



Azienda Ospedaliera "Maggiore della Carità"
Università degli studi del Piemonte Orientale
Divisione Universitaria di Radioterapia
Direttore Prof. Marco Krengli



Ruolo dei polimorfismi del DNA nucleare e mitocondriale nello sviluppo di tossicità sottocutanea e cutanea tardiva radioindotta in pazienti affette da tumore mammario radiotrattate dopo chirurgia conservativa

Laura Donis^a, Salvatore Terrazzino^b, Letizia Deantonio^c, Laura Masini^a, Giuseppina Gambaro^a, Armando Genazzani^b, Marco Krengli^c

^bDiSCAFF e Centro di Ricerca Interdipartimentale di Farmacogenetica e Farmacogenomica (CRIFF), ^cDipartimento di Medicina Traslazionale, ^cUniversità degli studi del Piemonte Orientale, Novara.

^aRadioterapia A.O.U. "Maggiore della Carità", Novara.

La diversa suscettibilità dei tessuti sani al danno radioindotto ha una genesi multifattoriale, dipende da:

- ✓ caratteristiche di trattamento (dose totale, frazionamento, tecnica)^{1,2}
- ✓ fattori clinici³
- ✓ componenti genetiche



Radiotherapy and Oncology 103 (2012) 199–205

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Radiotherapy and Oncology

journal homepage: www.thegreenjournal.com

Genetic prediction of RT induced morbidity

Common variants of eNOS and XRCC1 genes may predict acute skin toxicity in breast cancer patients receiving radiotherapy after breast conserving surgery

Salvatore Terrazzino^a, Pierdaniele La Mattina^b, Laura Masini^b, Tina Caltavuturo^b, Giuseppina Gambaro^b, Pier Luigi Canonico^a, Armando A. Genazzani^a, Marco Krengli^{b,*}

1 -Turesson I et al. Prognostic factors for acute and late skin reactions in radiotherapy patients. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1996;36:1065e1075.

2- Hill RP,et al. Normal tissue radiobiology:From the laboratory to the clinic. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2001;49:353e365.

3- Lilla C et al. Predictive factors for late normal tissue complications following radiotherapy for breast cancer.Breast Cancer Res Treat 2007;106:143e150.

Componenti genetiche

✓ Radiosensibilità dei tessuti sani nucleotidici del DNA nucleare (SNPs) → effetto combinato di polimorfismi

Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes

Christian Nicolaj Andreassen^{a,*}, Jan Alsner^a, Marie Overgaard^b, Jens Overgaard^a

^aDepartment of Experimental Clinical Oncology, Aarhus University Hospital, Noerrebrogade 44, Aarhus C DK 8000, Denmark

^bDepartment of Oncology, Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark

Received 11 July 2003; received in revised form 11 September 2003; accepted 18 September 2003

✓ Radiosensibilità dei tessuti sani → effetto combinato di polimorfismi nucleotidici del DNA mitocondriale (disfunzioni della respirazione mitocondriale possono aumentare la produzione di specie reattive dell'ossigeno)

Involvement of Mitochondrial DNA Sequence Variations and Respiratory Activity in Late Complications following Radiotherapy

Ghazi A. Alsbeih, Najla M. Al-Harbi, Medhat M. El-Sebaie, et al.

Clin Cancer Res 2009;15:7352-7360. Published OnlineFirst November 17, 2009.

Radiogenomics

Radiotherapy and Oncology 111 (2014) 199–205

Evaluating the role of mitochondrial DNA variation to the genetic predisposition to radiation-induced toxicity



Laura Fachal^a, Ana Mosquera-Miguel^b, Antonio Gómez-Caamaño^c, Manuel Sánchez-García^d, Patricia Calvo^c, Ramón Lobato-Busto^d, Antonio Salas^{b,*}, Ana Vega^{a,*}

Clinical Investigation: Breast Cancer

International Journal of
Radiation Oncology
biology • physics

www.ijrojournal.org

Common Variants of GSTP1, GSTA1, and TGFβ1 are Associated With the Risk of Radiation-Induced Fibrosis in Breast Cancer Patients

Salvatore Terrazzino, Ph.D.,* Pierdaniele La Mattina, M.D.,[†]
Giuseppina Gambaro, M.D.,[†] Laura Masini, M.D.,[†] Pierfrancesco Franco, M.D.,[†]
Pier Luigi Canonico, M.D.,* Armando A. Genazzani, M.D.,* and Marco Krengli, M.D.[†]

*DISCAFF and Centro di Ricerca Interdipartimentale di Farmacogenetica e Farmacogenomica, [†]DMCS and BRMA,
University of Piemonte Orientale "Avogadro"; and [†]Department of Radiotherapy, University Hospital Maggiore della
Carità, Novara, Italy

Received Mar 17, 2011, and in revised form Jun 8, 2011. Accepted for publication Jun 29, 2011

- ✓ Studio condotto in collaborazione con il dipartimento di Scienze del Farmaco
- ✓ Individuazione di correlazione tra polimorfismi genici (considerati anche in associazione tra loro) e tossicità cutanea-sottocutanea tardiva radioindotta in pazienti affette da carcinoma mammario sottoposte a radioterapia adiuvante

- ✓ periodo tra 1989 e 2009
- ✓ 257 pazienti
- ✓ valutazione tossicità cutanea e sottocutanea tardiva (con riferimento a scala LENT-SOMA)
- ✓ FUP mediano 63 mesi (range 9-222) in corso di aggiornamento (Fup minimo 28 mesi)
- ✓ 2 gruppi: pz con tossicità tardiva moderata/severa e pz con tossicità tardiva assente o lieve



Gruppo tossicità G2 e G3: 41 pazienti
Gruppo tossicità G0 e G1: 196 pazienti

Gene	Polimorfismo	Funzione gene
XRCC1	R194W ed R399Q	Meccanismi riparazione DNA
TP53	rs1042522G>C	Meccanismi riparazione DNA
GSTP1	I105V	Risposta stress ossidativo
eNOS	894G>T	Risposta stress ossidativo
GSTA1	-69C>T	Risposta stress ossidativo
TGFβ1	869T>C e -509C>T	Proliferazione e differenziazione fibroblasti

Polimorfismo	Fibrosi Grado 0-1 n (%)	Fibrosi Grado 2-3 n (%)	Odds ratio	P value
XRCC1 Arg399Gln Arg/Arg Arg/Gln+Gln/Gln	77(39.3) 119(60.7)	18(43.9) 23(56.1)	1(Ref) 0.843	0.679
XRCC1 Arg194trp Arg/Arg Arg/Trp+Trp/Trp	173 (88.3) 23(11.7)	36(87.8) 5(12.2)	1(Ref) 1.279	0.692
GSTP1ILE105Val AA AG+GG	95(48.5) 101(51.5)	13(31.7) 28(68.3)	1(Ref) 2.756	0.018
GSTA1 C-69T CC CT+TT	59(30.1) 137(69.9)	8(19.5) 33(80.5)	1(Ref) 3.223	0.022
ENOS G894T GG GT+TT	76(38.8) 120(61.2)	21(51.2) 20(48.8)	1(Ref) 0.478	0.071
TGFβ1 C-509T CC CT+TT	85(43.4) 111(56.6)	18(43.9) 23(56.1)	1(Ref) 1.841	0.313
TGFβ1 T869C TT TC+CC	71(36.2) 125(63.8)	19(46.3) 22(53.7)	1(Ref) 0.295	0.043
TP53 Arg72Pro Arg/Arg Arg/Pro+Pro/Pro	110(56.1) 86(43.9)	29(70.7) 12(29.3)	1(Ref) 0.654	0.343

Polimorfismo	Fibrosi Grado 0-1 n (%)	Fibrosi Grado 2-3 n (%)	Odds ratio	P value
XRCC1 Arg399Gln Arg/Arg Arg/Gln+Gln/Gln	77(39.3) 119(60.7)	18(43.9) 23(56.1)	1(Ref) 0.843	0.679
XRCC1 Arg194trp Arg/Arg Arg/Trp+Trp/Trp	173 (88.3) 23(11.7)	36(87.8) 5(12.2)	1(Ref) 1.279	0.692
GSTP1 ILE105Val AA AG+GG	95(48.5) 101(51.5)	13(31.7) 28(68.3)	1(Ref) 2.756	0.018
GSTA1 C-69T CC CT+TT	59(30.1) 137(69.9)	8(19.5) 33(80.5)	1(Ref) 3.223	0.022
ENOS G894T GG GT+TT	76(38.8) 120(61.2)			0.071
TGFβ1 C-509T CC CT+TT	85(43.4) 111(56.6)			0.313
TGFβ1 T869C TT TC+CC	71(36.2) 125(63.8)	19(46.3) 22(53.7)	1(Ref) 0.295	0.043
TP53 Arg72Pro Arg/Arg Arg/Pro+Pro/Pro	110(56.1) 86(43.9)	29(70.7) 12(29.3)	1(Ref) 0.654	0.343

Le pazienti portatrici dell'allele 105Val sul gene GSTP1 e dell'allele -69T sul gene GSTA1 sono a più alto rischio di sviluppare fibrosi sottocutanea radioindotta

Polimorfismo	Fibrosi Grado 0-1 n (%)	Fibrosi Grado 2-3 n (%)	Odds ratio	P value
XRCC1 Arg399Gln Arg/Arg Arg/Gln+Gln/Gln	77(39.3) 119(60.7)	18(43.9) 23(56.1)	1(Ref) 0.843	0.679
XRCC1 Arg194trp Arg/Arg Arg/Trp+Trp/Trp	173 (88.3) 23(11.7)	36(87.8) 5(12.2)	1(Ref) 1.279	0.692
GSTP1ILE105Val AA AG+GG	95(48.5) 101(51.5)	13(31.7) 28(68.3)	1(Ref) 2.756	0.018
GSTA1 C-69T CC CT+TT	59(30.1) 137(69.9)	8(19.5) 33(80.5)	1(Ref) 3.223	0.022
ENOS G894T GG GT+TT	76(30.8) 120(48.8)	13(5.2) 23(9.2)	1(Ref) 0.295	0.071
TGFβ1 C-509T CC CT+TT	85(40.9) 111(56.6)	23(56.1)	1.841	0.313
TGFβ1 T869C TT TC+CC	71(36.2) 125(63.8)	19(46.3) 22(53.7)	1(Ref) 0.295	0.043
TP53 Arg72Pro Arg/Arg Arg/Pro+Pro/Pro	110(56.1) 86(43.9)	29(70.7) 12(29.3)	1(Ref) 0.654	0.343

Le pazienti portatrici dell'allele 869C sul gene TGFβ1 sono a più basso rischio di sviluppare fibrosi sottocutanea radioindotta

Polimorfismo	Fibrosi Grado 0-1 n (%)	Fibrosi Grado 2-3 n (%)	Odds ratio	P value
XRCC1 Arg399Gln Arg/Arg Arg/Gln+Gln/Gln	77(39.3) 119(60.7)	18(43.9) 23(56.1)	1(Ref) 0.843	0.679
XRCC1 Arg194trp Arg/Arg Arg/Trp+Trp/Trp	173 (88.3) 23(11.7)	36(87.8) 5(12.2)	1(Ref) 1.279	0.692
GSTP1ILE105Val AA AG+GG	95(48.5) 101(51.5)	13(31.7) 28(68.3)	1(Ref) 2.756	0.018
GSTA1 C-69T CC CT+TT	59(30.0) 137(69.9)			0.022
ENOS G894T GG GT+TT	76(38.0) 120(61.9)			0.071
TGFβ1 C-509T CC CT+TT	85(43.4) 111(56.6)	18(43.9) 23(56.1)	1(Ref) 1.841	0.313
TGFβ1 T869C TT TC+CC	71(36.2) 125(63.8)	19(46.3) 22(53.7)	1(Ref) 0.295	0.043
TP53 Arg72Pro Arg/Arg Arg/Pro+Pro/Pro	110(56.1) 86(43.9)	29(70.7) 12(29.3)	1(Ref) 0.654	0.343

Le portatrici dei 3 genotipi di rischio hanno un rischio maggiore di sviluppare fibrosi post attinica di grado 2 e 3 rispetto alle portatrici di 2 genotipi di rischio (**p=0.005**) o rispetto alle portatrici di uno o nessun genotipo di rischio (**p=0.0003**)

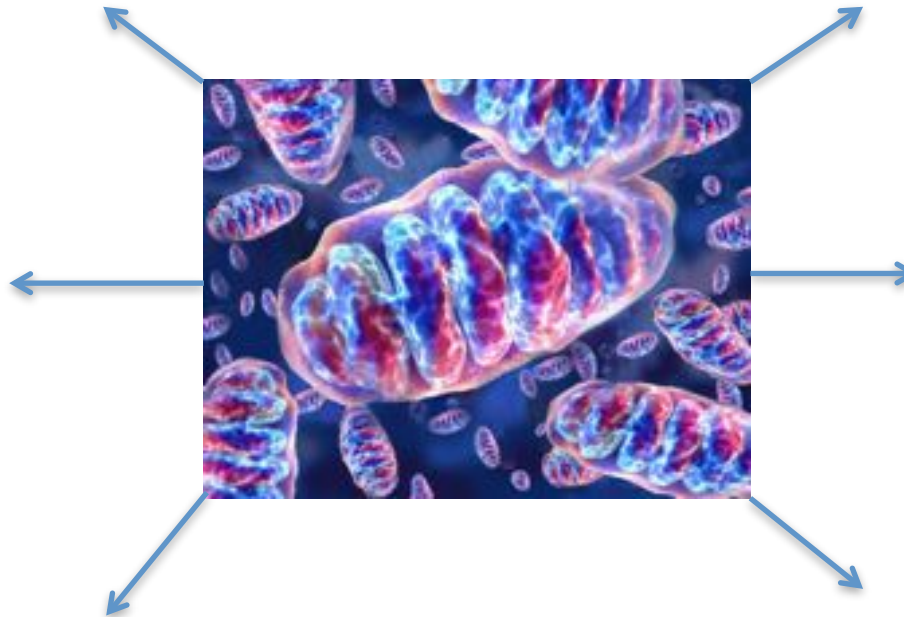
CORRELAZIONE TRA POLIMORFISMI DEL DNA MITOCONDRIALE (mDNA) E TOSSICITA' CUTANEA-SOTTOCUTANEA TARDIVA RADIOINDOTTA

- 288 pazienti arruolate
- diagnosi di carcinoma mammario
- quadrantectomia e radioterapia adiuvante

-valutazione tossicità radioindotta cutanea e sottocutanea tardiva

-polimorfismi in corso di analisi:

- G4580A
- C7028T
- G9055A
- A10398G
- A12308G
- G13368A
- G13708A
- G16391A



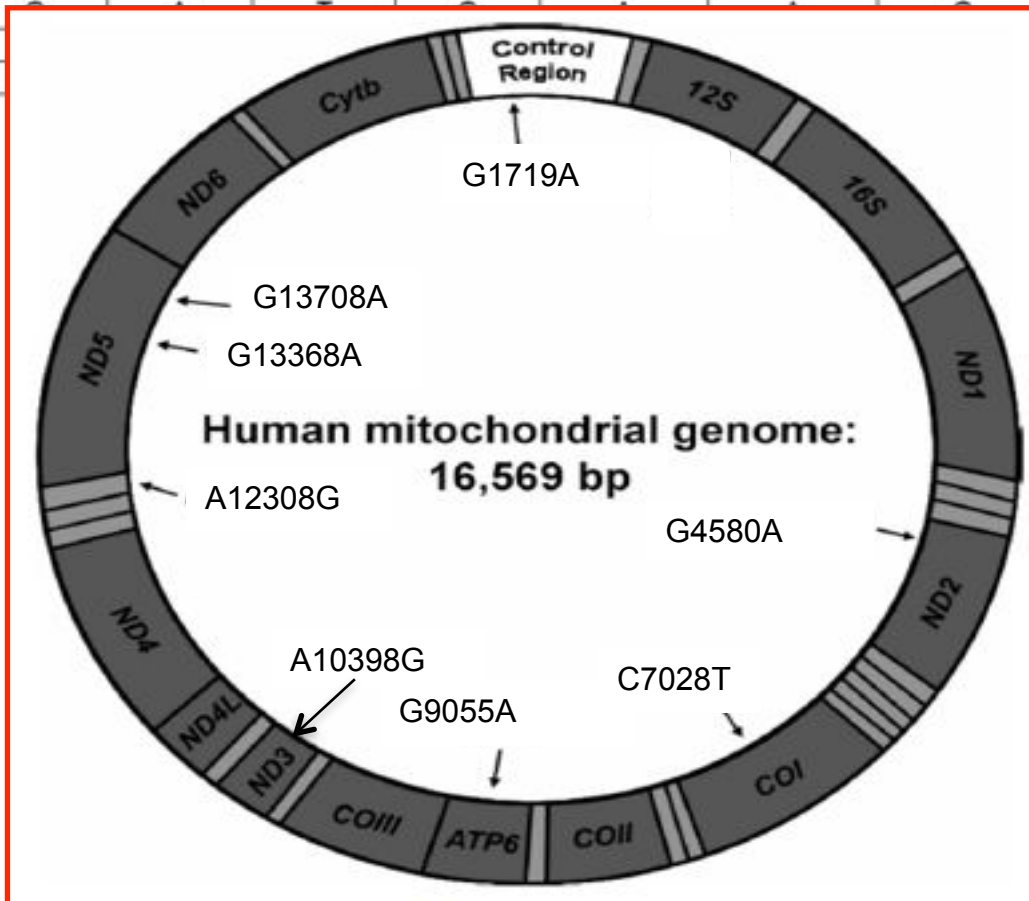
-periodo tra 1989 e 2010

-follow up mediano 90 mesi

-prelievo di sangue periferico, conservato in frigorifero a 4°C fino all'analisi

HAPLO GROUP	G1719A	G4580A	C7028T	G9055A	A10398G	A12308G	G13368A	G13708A
H	G	G	C	G	A	A	G	G
I	A	G	T	G	G	A	G	G
J	G	G	T	G	G	A	G	A
K	G	G	T	A	G	G	G	G
T	G	G	T	G	A	A	A	G
U	G	G	T	G	A	G	G	G
V								G
W								G
X								G

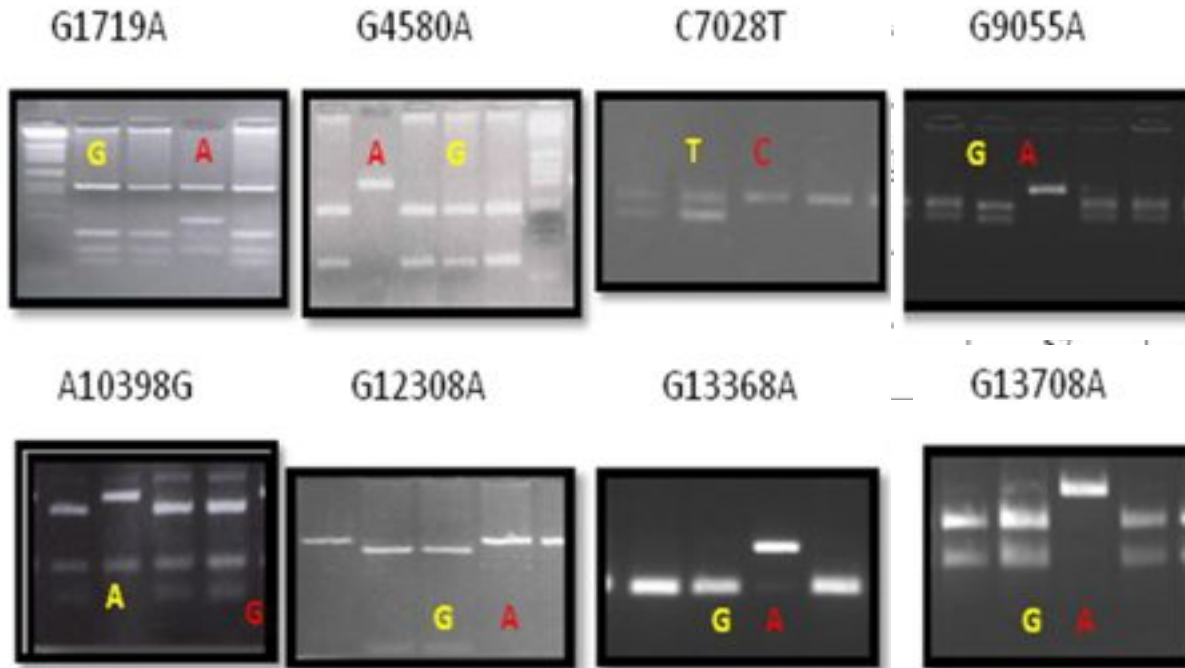
Aplogruppi che rappresentano il 95% della popolazione caucasica



m D N A : D N A circolare presente in più copie all'interno dei mitocondri

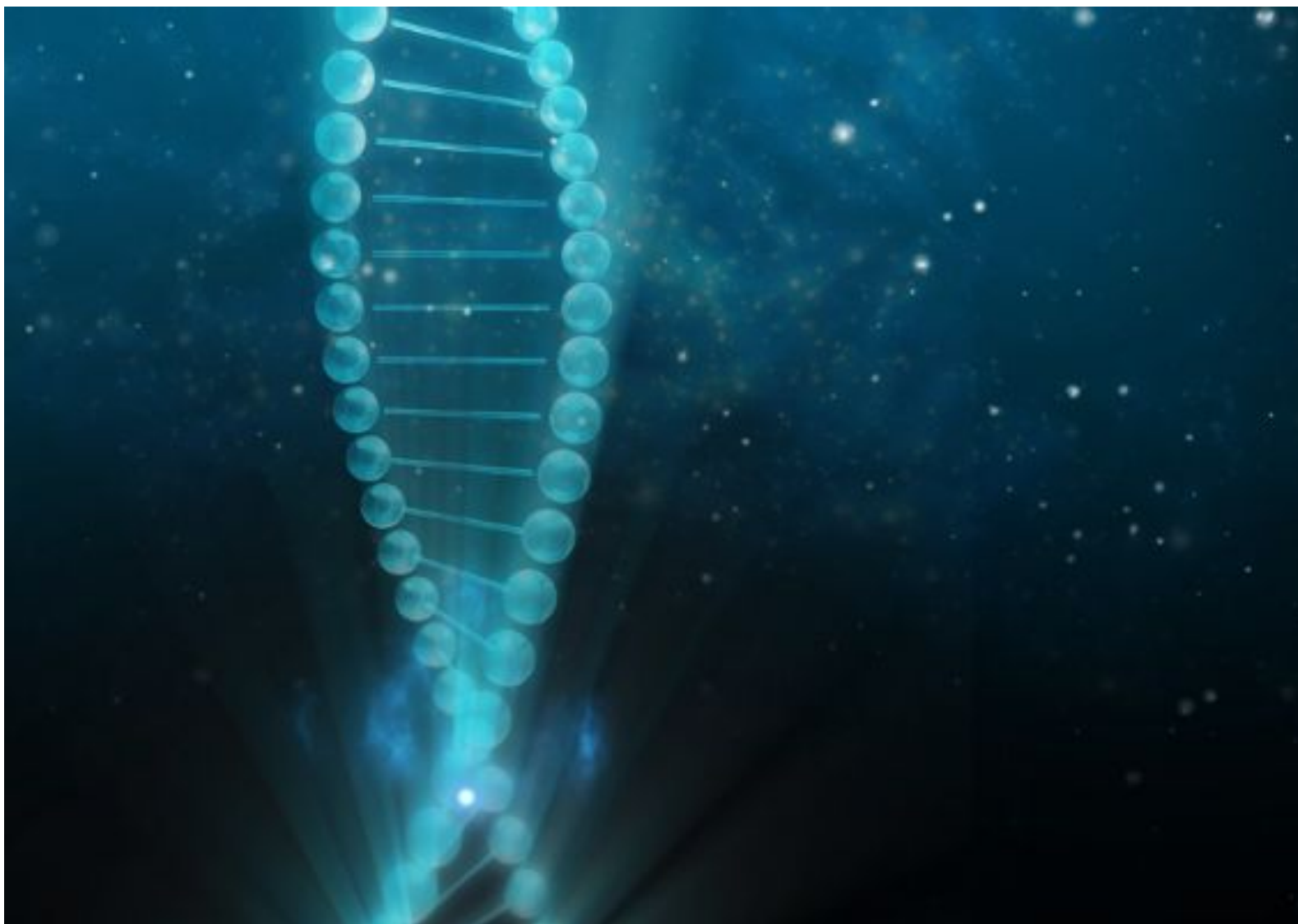
- Genotipizzazione eseguita mediante PCR seguita da digestione con enzimi di restrizione (PCR-RFLP)

Polymorphism	PCR – Primers Forward/Reverse	Annealing (°C)	Restriction enzyme	Allele sizes (base pairs)
G1719A	TCACCCTCCTCAAGTATACTCA ATTGGGTAAATGGTTTGGC	58	<i>DdeI</i>	G:148+79+23 A:148+102
G4580A	ACCTATCACACCCCATCTAAA AGGATTATGGATGCGGTT	60	<i>NheI</i>	G:200+100 A:300
			<i>HuI</i>	C:156+152 T:152+126+30
			<i>HaeI</i>	G:185+115 A:300
			<i>XbaI</i>	A:205+68 G:167+68+38
			<i>HinfI</i>	A:134 G:109+25
			<i>HpaI</i>	G:137+127 A:264
			<i>HhaI</i>	G:197+121 A:318



- Prodotti della digestione enzimatica separati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio (2-4%)

- le variazioni dei geni coinvolti nella risposta allo stress ossidativo e nella proliferazione dei fibroblasti possono modulare lo sviluppo della fibrosi radioindotta nelle pazienti affette da carcinoma mammario
- la combinazione di diversi markers genetici può meglio predire la radiosensibilità dei tessuti sani rispetto all'approccio per singolo gene candidato
- il completamento dei presenti risultati con lo studio dei polimorfismi del mtDNA può contribuire a fornire informazioni più complete sulle basi genetiche della risposta tardiva dei tessuti sani alla radioterapia



Grazie per l'attenzione