutive phase II studies of oxaliplatin for treatment of patients with advanced colorectal carcinoma who resistant to previous treatment with fluoropyrimidines. *Ann Oncol* 7: 95-98 (1996)
- Machover D. Developments of fluoropyrimidines as inhibitors of thymidylate synthase: pharmacologic and clinical aspects. *J Surg Oncol*, suppl 2:42-49 (1991)
- MacMillan WE, Wolberg WH, Welling PG. Parmacokinetics of fluorouracil in humans. *Cancer Res* 38: 3479-3482 (1978)
- Mader RM, Sieder AE, Braun J, et al. Transcription and activity of 5- fluorouracil converting enzymes in fluoropyrimidine resistance in colon cancer in vitro. *Biochem Pharmacol* 54(11): 1233-1242 (1997)
- Mandel DS. The incorporation of 5-fluorouracil into RNA and its molecular consequences. *Prog Mol Subcell Biol* 1: 82-135 (1969)

Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks, et al. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res* 63: 2898-2904 (2003)

Marsh S, McKay JA, Cassidy J, McLeod HL. Polymorphism in the thymidylate synthase promoter enhancer region in colorectal cancer. *Int J Oncol* 19(2): 383-386 (2001)

Martin DS, Nayak P, Sayer RC, et al. Enhancement of 5-fluorouracil chemotherapy with emphasis on the use of excess thymidine. *Cancer Bull* 30: 219-224 (1978)

McLeod HL, Sludden J, Murray GI, et al. Characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase in human colorectal tumors. *Br J Cancer* 77: 461-465 (1998)

Meinsma R, Fernandez-Salguero P, Van Kuilenburg ABP, et al. Human polymorphism in drug metabolism: mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene results in exon skipping and thymine uraciluria. *DNA Cell Biol* 14: 1-6 (1995)

Metzger R, Leichman CG, Danenberg H-J, et al. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 16(1): 309-316 (1998)

Moertel CG, Fleming TR, MacDonald JS, et al. Levamisole and fluorouracil for the adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med* 54: 69-71 (1975)

Moghaddam A, Zhang HT, Fan TP, et al. Thymidine phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(4): 998-1002. (1995)

Morganti M, Ciantelli M, Giglioni B, et al. Relationships between promoter polymorphism in the thymidylate synthase gene and mRNA levels in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 41: 2176-2183 (2005)

Morita T, Matsuzaki A, Tokue A. Quantitative analysis of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in renal cell carcinoma. *Oncology* 65(2): 125-131. (2003)

Myers CE, Young RC, Chabner BA. Biochemical determinants of 5- fluorouracil response in vivo. The role of deoxyuridylate pool expansion. *J Clin Invest* 56: 1231-1238 (1975)

Myers CE. The pharmacology of the fluoropyrimidines. *Pharmacol Rev* 33: 1-15 (1981)

Naguib FMN, el Kouni MH, Cha S. Enzymes of uracil catabolism in normal and neoplastic tissue. *Cancer Res* 45: 5404-5412 (1985)

- Navelgund LG, Rossana C, Muench AJ, Johnson LF. Cell cycle regulation of thymidylate synthetase gene expression in cultured mouse fibroblasts. *J Biol Chem* 255(15): 7386-7390 (1980)
- O'Brien T, Cranston D, Fuggle S, et al. Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Res* 55(3): 510-513 (1995)
- Peters GJ, Backus HH, Freemantle S, et al. Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1587(2-3): 194-205 (2002)
- Peters GJ, Jansen G. In: Principles of antineoplastic drug development and pharmacology, pp. 543-585, Schilsky RL et al. (editori), Marcel Dekker, New York (1996)
- Peters GJ, Smitskamp-Wilms E, Smid K, et al. Determinants of activity of the antifolate thymidylate synthase inhibitors Tomudex (ZD1694) and GW1843U89 against mono- and multi-layered colon cancer cell lines under folate-restricted conditions. *Cancer Res* 59(21): 5529-5535 (1999)
- Peters GJ, Van der Wilt CL, Van Groeningen CJ, et al. Thymidylate synthase inhibition after administration of fluorouracil with or without leucovorin in colon cancer patients: implications for treatment with fluorouracil. *J Clinl Oncol* 12(10): 2035-2042 (1994)
- Peters GJ, Van Groeningen CJ, Laurensse EJ, Pinedo H. Thymidylate synthase from untreated human colorectal cancer and colonic mucosa: enzyme activity and inhibition by 5-fluoro-2'-deoxy-uridine-5'-monophosphate. *Eur J Cancer* 27(3): 263-267 (1991)
- Priest DG, Ledford SE, Doig MT. Effect of polyglutamylation of 5,10-methylenetetrahydrofolate on the binding of 5-fluoro-2'-deoxyuridylate to thymidylate synthase purified from a human colon adenocarcinoma xenograft. *Biochem Pharmacol* 29: 1549-1553 (1980)
- Punt CJH. New drugs in treatment of colorectal carcinoma. *Cancer* 83: 679-689 (1998)
- Radparvar S, Houghton PJ, Houghton JA. Effect of polyglutamylation of 5,10-methylenetetrahydrofolate on the binding of 5-fluoro-2'-deoxyuridylate to thymidylate synthase purified from a human colon adenocarcinoma xenograft. *Biochem Pharmacol* 38: 335-342 (1989)
- Ramberg ES, Ishaq M, Rulf S, et al. Inhibition of transfer RNA function by replacement of uridine-derived nucleosides with 5-fluorouridine. *Biochemistry* 17: 3978-3985 (1978)

- Reichard P, Skold O, Klein G, et al. Studies on resistance against fluorouracil. Enzymes of the uracil pathway during development of resistance. *Cancer Res* 22: 235-243 (1962)
- Reichard P, Skold O, Klein G. Possible enzymic mechanism for the development of resistance against fluorouracil in ascites tumors. *Nature* 183: 939-941 (1959)
- Ridge SA, Brown O, McMurrough J, et al. Mutations at codon 974 of the DPD gene are a rare event. *Br J Cancer* 75: 178-179 (1997)
- Ridge SA, Sludden J, Wei X, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 77: 497-500 (1998)
- Robins MJ, Naik SR. Nucleic acid related compounds III. A facile synthesis of 5-fluorouracil bases and nucleosides by direct fluorination. *J Am Chem Soc* 93: 5277-5278 (1971)
- Rutman RJ, Cantarow A, Paschkis KE. Studies in 2-acetylaminofluorene carcinogenesis III. The utilization of uracil-2-¹⁴C by paraneoplastic rat liver hepatoma. *Cancer Res* 14: 119-134 (1954)
- Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, et al. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 6: 1322-1327 (2000)
- Saltz LB, Cox JV, Blanke C, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 343: 905-914 (2000)
- Sanno Y, Holzer M, Schimpler RT. Studies of mutation affecting pyrimidine degradation in inbred mice. *J Biol Chem* 245: 5658-5676 (1979)
- Santi DV, McHenry CS, Sommer H. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry* 13: 471-481 (1974)
- Santi DV, McHenry CS. 5-Fluoro-2'-deoxyuridylate: covalent complex with thymidylate synthetase. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 1855-1857 (1972)
- Scherf U, Ross DT, Waltham M, et al. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 24(3): 236-244 (2000)
- Schuetz JD, Collins JM, Wallace HJ, Diasio RB. Alteration of the secondary structure of newly synthesized DNA from murine bone marrow cells. *Cancer Res* 46: 119-123 (1988)A
- Schuetz JD, Diasio RB. The effect of 5-fluorouracil on DNA chain elongation in intact bone marrow cells. *Biochem Biophys Res Commun* 133: 361-367 (1985)

- Schuetz JD, Wallace HJ, Diasio RB. 5-Fluorouracil incorporation into DNA of CF-1 mouse bone marrow cells as possible mechanism of toxicity. *Cancer Res* 44: 1358-1363 (1984)
- Schuetz JD, Wallace HJ, Diasio RB. DNA repair following incorporation of 5-fluorouracil into DNA of mouse bone marrow cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 21: 208-210 (1988)B
- Schwartz EL, Baptiste N, Wadler S, Makower D. Thymidine phosphorylase mediates the sensitivity of human colon carcinoma cells to 5- fluorouracil. *J Biol Chem* 270(32): 19073-19077 (1995)
- Schwartz EL, Hoffman M, O'Connor CJ, Wadler S. Stimulation of 5- fluorouracil metabolic activation by interferon-alpha in human colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 182(3): 1232-1239 (1992)
- Schwartz EL, Wan E, Wang FS, Baptiste N. Regulation of expression of thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 58(7): 1551-1557 (1998)
- Sharma R, Hoskins JM, Rivory LP, et al. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and toxicity to capecitabine in advanced colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 14(3): 817-25 (2008)
- Shaw T, Smillie RH, MacPhee DG. The role of blood platelets in nucleoside metabolism: assay, cellular location and significance of thymidine phosphorylase in human blood. *Mutat Res* 200(1-2): 99-116 (1988)
- Shiotani T, Weber G. Purification and properties of dihydrothymine dehydrogenase from rat liver. *J Biol Chem* 256: 219-224 (1981)
- Skold O. Studies on resistance against 5-fluorouracil. IV. Evidence for an altered uridine kinase in resistant cells. *Biochim Biophys Acta* 76: 160-162 (1963)
- Sommadossi JP, Cross DS, Gewirtz DA, et al. Evidence from rat hepatocytes of an unrecognized pathway of 5-fluorouracil metabolism with the formation of a glucuronide derivative. *Cancer Res* 45: 2450-2455 (1985)
- Spears CP, Shahinian AH, Moran RG, et al. In vivo kinetics of thymidylate synthetase inhibition of 5-fluorouracil-sensitive and -resistant murine colon adenocarcinomas. *Cancer Res* 42(2): 450-456 (1982)
- Speyer JL, Collins JM, Dedrick RL et al. Phase I and pharmacologic studies of 5-fluorouracil administered intraperitoneally. *Cancer Res* 40: 567-575 (1980)

Stoll HL. Topical chemotherapy In: Cancer dermatology, pp 435-448, Helm F (editore), Lea e Febiger, Philadelphia (1979)

Swain SM, Lippman ME, Egan EF, et al. Fluorouracil and high-dose leucovorin in previously treated patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 7: 890-899 (1989)

Sweeny DJ, Barnes S, Diasio RB. Production of cholestasis by 2-fluoroalanine-chenodeoxycholic acid: possible role of this metabolite in the cholestasis associated with hepatic arterial infusion of fluoropyrimidines. *Proc Am Assoc Cancer Res* 29: 486-491 (1988)A

Sweeny DJ, Barnes S, Heggie GD, Diasio RB. Metabolism of 5-fluorouracil to a N-cholyl-2-fluoro-alanine conjugate: a novel role for bile acids in drug conjugation. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5439-5443 (1987)

Sweeny DJ, Martin M, Diasio RB. N-chenodeoxycholil-2-fluoro-alanine: a biliary metabolite of 5-fluorouracil in man. *Drug Metab Dispos* 16: 892-894 (1988)B

Taal BG, Van Tinteren H, Zoetmulder FA, NACCP group. Adjuvant 5-FU plus levamisole in colonic or rectal cancer: improved survival in stage II and III. *Br J Cancer* 85: 1437-1443 (2001)

Takebayashi Y, Akiyama S, Akiba S, et al. Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 88(16): 1110-1117 (1996)B

Takebayashi Y, Miyadera K, Akiyama S, et al. Expression of thymidine phosphorylase in human gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 87(3): 288-295 (1996)A

Takebayashi Y, Yamada K, Maruyama I, et al. The expression of thymidine phosphorylase and thrombomodulin in human colorectal carcinomas. *Cancer Lett* 92(1): 1-7 (1995)

Takechi T, Okabe H, Fujioka A, et al. Relationship between protein levels and gene expression of dihydropyrimidine dehydrogenase in human tumor cells during growth in culture and in nude mice. *Jpn J Cancer Res* 89(11): 1144-1153 (1998)

Takenoue T, Kitayama J, Takei Y, et al. Characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase on immunohistochemistry in colon carcinoma, and correlation between immunohistochemical score and protein level or messenger RNA expression. *Ann Oncol* 11: 273-279 (2000)

Takiguchi N, Ishii R, Koda K, et al. Thymidine phosphorylase expression correlates with malignant potential and anti-tumor effect of doxifluridine on gastric cancer: multivariate analysis for adjuvant chemotherapy doxifluridine vs. 5-fluorouracil. *Oncol Rep* 10(5): 1105-1111 (2003)

- Tanaka M, Yoshida, Saneyoshi M, Yamaguchi T. Utilization of 5-fluoro- 2'-deoxycytidine triphosphate in DNA synthesis by DNA polymerase and from calf thymus. *Cancer Res* 41: 4132-4135 (1981)
- Terashima M, Fujiwara H, Takagane A, et al. Role of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in tumour progression and sensitivity to doxifluridine in gastric cancer patients. *Eur J Cancer* 38(18): 2375-2381 (2002)
- Tono T, Hasuike Y, Ohzato H, et al. Limited but definite efficacy of prophylactic hepatic arterial infusion chemotherapy after curative resection of colorectal liver metastases: a randomized study. *Cancer* 88: 1549-1556 (2000)
- Tournigand C, Andre T, Achille E, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 22(2): 229-237 (2004)
- Ullman B, Lee M, Martin DW Jr, et al. Cytotoxicity of 5-fluoro-2'- deoxyuridine: requirement for reduced folate cofactors and antagonism by methotrexate. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 980-983 (1978)
- Ulrich C, Bigler J, Velicer C, et al. Searching expressed Sequence Tag Database: discovery and confirmation of a common polymorphism in the Thymidylate Synthase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 1381-1385 (2000)
- Van der Wilt CL, Kuiper CM, Peters GJ. Combination studies of antifolates with 5-fluorouracil in colon cancer cell lines. *Oncol Res* 11(8): 383- 391 (1999)
- Van der Wilt CL, Marinelli A, Pinedo HM, et al. The effect of different routes of administration of 5-fluorouracil on thymidylate synthase inhibition in the rat. *Eur J Cancer* 31A(5): 754-760 (1995)
- Van der Wilt CL, Pinedo HM, Smit K, Peters GJ. Elevation of thymidylate synthase following 5-fluorouracil treatment is prevented by the addition of leucovorin in murine colon tumors. *J Clin Oncol* 12: 2035-2042 (1994)
- Van Kuilenburg ABP, Van Lenthe H, Wanders RJ, Van Gennip AH. Subcellular localization of dihydropyrimidine dehydrogenase. *Biol Chem* 378: 1047-1053 (1997)A
- Van Kuilenburg ABP, Vreken P, Beex LVAM, et al. Heterozygosity for a point mutation in an invariant splice site donor of dihydropyrimidine dehydrogenase and severe 5-fluorouracil related toxicity. *Eur J Cancer* 33: 2258-2264 (1997)B
- Van Triest B, Peters GJ. Thymidylate synthase: a target for combination therapy and determinant of chemotherapeutic response in colorectal cancer. *Oncology* 57(3):179-194 (1999)

- Van Triest B, Pinedo HM, Giaccone G, Peters GJ. Downstream molecular determinants of response to 5-fluorouracil and antifolate thymidylate synthase inhibitors. *Ann Oncol* 11(4): 385-391 (2000)
- Vassey DA. The co-purification and common identity of choyl CoA:glycine and CoA:taurine-n-acyltransferase activities from bovine liver. *J Biol Chem* 254: 2059-2063 (1979)
- Villafranca E, Okruzhnov Y, Dominguez MA, et al. Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol* 19(6): 1779-1786 (2001)
- Vreken P, Van Kuilenburg AB, Meinsma R, *et al.* A point mutation in an invariant splice donor site leads to exon skipping in two unrelated Dutch patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *J Inher Metab Dis* 19: 645- 654 (1996)A
- Vreken P, Van Kuilenburg ABP, Meinsma R, et al. Identification of a four-base deletion (del TCAT 296-299) in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene with variable clinical expression. *Hum Genet* 100: 263-265 (1997)A
- Vreken P, Van Kuilenburg ABP, Meinsma R, Van Gennip AH. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: identification and expression of missense mutation C29R, R886H and R235W. *Hum Genet* 101: 333-338 (1997)B
- Vreken P, Van Kuilenburg ABP, Meinsma R, Van Gennip AH. Identification of novel point mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *J Inher Metab Dis* 19 (suppl. 1): 8-15 (1996)B
- Walliser S, Redmann K. Effect of 5-fluorouracil and thymidine on the transmembrane potential and zeta potential of HeLa cells. *Cancer Res* 38: 3555-3559 (1978)
- Wang FS, Aschele C, Sobrero A et al. Effect of polyglutamylation of 5,10-methylenetetrahydrofolate on the binding of 5-fluoro-2'-deoxyuridylate to thymidylate synthase purified from a human colon adenocarcinoma xenograft. *Cancer Res* 53: 3677-3680 (1993)
- Watanabe T, Wu T-T, Catalano PJ, et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 344(16): 1196- 1206 (2001)
- Wei X, McLoed HL, McMurrough J, et al. Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity. *J Clin Invest* 98: 610-615 (1996)

Welsh SJ, Titley J, Brunton L, et al. Comparison of thymidylate synthase (TS) protein up-regulation after exposure to TS inhibitors in normal and tumor cell lines and tissues. *Clin Cancer Res* 6(6): 2538-2546 (2000)

Wohlhueter RM, McIvar RS, Plageman PGW. Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. *J Cell Physiol* 104: 309-319 (1980)

Yamaue H, Tanimura H, Kono N, et al. Clinical efficacy of doxifluridine and correlation to in vitro sensitivity of anticancer drugs in patients with colorectal cancer. *Anticancer Res* 23(3B): 2559-2564 (2003)

Yokota H, Fernandez-Salguero P, Furuya H, et al. cDNA cloning and chromosome mapping of human dihydropyrimidine dehydrogenase, an enzyme associated with 5-fluorouracil toxicity and congenital thymine uraciluria. *J Biol Chem* 269: 23192-23196 (1994)

Yoshimura A, Kuwazuru Y, Furukawa T, et al. Purification and tissue distribution of human thymidine phosphorylase; high expression in lymphocytes, reticulocytes and tumors. *Biochim Biophys Acta* 1034(1): 107-113 (1990)

Yousef AM, Davis RA, Sicca RP, et al. Structural analysis of cDNA encoding thymidylate synthase in hepatic metastases of human colorectal tumors. *Int J Colorectal Dis* 16: 318-325 (2001)

Zaniboni A, Labianca R; Gruppo Italiano per lo Studio e la Cura dei Tumori del Digerente, GISCAD. Adjuvant therapy for stage II colon cancer: an elephant in the living room? *Ann Oncol* 15(9): 1310-1318 (2004)

Zhang SY, Shao SC, Johnson DG, Klein-Szanto AJP. E2F-1 gene transfer enhances invasiveness of human head and neck carcinoma cell lines. *Cancer Res* 60: 5972-5976 (2000)

Zimmerman M, Seidenberg J. Deoxyribosyl transfer. I. Thymidine phosphorylase and nucleoside deoxyribosyltransferase in normal and malignant tissues. *J Biol Chem* 239: 2618-2621 (1964)

Ringraziamenti

Desidero rivolgere un affettuoso ringraziamento al Dott. Paolo Simi per il suo aiuto indispensabile nel portare a termine la mia tesi ed alla sua equipe, in particolare un GRAZIE ad Angela ed Elena che mi hanno seguita con grande disponibilità, pazienza ed affetto, rendendo le mie giornate in laboratorio molto piacevoli.

Un ringraziamento al Dott. Antonello Di Paolo che mi ha permesso di crescere ed imparare molte cose in campo lavorativo: ho avuto le mie prime esperienze ed ho dovuto affrontare e superare le mie prime difficoltà, a volte riuscendo e a volte no, ma sicuramente acquisendo un grande bagaglio di cui fare tesoro per il futuro.

Ringrazio di cuore la Prof.ssa Maria Cristina Breschi ed il Prof. Romano Danesi, indispensabili punti di riferimento per l'aiuto che mi hanno dato, volgendosi sempre nei miei confronti con grande affetto e simpatia.

Un ringraziamento particolare al Prof. Aldo Balsamo ed al Prof. Daniele Bertini per i preziosi consigli e la disponibilità dimostratami.

Un grandissimo grazie alla mia famiglia, che mi è stata vicino e mi ha sostenuta nei momenti difficili dandomi la loro comprensione e tutto il loro affetto; un grazie alla mia mamma che ha sempre cercato di essere presente nel mio lavoro, un grazie a mio padre che mi ha dato preziosi consigli nel mio percorso di studi ed ha sempre accettato ed incoraggiato le mie scelte ed un grazie a Lavinia, la mia sorellina, che ha sempre cercato di farmi sorridere nei momenti più difficili.

Un grazie speciale, infine, alla persona che più di tutte mi è stata vicino in questi mesi, grazie, per la tua pazienza, per la tua presenza, per essere stato il mio “materasso” sul quale poter atterrare senza correre pericoli, grazie per i tuoi saggi consigli e per il tuo affetto che non mi hai fatto mancare mai.