Innovazioni tecnologiche e organizzative applicate alla medicina molecolare predittiva

S. Ursia, G. Vitulloa, S. Materaa, M.R. Flaccoa, A. Poliandrib, A. Di Muzioc, C. Di Iorioa, E. Toniatoa, S. Martinottia

^aUnità di Medicina Predittiva e Diagnostica Molecolare, Laboratorio Patologia Clinica II, Azienda Clinicizzata ASL-Università "G. D'Annunzio", Chieti ^bDipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi, Aquila ^cBiotecnologie, Università degli Studi, Aquila

Riassunto

Il progetto genoma umano, portato a termine nel 2003, ha reso disponibile alla comunità scientifica mondiale la sequenza genetica di 3.164.700.000 di paia di basi condivisa al 99,9% da tutti gli individui. Le differenze fra individui sono costituite, per la maggior parte, da polimorfismi nucleotidici, da numerosi cambiamenti di una singola base ovvero SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) nel DNA.

In campo clinico, le nuove conoscenze relative al genoma umano hanno consentito il consolidarsi di un nuovo sistema della medicina, in particolare nella cosiddetta "Medicina Predittiva". Si tratta di un approccio che, basandosi sulle informazioni ricavabili dalla costituzione genetica individuale, può anticipare una stima del rischio di sviluppare una determinata patologia durante la vita.

L'interesse per la componente genetica della suscettibilità a malattie complesse sta assumendo sempre più interesse nella medicina moderna, in quanto consente di evidenziare il ruolo di alcuni polimorfismi genetici relativamente comuni ma che, combinati tra loro e insieme a specifiche componenti ambientali, possono aumentare notevolmente il rischio di sviluppare patologie cardiovascolari ed oncologiche.

Summary

Technological and organizational innovations applied to molecular predictive medicine

The human genome project, completed in 2003, has delivered to the international scientific community the genetic sequence of 3.164.700.000 pairs of bases almost completely (99.9%) shared by all the individuals. Most of the differences among individuals are constituted by nucleotide polymorphism, several changes of a single base SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) in the DNA. In medical field, the new data about the human genome allowed the consolidation of a new dimension of the medicine, in particular the so-called "Predictive Medicine". It is, in practice, about an approach that, being based on the information obtened from the genetic constitution that characterize the individual, can anticipate the risk to develop a particular pathology during the life. The interest to the genetic component of the susceptibility to complex diseases is assuming more and more importance in the modern medicine, since not only it reveals the role of relatively common genetic polimorphism but also, associated with each other and with specific environmental components, can highly increase the risk to develop cardiovascular and oncologi-

Key-words: technological innovations, microarray, PCR Real-Time, Taq-Man.

Introduzione

Il progetto genoma umano, portato a termine nel 2003, ha consegnato alla comunità scientifica mondiale una sequenza genetica di circa 3 miliardi e 200 milioni di paia di basi condivisa al 99.9% da tutti gli individui. Le differenze fra individui sono costituite, per la maggior parte, da polimorfismi nucleotidici, numerosi cambiamenti di una singola base nel DNA.

In campo medico, le nuove conoscenze sul genoma umano hanno consentito il consolidarsi di una nuova dimensione della medicina, in particolare di un settore definito come "Medicina Predittiva"; si tratta, in buona sostanza, di un approccio che, basandosi sulle informazioni ricavabili dalla costituzione genetica individuale, può anticipare una stima del rischio di sviluppare una determinata patologia durante il corso della vita.

Ricevuto: 31-07-2009 Pubblicato on-line: 16-09-2009

L'interesse per la componente genetica della suscettibilità a malattie complesse sta assumendo sempre più importanza nella medicina moderna, in quanto si sta mettendo in evidenza il ruolo di alcuni polimorfismi genetici relativamente comuni ma che, associati tra loro e combinati con specifiche componenti ambientali, possono elevare notevolmente il rischio di sviluppare patologie come malattie Cardiovascolari ed Oncologiche.

Inoltre lo studio dell'assetto genetico è in grado di ottimizzare un approccio corretto all'uso dei farmaci:

 Fenotipo predittivo di classi metaboliche in base al pattern allelico.

Con il procedere delle conoscenze dei meccanismi molecolari dei vari processi biologici e delle caratteristiche dei geni che codificano per i fattori che intervengono in questi processi, crescono le possibilità di utilizzare questi fattori come biofarmaci o identificare nuovi bersagli per farmaci, che, con il passare del tempo, aumenteranno di numero in modo esponenziale.

Riassumendo con uno slogan si potrà dire che si va verso la cultura de: "il farmaco giusto al paziente giusto".

Oggi tutto questo è possibile grazie ad innovazioni tecnologiche e ai principi tecnici delle più recenti tecnologie avanzate: Microarray, Real-time PCR, Microfluidcard utili al consolidamento dipartimentale di Laboratori altamente specializzati nelle unità di Medicina Molecolare predittiva.

Malattia cardiovascolare

Con il termine di malattie cardiovascolari si intendono, genericamente, tutte le patologie che interessano il cuore e le arterie.

Le malattie cardiovascolari interessano il cuore e i vasi sanguigni adiacenti e possono assumere varie forme: ipertensione, coronaropatie, disfunzioni cardiache e infarto. Le malattie cardiovascolari rappresentano la prima causa di morte nell'Unione europea e sono all'origine del 40% circa dei decessi, per un totale di 2 milioni all'anno. L' impegno finanziario per i sistemi sanitari dell'UE legato a questo gruppo di patologie è stato stimato a poco meno di 110 miliardi di euro nel 2006. Ciò equivale ad un costo pro capite di 223 euro all'anno, pari a circa il 10% della spesa sanitaria complessiva in tutta l'UE. Le malattie cardiovascolari sono inoltre una delle principali cause di infermità di lunga durata e di abbandono del mercato del lavoro. Dipendono in larga misura dalle condizioni sociali, e la loro diversa incidenza costituisce la principale causa di disparità in campo sanitario all'interno degli Stati membri e tra di loro. Oggi è possibile identificare i pazienti che hanno una maggiore probabilità di essere colpiti da una patologia cardiovascolare. Tra le principali cause o fattori di rischio un ruolo di primaria importanza è giocato da: età, sesso maschile, familiarità per cardiopatia ischemica, diabete mellito, ipertensione arteriosa, ipercolesterolemia, il fumo e lo stress, la sedentarietà o, più in generale, lo "stile di vita". Tali fattori di rischio, tuttavia, non sono sufficienti, da soli, a spiegare tutti i casi di infarto che si manifestano in individui apparentemente non a rischio.

Per questa ragione la ricerca e gli studi clinici si sono rivolti verso l'individuazione di nuovi markers, sia legati ai vari cicli metabolici (emocoagulativi e infiammatori) che a livello genico, al fine dell'individuazione di un'eventuale predisposizione genetica allo sviluppo di una patologia cardiovascolare (Tab. I).

Malattia oncologica

Il tumore riconosce sempre un'origine monoclonale, ovvero si sviluppa a partire da una singola cellula che, esposta a un agente mutageno, subisce un danneggiamento irreversibile del proprio DNA. Il tumore non si sviluppa in una sola fase, occorrono in genere migliaia di mutazioni che interessano i geni deputati al controllo di alcune funzioni cellulari. I principali geni coinvolti nella formazione del tumore sono di 2 tipi:

- i geni oncosoppressori. La cellula è in grado di riparare i danni del DNA, e lo fa utilizzando specifici geni, chiamati oncosoppressori proprio perché in grado di bloccare la formazione di una cellula tumorale per errori di sequenza. Se questi geni vengono mutati e la cellula non è più in grado di difendersi dalle alterazioni del DNA, aumentano le probabilità della formazione di una cellula tumorale.
- i proto-oncogeni o oncogeni. Sono i geni che controllano la proliferazione cellulare, che di norma vengono attivati e disattivati in funzione di ben determinati stimoli proliferativi. Se viene meno questo controllo a causa di una mutazione genica, la cellula inizia a proliferare senza controllo. Questi geni sono chiamati proto-oncogeni perché favoriscono attivamente la formazione del tumore. Attualmente sono stati individuati diversi geni che risultano mutati nella stragrande maggioranza dei tumori.

I tumori non si formano dall'oggi al domani, ma con un processo di trasformazione genetico progressivo in cui le mutazioni si accumulano nel tempo e trasformano gradualmente la cellula.

La ricerca ha evidenziato che nessun tumore si forma per la mutazione di un solo gene, ma quasi sempre in seguito a modificazioni multiple che comportano l'attivazione di diversi geni proto-oncogeni e la perdita di più geni oncosoppressori.

Affinché una cellula venga trasformata in cellula neoplastica deve subire 2 processi: l'iniziazione e la promozione.

Un esempio in tal senso è fornito dal cancro del colonretto, una delle principali cause di morte per tumore sia tra la popolazione maschile che quella femminile.

Negli ultimi anni è stato stimato nei paesi occidentali che più di 60 nuovi casi vengono diagnosticati ogni 100.000 abitanti con una mortalità nel nostro paese di circa 20.000 persone ogni anno. Tra le procedure di intervento clinico ovviamente la resezione chirurgica rimane il più efficace trattamento, benché circa il 30% dei casi appaia recidivante ed estremamente resistente al trattamento combinato chemio-farmacologico.

In aggiunta una grande percentuale di pazienti muore in conseguenza del processo di metastatizzazione nonostante il buon successo delle resezioni chirurgiche sul tumore primario.

Almeno due tipi di cancro del colon rettale hanno un'origine genetica: la poliposi familiare (FAP) e il tumore colon rettale ereditario senza poliposi (sindrome di Lynch o HNPCC). I progressi della medicina molecolare sono in procinto di fornire i markers idonei per uno screening dei soggetti asintomatici il che permetterà di individuare i pa-

Tabella I. Piattaforma d'indagine di polimorfismi ad interesse per aterosclerosi e metabolismo lipidi.

ELENCO GENI E VARIANTI GENICHE DI INTERESSE PREDITTIVO CARDIOVASCOLARE

GENE	VARIANTE	RUOLO GENE NELLA PATOLOGIA CARDIOVASCOLARE
APOA1	-75 G>A	
APOC3	T3175G	
APOE	CYS112ARG	ATEROSCLEROSI E METABOLISMO DEI LIPIDI
CX37	PRO319SER	
LPL	1595C>G	
MMP3	-1171 5A>6A	
COX2	-765 G>C	
FAC II	3'UTR 20210G>A	
FACV	1691G>A (LEIDEN) HIS1299ARG Y1702C	TROMBOFILIA VENOSA
FGB	-455G>A	
PAI-1	1bp Del\Ins 4G\5G	
ACE	I\D intron 16	
AGT	M235T	IPERTENSIONE
CBS	699C>T	
	1080T>C	
MTHFR	677C>T	METABOLISMO DELL'HCY
	1298A>C	
MTR	2756A>G	
IL-1B	-511 C>T	
IL-6	-634 G>C-	
	174 G>C	RISPOSTA INFIAMMATORIA
IL-10	-1082 G>A	
$\text{TNF}\alpha$	-308 G>A	
VEGF	-2578 C>A	

zienti a rischio. L'eterogeneità genetica costringe a dosare molti markers molecolari (Tab. II) e, talora, a valutare lo stato di metilazione dei geni cosiddetti repair (riparatori dei danni al DNA). Da alcuni anni disponiamo di nuove tecnologie, cosiddette avanzate, con le quali sarà possibile ottenere, per ciascun paziente, un'immagine complessiva e talora personalizzata della condizione di rischio. Questo si attuerà, sia a scopo preventivo-predittivo, mediante lo studio della propensione individuale verso lo sviluppo della patologia del CCR, sia ai fini della valutazione dello stato di malattia (follow up).

Fenotipo predittivo di classi metaboliche in base al pattern allelico

La variabilità genetica condiziona la suscettibilità a sviluppare eventi avversi ai farmaci e influenza sia la farmacocinetica con la biodisponibilità che la farmacodinamica con il bersaglio terapeutico.

L'analisi del metabolismo dei farmaci passa attraverso lo studio dei geni del citocromo CYP450 che comprende una famiglia di circa 60 geni codificanti per enzimi epatici responsabili del metabolismo del 75% dei farmaci comunemente prescritti, (in particolare enzimi CYP3A4-

CYP2DS) (Evans & Realing, Science 1999).

Un problema rilevante presente nella gestione del trattamento farmacologico in campo oncologico è la significativa variabilità interindividuale relativamente a tossicità ed efficacia associate alla terapia. Numerosi studi hanno evidenziato una diversa suscettibilità all'effetto tossico di un dato agente chemioterapico in pazienti sottoposti allo stesso dosaggio o una diversa sensibilità allo stesso agente in pazienti clinicamente omogenei. Tutto ciò, oltre a determinare una potenziale inadeguatezza nell'assistenza fornita al malato, può aggravare il carico economico associato alla gestione del paziente oncologico

Le varianti genetiche prese in considerazione dalla farmacogenetica sono i polimorfismi genici, ovvero alterazioni stabili nella sequenza del DNA, che interessano più dell'1% della popolazione. Il tipo più semplice e diffuso di polimorfismo coinvolge un unico nucleotide (SNP), altre variazioni genetiche sono rappresentate da inserzioni, delezioni e variazioni nel numero di *tandem repeats* (mini/microsatalliti). Tali polimorfismi, sia pure non responsabili di rischio di malattia, possono evidenziare differenze interindividuali in situazioni di particolare stress.

Tra queste l'esposizione ad agenti chemioterapici, qualo-

Tabella II. Pannello d'indagine di polimorfismi (SNPs e delezioni-inserzioni) predittivi e prognostici responsabili del 85% della patologia sporadica del Carcinoma del Colon Retto.

PROGNOSTICO CANCRO COLON RETTO				
GENE	VARIANTE	RUOLO DEL GENI		
	1338			
	876			
	1306			
	1309			
	1367			
APC	1378	ONCOSOPPRESSORE		
	1379			
	1309 5del			
	1450			
	1312			
	1465 2del			
	1554 1ins			
	175.2RH			
	245.1GS			
	245.2GV			
P53	248.1RW	ONCOSOPPRESSORE		
	248.2RQ			
	273.1RC			
	273.2RH			
	282.1RW			
	12 GR			
	12 GC			
	12 GS	PROTOONCOGENE		
K RAS	12. 2GA			
	12 2GD			
	12 2GV			
	13 2GD			
BRAF	599 2VE	PROTOONCOGENE		
	600 2VE			
CONTRACTOR OF THE STATE OF THE				

ra le alterazioni genetiche in questione vadano a modificare la funzionalità e/o l'espressione di proteine coinvolte nella cascata di eventi (trasporto, metabolismo e meccanismo d'azione), di cui è protagonista il farmaco impiegato. Diversi studi pubblicati negli ultimi anni nella letteratura scientifica internazionale hanno evidenziato e confermato come alcuni polimorfismi genici, con un effetto fenotipico ben definito sulla proteina codificata, possano assumere un ruolo predittivo clinicamente rilevante sull'esito della

chemioterapia sia in termini di tossicità che di risposta.

Innovazioni tecnologiche

Microarray

È costituito da una collezione di microscopiche sonde di DNA attaccate ad una superficie solida come vetro, plastica o silicio. Tali array (schiera, spiegamento) sono usati per esaminare il profilo d'espressione di un gene o per identificare la presenza di un gene o di una breve sequenza

in una miscela di migliaia di geni.

I microarray sfruttano la tecnica di ibridazione inversa, consiste cioè nel fissare tutti i probe (sonde) su un supporto e nel marcare invece l'acido nucleico target. È una tecnica che è stata sviluppata negli anni '90, oggi permette l'analisi dell'espressione genica monitorando in una sola volta gli RNA prodotti da migliaia di geni. Per studiare gli mRNA, essi vengono prima estratti dalle cellule, convertiti in cDNA, con l'uso di un enzima chiamato transcriptasi inversa e allo stesso momento marcati con una sonda fluorescente. Quando avviene l'ibridazione fra la sonda presente sulla matrice, o spot, e il cDNA target, quest'ultimo rimane legato alla sonda e può essere identificato semplicemente rilevando la posizione dove è rimasto legato. Le principali applicazioni dei microarray sono:

- l'analisi dell'espressione genica o profilo dell'espressione di geni;
- l'analisi dei polimorfismi;
- · l'analisi farmacogenomica;
- l'analisi di confronto di popolazioni di RNA di cellule diverse e l'utilizzo per nuove metodologie di sequenziamento DNA.

Con questa tecnologia si possono avere decine di migliaia di risultati in pochissimo tempo. Per tale motivo si è verificata una notevole accelerazione in diversi campi di investigazione biochimico e biotecnologico.

La gestione e l'interpretazione dell'enorme quantità di dati generata dalle matrici ad alta densità rappresentano un aspetto fondamentale di questa tecnologia. Infatti, la loro applicazione nello studio dei profili dell'espressione genica produce volumi di informazioni tali da limitare l'applicazione delle tecniche modellistiche classiche. Tali tecniche non sono generalmente applicabili in maniera soddisfacente alla presenza di sistemi poco caratterizzanti e descritti da quantità grandissime di dati. È necessario, quindi, avere a disposizione tutta una serie di tecniche computazionali capaci di gestire ed interpretare questi enormi database nonché di interfacciarsi con gli strumenti bioinformatici per l'analisi funzionale (database mining).

Si definiscono tecniche di database mining tutta una serie di strumenti informatici per l'esplorazione e l'analisi di grandi quantità di dati al fine di estrarre motivi caratteristici e persistenti (patterns) (schemi) e regole. Gli algoritmi che costituiscono il database mining derivano da campi quali la statistica, la pattern recognition, l'intelligenza artificiale e l'analisi dei segnali; essi sfruttano le informazioni ricavate direttamente dai dati per creare dei modelli empirici in grado di descrivere il comportamento di un sistema complesso. Nel caso dei profili di espressione genica, le tecniche di database mining rappresentano un utile strumento per identificare ed isolare particolari pattern di espressione che, di fatto, rappresentano delle vere e proprie impronte digitali genetiche di un determinato stato fisiologico. L'analisi dei dati degli array di cDNA è normalmente basata sull'uso sinergico di test di ipotesi e di sistemi per l'estrazione della conoscenza. I metodi del test di ipotesi sono sostanzialmente degli approcci di tipo top-down con i quali si ricercano nei dati le conferme sperimentali ad ipotesi precedentemente formulate. L'estrazione della conoscenza può essere intesa invece come un approccio bottom-up nel quale sono i dati stessi che forniscono le indicazioni necessarie

alla formulazione di nuove ipotesi.

Real-time PCR

Tutti i sistemi Real-time PCR si basano sulla rivelazione e quantificazione di un reporter fluorescente che produce un segnale che aumenta in modo direttamente proporzionale alla quantità di prodotto PCR della reazione. Ci sono diversi approcci chimici alla Real-time PCR:

- 1. Chimica intercalante
- 2. Chimica di sonde legate a sequenze specifiche
- I Primi includono:
- · Bromuro di etidio
- Coloranti (SYBER green, EVA green, SYTO9, LC green)

I Secondi includono:

- Sonde di idrolisi (Taq-Man)
- Sonde di ibridazione (Fret-Molecular Beacons)
- Sonde specifiche di prmers legati a sonde (Scorpions)
- Sonde Amplifluor direct
- Sonde plexor

Questa tecnologia risulta essere ormai consolidata negli ultimi anni, dalle notevoli potenzialità applicative:

- ✓ Quantizzazione assoluta
- ✓ Quantizzazione relativa, comparativa Entrambi utilizzabili per la valutazione e la misura dell'espressione di un gene o variante genica specifica.
- ✓ Genotipizzazione di polimorfismi anche non noti (high resolution melt)
- ✓ Genotipizzazione di mutazioni note
- ✓ Genotipizzazione microsatellitare

La chimica di gran lunga più utilizzata è quella che fa uso di sonde ad idrolisi e più in particolare le sonde Taq-Man che ibridizzano con una sequenza bersaglio compresa tra i due primers. Ciascuna sonda dual labaled ossia marcata con un reporter fluorescente al 5 primo e un quencher fluorescente al 3 primo. Quando la sonda è intatta la fluorescenza del reporter è soppressa dalla vicinanza del quencher. Durante la PCR, se la sequenza bersaglio è presente, la sonda ibridizza tra i siti dei primers senso e riverse. L'attività esonucleasica 5-3 primo della Taq polimerasi degrada la sonda ibridizzata e taglia il reporter che, separato, emetterà un segnale fluorescente letto dallo strumento in quantità direttamente proporzionali alla quantità di DNA o cDNA con cui la sonda specifica si è legata. Un'altra chimica utilizzata è quella detta Molecular-Beacons questi contengono un fluoroforo e un quencher alle estremità opposte di un oligonucleotide, che sono disegnate in modo da essere complementari tra loro formando una struttura a stem-loop, in cui il loop è complementare ad una sequenza presente all'interno del prodotto amplificato. Quando non è legato alla sequenza target, la sonda forma una struttura simile a harpin.

La vicinanza del quencher al reporter fluorescente impedisce l'emissione di fluorescenza. Durante lo step di annealing PCR la sonda ibridizza alla sequenza bersaglio: ciò porterà alla separazione del quencher dal reporter, producendo un segnale fluorescente. Anche qui, la quantità di fluorescenza prodotta ad ogni ciclo, o dopo, la PCR, dipende dalla quantità di prodotto specifico in quel dato momento.

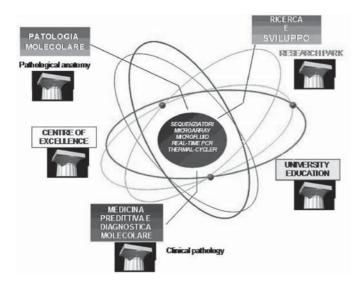


Figura 1. Modello organizzativo dipartimentale: approccio centralizzato multidisciplinare nella progettazione e sistemazione di sistemi molecolari avanzati

Microfluidica

La tecnologia microfluidica, sembrerebbe quella più futuristica, rende possibile creare un chip di silicio, vetro, polimeri come il polidimetilsilossano (PDMS) lavorati con tecniche di micromeccanica, con canali molto sottili per la manipolazione di quantità microscopiche di liquido. Questi, quindi, possono essere spostati utilizzando reti di canali capillari e possono essere riscaldati a temperature controllate con estrema precisione (pompe, valvole, attuatori, miscelatori).

La miniaturizzazione del congegno diagnostico permette di utilizzare campioni sempre più piccoli, con quantità di reagenti più bassi e tempi di reazione che di conseguenza sono molti più rapidi.

Le motivazioni che spingeranno alla diffusione tale tecnologia sono:

- · Ridotti volumi
- Ridotti tempi di analisi e potenziale automatizzazione
- Possibilità di operare in parallelo ed in modo veloce con un'alta processività
- Miniaturizzazione
- Possibilità di integrazione a dispositivi portatili
- Sviluppo di sistemi che vanno sotto il nome di "Lab on a Chip"

Il silicio è il materiale ideale per le applicazioni di microfluidica perchè ha una buona conduttività termica, permettendo di conservare una temperatura uniforme su aree molto grandi.

Inoltre ha una bassa capacità termica, stabilendo di realizzare cicli termici in tempi ristretti. Il silicio inoltre ha l'importantissimo vantaggio di permettere l'integrazione di controlli elettronici sullo stesso dispositivo, che si aggiunge ai benefici tecnologici di produzione di chip molto diffusa.

In commercio sono stati sviluppati dispositivi completi, "usa e getta", che permettono di eseguire amplificazione del DNA, rivelazione di sequenze target di DNA o cDNA, permettendo studi di espressione genica. (es. microfluid

card: 12 geni per 8 cDNA in quadruplicato dopo analisi di geni "accesi" in microarray o 384 geni diversi per un singolo cDNA).

Aspetti organizzativi e gestionali

Per affrontare tutte le problematiche esposte sin qui e apertesi con l'avvento della Medicina Molecolare "predittiva", è necessario lo sviluppo di una nuova mentalità operativa, che si propone di rispondere alla necessità, di grande attualità nel panorama internazionale, di adottare un approccio centralizzato multidisciplinare nella progettazione e sistemazione di sistemi molecolari avanzati.

Si tratterà di implementare un modello che consenta l'utilizzo di tecnologie diverse a disposizione di unità operative diverse con finalità operative diverse ma utilizzando personale altamente specializzato in maniera trasversale.

Si tratterà, in altri termini, di utilizzare personale coordinato secondo un approccio di tipo dipartimentale anche e, forse soprattutto, in considerazione degli alti costi delle procedure e della necessità imprescindibile di un elevato turn over di utilizzo per ottimizzare il rapporto costo-risultato (Fig. 1).

Tutto ciò vieppiù ove si consideri che, per sua stessa natura, la materia di cui ci si occupa interessa gruppi numerosi di soggetti il cui arruolamento deve prevedere ambiti territoriali ampi (regionali o interregionali).

- Unità Operativa di Patologia Clinica o Unità di Medicina Molecolare Predittiva
- e Diagnostica Molecolare
- Unità di Patologia Molecolare
- University Education
- Unità di ricerca e sviluppo a carattere universitario inserita trasversalmente nelle precedenti unità operative citate per le tecnologie:
- estrattori acidi nucleici;
- medicina molecolare tradizionale;
- real-time PCR;
- sequenziamento;
- · array: microarray e microfluid;

che rappresentano il fulcro di tutte le attività.

Una caratteristica del complesso delle unità operative è la presenza di molteplici competenze scientifiche che, pur in un ambito culturale di tipo disciplinare, tuttavia possono utilizzare tecnologie utili in un contesto multidisciplinare.

Questo criterio può essere applicato sia nel campo della ricerca che delle molteplici, possibili applicazioni cliniche.

Tutto questo porterà a ricadute dell'attività di ricerca verso risultati di tipo economico, produttivo culturale e, soprattutto, assistenziale.

Bibliografia

- National Advisory Council for Human Genome Research. Statemet on use of DNA testing for presymptomatic identification of cancer risk. JAMA 1994; 271:785.
- Linee guida. Disponibile su: http://www.progettooncologia. cnr.it\strategici\colonretto\04-cr.html (data di consultazione: 30.7.2009).
- Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. Disponibile su: http://www.genom.annualreviews.org (data di consultazione: 30.7.2009).
- Atkin WS, Cuzick J, Northover JM, Whynes DK. Prevention of

- colorectal cancer by once-only-sigmoidoscopy. Lancet 1993; 371:736-40.
- http://www.biogate.it\microarrays\microarrays.html (data di consultazione: 30.7.2009).
- DNA. Disponibile su: http://www.dia.unisa.it\ads\ bioinformatica\sequenziamento (data di consultazione: 30.7.2009).
- Morcellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Marincola FM. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. Trends Mol Med 2003; 9:189-95.
- La tecnologia Microarray. Disponibile su: http://www. lifelinelab.com/ita index.html (data di consultazione:
- Chimiche Real-Time PC. Disponibile su: http://www. biotecnologie2000.com (data di consultazione: 30.7.2009).
- Farmacogenetica. Disponibile su: http://www.roche.com (data di consultazione: 30.7.2009).
- Microfluidic card. Disponibile su: http://www.applied

- biosystems.com (data di consultazione: 30.7.2009).
- Efferth T, Volm M. Pharmacogenetics for individualized cancer chemotherapy. Pharmacol Ther 2005; 107:155-76.
- Imyanitov EN, Moiseyenko VM. Molecular-based choice of cancer therapy: realities and expectations. Clin Chim Acta 2007; 379:1-13.
- Marsh S, McLeod HL. Pharmacogenomics: from bedside to clinical practice. Hum Mol Genet 2006; 15:R89-93.
- Screening di polimorfismi genetici associati al rischio di insorgenza di patologie cardiovascolari. Disponibile su: www.laboratoriogenoma.eu/prestazioni_sottocategoria. (data di consultazione: 30.07.2009).
- Tecnologia microarray. Disponibile su: www.biogate.it\ microarrays\microarrays.html (data di consultazione: 20.06.2009).
- Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. Science 1999; 286: 487-91.