

ALMA MATER STUDIORUM · UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Dipartimento di Fisica e Astronomia “Augusto Righi”
Corso di Laurea in Fisica

Flash Therapy

Relatore:
Dott. Roberto Spighi

Presentata da:
Alessandra Mongelli

Anno Accademico 2024/2025

Abstract

La radioterapia FLASH è una tecnica innovativa che eroga dosi elevate di radiazione in tempi estremamente brevi, con un rateo di dose medio superiore a 40 Gy/s. Gli studi preclinici hanno dimostrato che questa modalità riduce significativamente la tossicità nei tessuti sani rispetto alla radioterapia convenzionale, mantenendo un'efficacia antitumorale comparabile: questo fenomeno è noto come effetto FLASH.

In questo elaborato si analizzano i fondamenti fisici e biologici della tecnica, le evidenze sperimentali disponibili e le prospettive di traduzione clinica. Vengono descritte le principali sorgenti di radiazione per l'erogazione a dose ultra-alta, come fasci di elettroni, fotoni e protoni, e i meccanismi biologici alla base dell'effetto FLASH, tra cui la cinetica dei radicali liberi, la deplezione radiolitica dell'ossigeno, il metabolismo redox e il ruolo della risposta immunitaria.

Le evidenze *in vivo* mostrano una riduzione della tossicità in diversi tessuti in organismi animali, mentre gli studi *in vitro* mostrano effetti più limitati, suggerendo un ruolo determinante del microambiente tissutale. Le prime applicazioni cliniche hanno confermato fattibilità e sicurezza della tecnica.

La piena traduzione clinica resta tuttavia una sfida aperta, che richiede una maggiore comprensione dei meccanismi biologici sottostanti, lo sviluppo di tecnologie più accessibili e la definizione di protocolli condivisi.

Indice

Introduzione	4
1 Radioterapia	6
1.1 Effetti della radiazione sul DNA	7
1.2 Flash effect	8
1.2.1 Fasci di elettroni	11
1.2.2 Raggi X	14
1.2.3 Fasci di protoni	16
2 Meccanismo Flash Effect	18
2.1 Cinetica dei radicali liberi	18
2.2 Deplezione radiolitica dell'ossigeno	21
2.3 Metabolismo redox e antiossidanti	23
2.4 Ruolo del ferro e della perossidazione dei lipidi	25
2.5 Risposta immunitaria	27
3 Evidenze sperimentali	30
3.1 <i>In vivo</i>	30
3.1.1 Fasci di elettroni	31

3.1.2	Fasci di fotoni	33
3.1.3	Fasci di protoni	35
3.2	<i>In vitro</i>	37
3.3	Applicazioni cliniche	40
4	Prospettive di sviluppo e traduzione clinica	42
4.1	Dalla ricerca preclinica ai trial clinici	42
4.2	Prospettive future	44
	Conclusioni	46
	A Parametri fisici fascio di elettroni	48
	B Parametri fisici fascio di fotoni	49
	C Parametri fisici fascio di protoni	50

Introduzione

Il cancro rappresenta una delle principali cause di mortalità a livello mondiale e il suo trattamento richiede approcci terapeutici sempre più efficaci e mirati. La radioterapia è uno dei pilastri fondamentali della terapia oncologica moderna: oltre la metà dei pazienti affetti da tumore riceve un trattamento radioterapico nel corso della malattia. Nonostante i continui progressi tecnologici e clinici, uno dei limiti principali della radioterapia convenzionale rimane la tossicità sui tessuti sani circostanti il volume tumorale, che può compromettere la qualità della vita del paziente e limitare le dosi erogabili.

In questo contesto si inserisce la radioterapia FLASH, una tecnica innovativa caratterizzata dall'erogazione di dosi elevate di radiazione in tempi estremamente brevi. Gli studi preclinici condotti negli anni hanno mostrato come questa terapia sia in grado di ridurre la tossicità nei tessuti sani mantenendo al contempo un'efficacia antitumorale comparabile a quella della radioterapia convenzionale. L'effetto protettivo osservato nei tessuti sani ha aperto nuove prospettive per l'ottimizzazione del rapporto terapeutico, rappresentando un potenziale punto di svolta nella pratica clinica oncologica.

Il presente elaborato si propone di analizzare il quadro attuale della ricerca sulla radioterapia FLASH, con particolare attenzione ai meccanismi biologici e fisici alla base dell'effetto FLASH, alle evidenze sperimentali disponibili e alle prospettive di sviluppo clinico. Il Capitolo 1 introduce i fondamenti della radioterapia e descrive le principali

sorgenti di radiazione utilizzate per l'erogazione a dose ultra-alta, ovvero fasci di elettroni, fotoni e protoni. Il Capitolo 2 analizza i principali meccanismi proposti per spiegare l'effetto FLASH, tra cui la radiolisi dell'acqua, la deplezione radiolitica dell'ossigeno, il metabolismo redox e il ruolo del sistema immunitario. Il Capitolo 3 presenta le evidenze sperimentali ottenute sia in organismi animali *in vivo* sia in colture cellulari *in vitro*, ma anche le prime applicazioni cliniche. Infine, il Capitolo 4 discute il passaggio dalla ricerca preclinica ai primi trial clinici e delinea le principali sfide e prospettive future, con riferimento agli sviluppi tecnologici in corso.

L'obiettivo dell'elaborato è fornire una panoramica critica e aggiornata di una tecnologia che, pur trovandosi ancora in una fase di sviluppo e consolidamento scientifico, mostra un potenziale terapeutico considerevole e potrebbe nei prossimi anni trasformare significativamente la pratica radioterapica.

Capitolo 1

Radioterapia

La radioterapia è una strategia di trattamento per combattere i tumori e si basa sull'equilibrio tra il controllo tumorale e la preservazione dei tessuti sani. Attualmente oltre la metà dei pazienti oncologici riceve trattamenti di radioterapia in alcune fasi della gestione della malattia.

Gli effetti dei raggi X sulle cellule tumorali furono chiari fin dalla loro scoperta da Wilhelm Conrad Roentgen nel 1896. Tuttavia, nel 1904 Pierre e Marie Curie descrissero le prime complicazioni indotte dalle radiazioni sui tessuti sani, da quel momento nacque la ricerca tecnologica e biologica per massimizzare il rapporto terapeutico. Una svolta importante per la radioterapia si ebbe negli anni '30 con il frazionamento della dose, questa tecnica, ancora oggi utilizzata, sfrutta le differenze tra le cellule sane e quelle tumorali rappresentate dai diversi modi di riparazione, ripopolamento, redistribuzione e riossigenazione [1].

1.1 Effetti della radiazione sul DNA

Nella radioterapia si possono utilizzare non solo le radiazioni ionizzanti (come i raggi X), ma anche fasci di particelle, entrambi hanno come bersaglio il DNA e i danni ad esso procurati possono essere di due tipi: diretti o indiretti. Nel primo caso viene indotto un cambiamento biologico del DNA ionizzando o eccitando gli atomi che lo costituiscono, questo processo è quello dominante per le radiazioni ad alto trasferimento lineare (Linear Energy Transfer, LET). Invece, i danni indiretti sono dovuti ai radicali liberi che vengono formati attraverso le specie reattive dell'ossigeno (Reactive Oxygen Species, ROS), generate dalla radiolisi dell'acqua, costituente principale della cellula, e le specie reattive dell'azoto (Reactive Nitrogen Species, RNS). In particolare sono danni dovuti alla reazione dell'ossigeno molecolare con l'ossido nitrico endogeno.

I danni che vengono causati al DNA sono schematizzati in Figura 1.1 e sono:

- creazione di cross-link, legami chimici anomali tra basi dello stesso filamento o di quello opposto, o tra DNA e proteine, che vanno a bloccare la replicazione e la trascrizione;
- le rotture a singolo filamento (Single Strand Break, SSB);
- le rotture a doppio filamento (Double Strand Break, DSB), quando sono vicine due SSB su filamenti opposti del DNA;
- i danni complessi (Locally Multiply Damaged Site, LMDS), lesioni ravvicinate su uno stesso segmento di DNA e includono spesso SSB e DSB [2] [3].

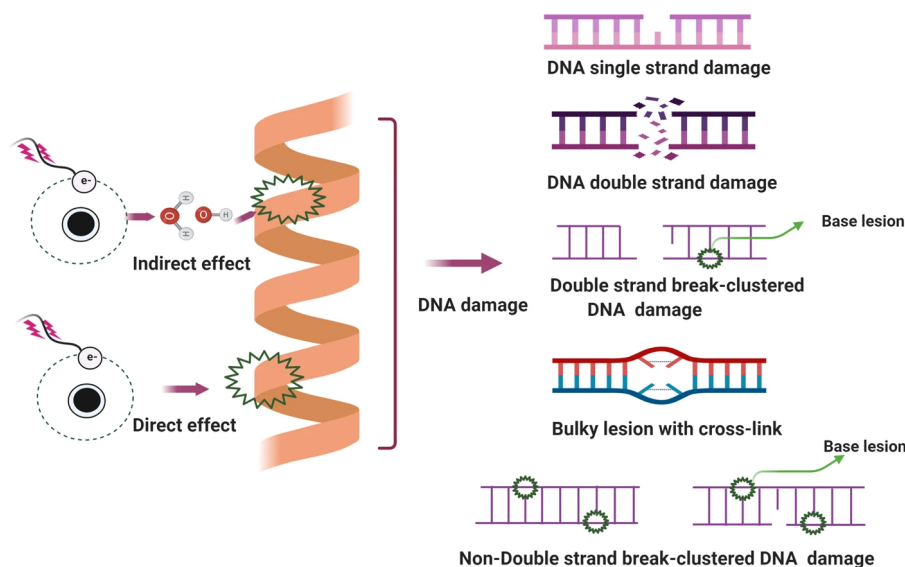


Figura 1.1: Danni diretti e indiretti che vengono causati al DNA dalle radiazioni. Figura ripresa da [4].

1.2 Flash effect

La radioterapia FLASH (FLASH-RT) affonda le sue radici negli anni '50 con gli studi del cosiddetto “effetto FLASH”, che descrive la riduzione dei danni ai tessuti sani e la maggiore precisione nel trattamento grazie alla minimizzazione degli effetti del movimento fisiologico di tumori o organi. Nel 1959, Dewey e Boag osservarono che l'irradiazione a dose ultra-alta (Ultra-High Dose Rate, UHDR), con un tasso medio superiore a 40 Gy/s, poteva proteggere i batteri *Serratia marcescens* rispetto all'irradiazione a dose convenzionale (CONV). In particolare, quando i batteri erano esposti a una miscela di azoto e ossigeno con l'1% di ossigeno, l'irradiazione a dose normale li rendeva più radiosensibili, mentre la dose ultra-alta riduceva questa sensibilità, simulando un effetto anaerobico. Studi successivi su cellule di mammifero confermarono che impulsi singoli ad altissima dose aumentavano la sopravvivenza cellulare rispetto a impulsi multipli, suggerendo che l'effetto FLASH fosse legato al consumo di ossigeno [5].

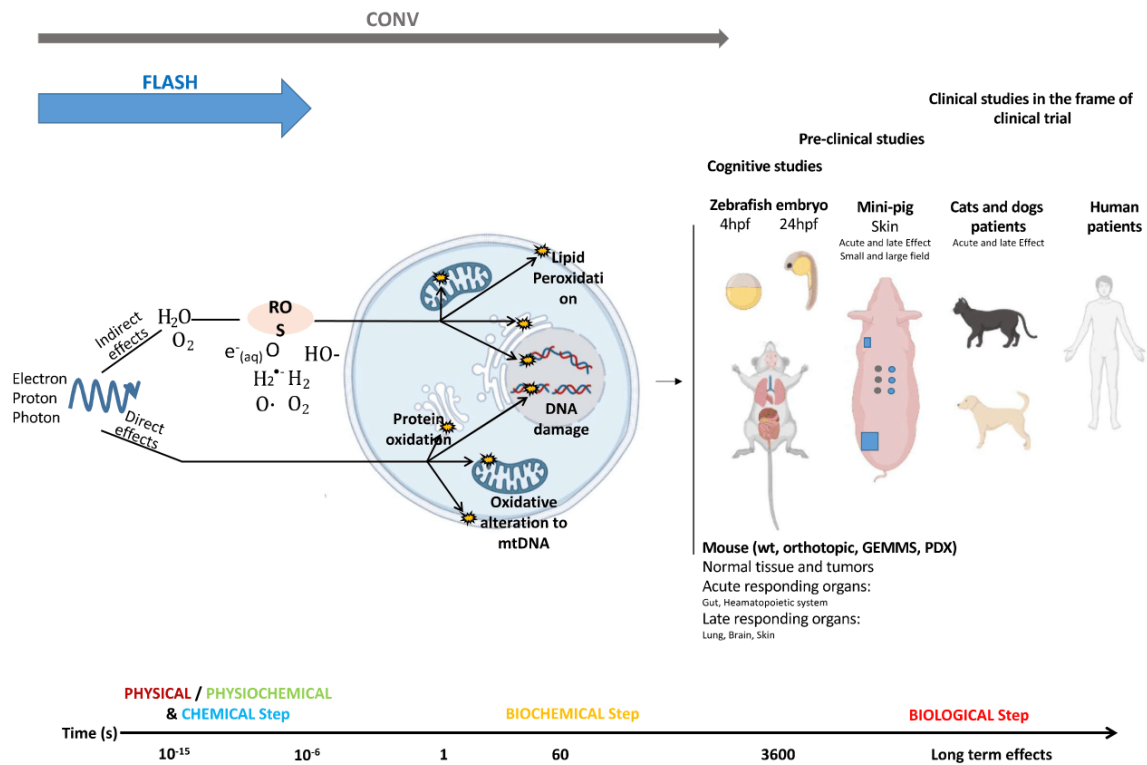


Figura 1.2: Schema concettuale della radioterapia FLASH. La figura illustra il percorso che va dall'erogazione dei fasci di radiazione ad altissime dose rate rispetto alla radioterapia convenzionale, ai processi fisici, fisico-chimici e chimici iniziali che portano alla formazione di specie reattive dell'ossigeno, fino ai successivi effetti biologici cellulari (danno al DNA, ossidazione di lipidi e proteine, alterazioni mitocondriali). Sono inoltre riassunti i principali modelli sperimentali utilizzati per lo studio dell'effetto FLASH, dai sistemi preclinici fino agli studi clinici su pazienti veterinari e umani. Immagine ripresa da [1].

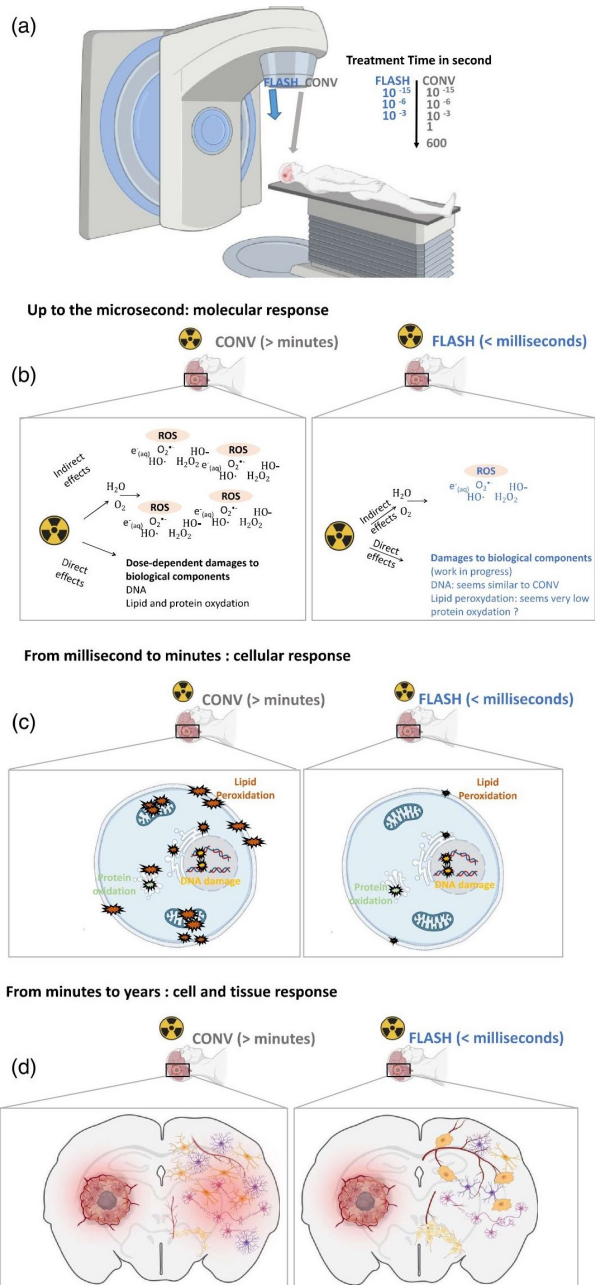


Figura 1.3: Effetti di FLASH-RT e CONV: (a) tempi necessari per somministrare una dose di 10 Gy; (b) effetti a livello molecolare; (c) effetti a livello cellulare; (d) effetti a livello cellulare e tissutale. Figura ripresa da [1].

L'interesse clinico verso la radioterapia FLASH si intensificò nel 2014, quando Favaudon dimostrò come il muscolo liscio del polmone dei topi risultasse preservato dopo essere stato irradiato con UHDR rispetto alla radioterapia convenzionale ($\leq 0,03$ Gy/s), come si può osservare nella Figura 1.4. Studi preclinici successivi confermarono che la FLASH-RT riduce significativamente gli effetti collaterali nei tessuti sani di topi, mini-pig e gatti. Infine, il primo paziente umano con linfoma cutaneo T¹ trattato con UHDR ha ottenuto una risposta tumorale completa duratura, con effetti collaterali molto più lievi rispetto alla radioterapia convenzionale [5].

Negli ultimi anni la FLASH-RT è passata da osservazioni sperimentali su batteri e cellule a promettenti risultati preclinici e clinici grazie agli sviluppi tecnologici e biologici, ponendosi come una tecnologia in grado di combinare efficacia antitumorale e riduzione della tossicità sui tessuti sani.

Ad oggi, le fonti di radiazione per l'erogazione degli UHDR sono di tre tipi: elettroni, fotoni (raggi X) e protoni.

1.2.1 Fasci di elettroni

I fasci di elettroni vengono prodotti da acceleratori lineari (LINAC) che arrivano fino ad energie di 20 MeV, sono una tecnologia consolidata in radioterapia e possono emettere UHDR utilizzando la radiazione alle massime capacità di corrente degli acceleratori esistenti. Questi sono ideali per trattamenti superficiali negli esseri umani e possono penetrare nei piccoli animali, permettendo studi preclinici fondamentali [1].

I primi dispositivi utilizzati sono stati il Kinetron e l'Oriatron. Essi hanno permesso la prima dimostrazione dell'effetto FLASH e la maggior parte degli studi preclinici gra-

¹Il linfoma cutaneo a cellule T è un tumore del sistema immunitario che nasce da particolari globuli bianchi (linfociti T) e si manifesta principalmente sulla pelle.

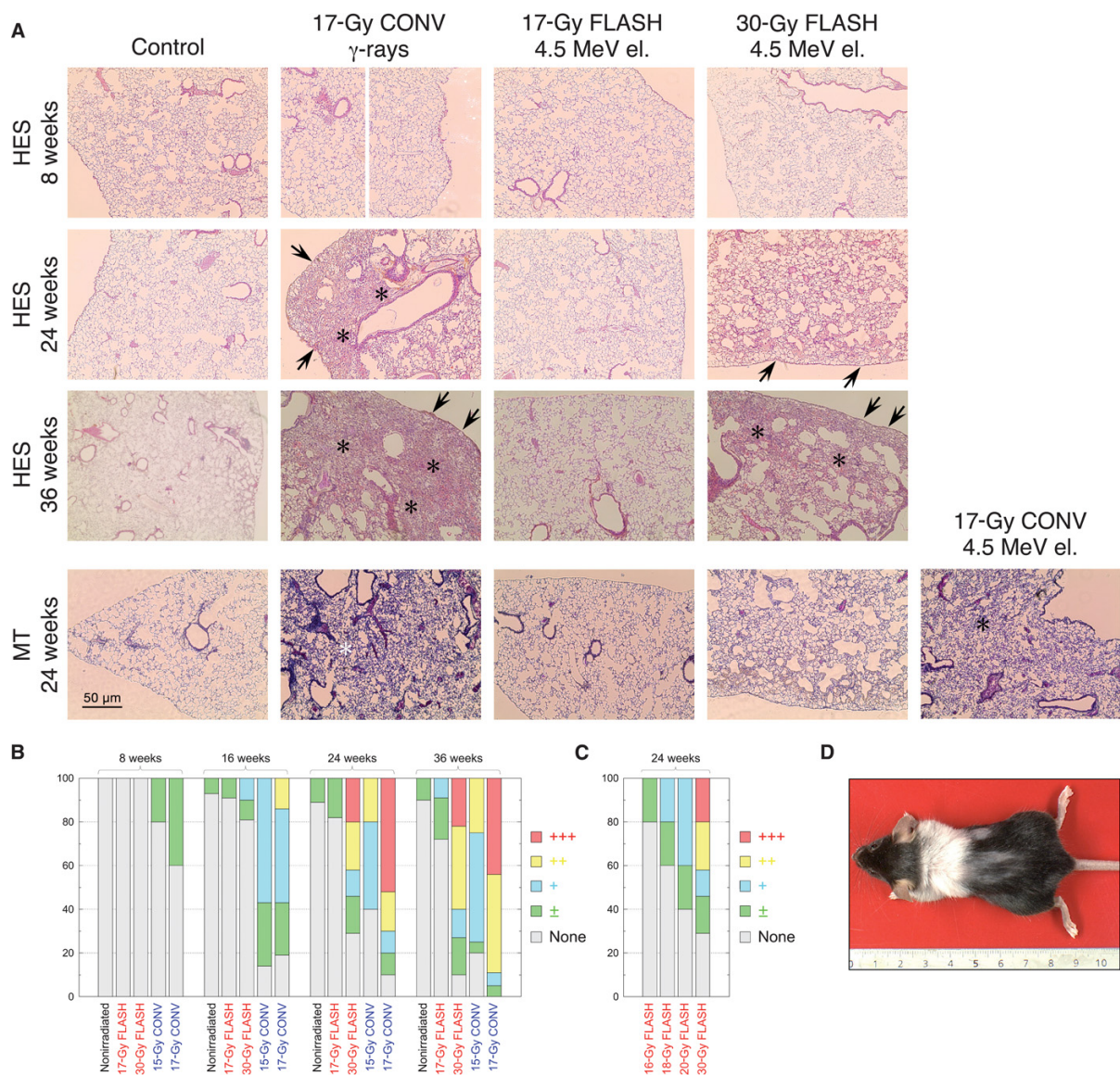


Figura 1.4: Effetti della radioterapia convenzionale e della radioterapia FLASH sul polmone di topo. A distanza di 24 settimane, l'irradiazione convenzionale provoca un'estesa fibrosi polmonare, cioè una formazione anomala di tessuto cicatriziale che altera la struttura normale del polmone. Al contrario, il trattamento FLASH, pur utilizzando dosi anche più elevate, determina solo alterazioni minime. L'analisi nel tempo conferma che la FLASH-RT riduce in modo significativo il danno ai tessuti sani rispetto alla radioterapia tradizionale. Inoltre, gli effetti sulla pelle risultano limitati e non si osservano lesioni gravi. In (A) sono mostrati visivamente gli effetti della FLASH-RT e della CONV. In (B, C) sono rappresentati grafici che indicano la progressione della fibrosi in funzione del tempo post-irradiazione e delle dosi somministrata. In (D) vengono mostrati gli effetti a lungo termine degli UHDR sulla pelle. Fonte: Favaudon et al. [6].

zie alla loro flessibilità che consentiva di regolare parametri come numero e durata degli impulsi, frequenza e dose per impulso. Successivamente sono stati progettati dispositivi per applicazioni cliniche come il Mobetron, l'eFlash e il FLASHKNIFE che consentono di emettere dosi ultra-elevate controllate mantenendo la possibilità di modalità di irradiazione convenzionale [1].

Le prime applicazioni cliniche sull'uomo sono limitate, ma hanno dimostrato la fattibilità della tecnica e una procedura relativamente sicura. Rimane la necessità di apparecchiature dedicate, ciò rappresenta un limite nella diffusione della FLASH Therapy. A questo proposito sono stati fatti studi sull'utilizzo di acceleratori lineari per l'emissione di UHDR senza modifiche permanenti in una configurazione completamente reversibile, ottenendo che un LINAC standard può raggiungere:

- tassi di dose tra 40 e oltre 100 Gy/s;
- profondità clinicamente utili;
- campi ampi, piatti e simmetrici;
- distanze operative compatibili con la pratica clinica.

Questi esperimenti hanno dimostrato che l'effetto FLASH dipende principalmente dal tempo totale di esposizione piuttosto che dalla massima intensità del fascio, ma anche da altri fattori come l'energia del fascio, il tipo di tessuto irradiato e la geometria del fascio [7]. In appendice è presente la Tabella A.1 riassuntiva dei parametri fisici fondamentali del fascio di elettroni per l'ottenimento dell'effetto FLASH.

Tuttavia sono presenti delle criticità nella modifica dei LINAC per applicazioni FLASH, queste includono:

- saturazione delle camere a ionizzazione, che limita la precisione della misura ad alte dosi;
- imprecisione nella determinazione della dose di radiazione dovuta a fattori strumentali, fisici e procedurali;
- assenza di disponibilità di sistemi di monitoraggio del fascio specificatamente validati per erogazioni a UHDR;
- mancanza di sistemi di pianificazione del trattamento dedicati;
- limitata possibilità di modulare indipendentemente i parametri temporali del fascio.

In conclusione, la radioterapia FLASH con elettroni risulta una tecnologia rivoluzionaria, ma ancora in fase di consolidamento scientifico e tecnologico [8].

1.2.2 Raggi X

I raggi X costituiscono la maggior parte dei trattamenti radioterapici, ma a causa della difficoltà nel generare fasci a UHDR sono stati trascurati nel campo dell'effetto FLASH. I fasci si possono generare mediante due tecniche: Bremsstrahlung o sincrotrone.

Nel processo di Bremsstrahlung ("radiazione di frenamento") i raggi X vengono prodotti dalla collisione degli elettroni con energia dell'ordine di decine di MeV con i nuclei di bersagli metallici ad alto numero atomico. Il fenomeno è governato dal potere frenante massivo totale $S_{tot} = \frac{dE}{\rho dx}$, dove dE è l'energia cinetica dell'elettrone persa durante la frenata lungo una distanza dx in un mezzo di densità di massa ρ . L'energia si divide in due: una parte genera raggi X, corrispondente al potere frenante radiativo S_{rad} , e l'altra parte genera calore, descritta dal potere frenante di collisione S_{col} . La sfida è proprio nel riuscire a calibrare questa suddivisione: una corrente di fascio elettronico molto elevata

potrebbe portare all'effetto FLASH, ma allo stesso tempo il bersaglio potrebbe fondere a causa dell'elevato calore prodotto. In questo modo la scelta ricade su materiali con alto numero atomico, più efficienti nel convertire l'energia degli elettroni in fotoni, e con un alto punto di fusione.

Il sincrotrone è formato da un cannone elettronico che produce elettroni che vengono successivamente accelerati da un acceleratore lineare e da un booster raggiungendo energie nell'ordine dei GeV, infine entrano in un anello di accumulazione in condizione di ultra-alto vuoto, cioè a pressioni estremamente basse, che consentono agli elettroni di mantenere costante l'energia. All'interno dell'anello sono presenti magneti deflettori che fanno cambiare la direzione del moto degli elettroni facendoli emettere radiazione tangenziale all'orbita. Questa radiazione risulta altamente collimata e polarizzata, con impulsi ultra-brevi, energia regolabile e brillantezza² estremamente elevata.

Quindi, nel campo dell'effetto FLASH, le sorgenti basate sulla radiazione di sincrotrone risultano essere più adatte rispetto alla produzione per Bremsstrahlung grazie alla maggiore collimazione del fascio, alla brillantezza superiore e al controllo più preciso dei parametri temporali e spettrali. Nonostante i vantaggi l'uso clinico dei sincrotroni è limitato a causa dell'elevato costo e dalla scarsa accessibilità, si stanno dunque studiando tecnologie innovative [9].

In appendice è presente la Tabella B.1 riassuntiva dei parametri fisici fondamentali del fascio di fotoni per l'ottenimento dell'effetto FLASH.

²La brillantezza indica quante particelle passano attraverso una certa area, in un certo angolo e in un certo intervallo di energia, ossia indica quanto intensa e "concentrata" è una sorgente di particelle.

1.2.3 Fasci di protoni

La protonterapia è una tecnologia complessa in cui i protoni vengono accelerati fino a energie che vanno da 230 a 250 MeV tramite ciclotroni o sincrotroni. Diversi centri clinici hanno modificato sistemi di protonterapia esistenti per raggiungere i tassi di dose ultra-alti, dimostrando la fattibilità clinica grazie a sufficienti studi preclinici e clinici iniziali. In appendice è presente la Tabella C.1 riassuntiva dei parametri fisici che un fascio di protoni deve avere per ottenere l'effetto FLASH.

La terapia clinica risulta essere più efficace rispetto alla terapia con elettroni poiché consente di raggiungere profondità superiori, facendo in modo che la radiazione possa trattare tumori situati in posizioni più profonde nel corpo. Inoltre, rispetto alla terapia con raggi X, la protonterapia rilascia la maggior parte dell'energia in un intervallo molto ristretto che prende il nome di picco di Bragg, consentendo maggiore protezione degli organi sani circostanti.

Tuttavia si hanno difficoltà nel mantenere tassi di dose elevati su volumi tumorali estesi. In questi casi l'utilizzo della diffusione del fascio riduce il tasso di dose per coprire tutta l'area tumorale, mentre la tecnica del pencil-beam scanning (PBS), in cui il tumore viene trattato punto per punto, comporta un aumento del tempo totale per coprire l'intero volume con la conseguente riduzione del tasso di dose medio. Inoltre, per cambiare la profondità del fascio, vengono utilizzati i degradatori che peggiorano la qualità del fascio aumentando l'emittanza³, riducendo l'intensità e producendo neutroni indesiderati che contribuiscono alla dose somministrata.

A questo proposito si stanno studiando sistemi a radiofrequenza che permettano di modulare elettronicamente l'energia, che devino il fascio magneticamente e che spostino

³L'emittanza è una misura della dispersione spaziale e angolare di un fascio di particelle, ossia indica quanto il fascio è compatto e direzionale.

il picco di Bragg in 3D in modo più efficiente, senza modificare la qualità del fascio [1]
[10].

Capitolo 2

Meccanismo Flash Effect

Sebbene i meccanismi molecolari alla base dell'effetto FLASH nella radioterapia non sono ancora completamente chiari, ci sono ipotesi ed evidenze sperimentali che indicano come la cinetica dei radicali liberi generati dalla radiazione e la loro interazione con ossigeno e con molecole antiossidanti siano importanti per tale fenomeno. Oltre a questi processi, fattori come la perossidazione dei lipidi nelle membrane cellulari e la risposta immunitaria sembrano contribuire in modo significativo al fenomeno. In Figura 2.1 è rappresentato in modo schematico il meccanismo alla base dell'effetto FLASH.

2.1 Cinetica dei radicali liberi

La radiolisi dell'acqua è il processo di scissione delle molecole d'acqua indotto da radiazioni ionizzanti, questo meccanismo è alla base degli effetti biologici della radiazione ad altissima dose che avviene su scale temporali estremamente brevi dell'ordine di $10^{-13}s$, mentre entro $1 \mu s$ le reazioni primarie raggiungono uno stato quasi stazionario [12]. Durante l'irraggiamento, le molecole d'acqua vengono eccitate e ionizzate, generando specie

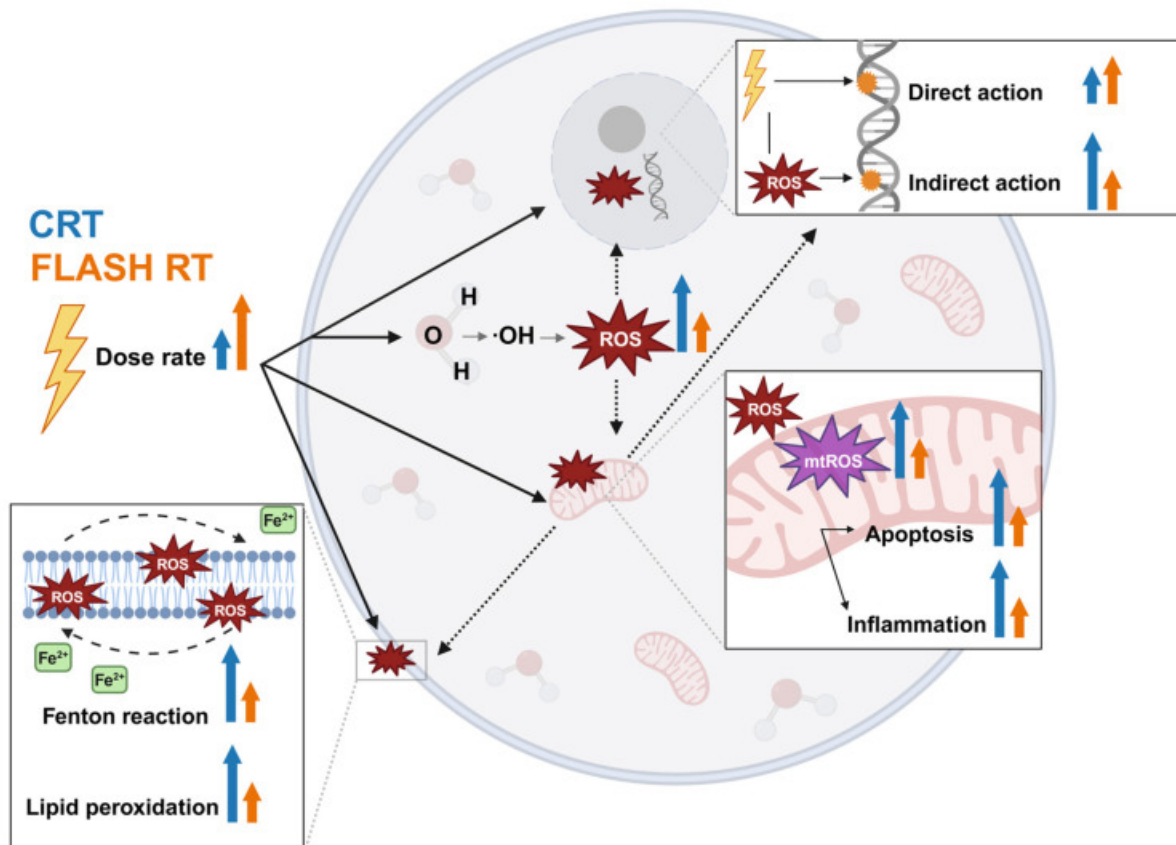
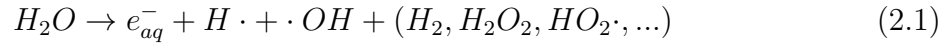


Figura 2.1: Schema del meccanismo alla base dell'effetto FLASH. L'irradiazione FLASH è indicata in arancione, mentre quella convenzionale in blu. FLASH-RT viene erogata a UHDR, riducendo la produzione di specie reattive dell'ossigeno e proteggendo i tessuti sani, preservando mitocondri, membrane lipidiche e DNA nucleare rispetto alla CONV. Le radiazioni ionizzanti generano principalmente ROS tramite la radiolisi dell'acqua. *Riquadro in alto a destra*: il DNA subisce danni diretti dalle radiazioni ionizzanti e danni indiretti mediati dai ROS. *Riquadro in basso a destra*: i ROS mitocondriali (mtROS) prodotti dalle radiazioni ionizzanti attivano risposte apoptotiche e infiammatorie. *Riquadro in basso a sinistra*: le radiazioni ionizzanti inducono stress ossidativo nelle membrane lipidiche, dove il ferro labile catalizza la produzione di ROS, causando perossidazione lipidica. Immagine ripresa da [11].

reattive primarie, i radicali. Per esempio, uno schema di radiolisi è dato da:



dove $\cdot OH$ è il radicale ossidrilico, e_{aq}^- l'elettrone idratato, $H \cdot$ atomo di idrogeno e i termini tra parentesi sono prodotti molecolari. Queste specie si distribuiscono in microregioni ad alta densità radicalica chiamate *spur* dove inizia una serie di interazioni chimiche in cui i radicali possono interagire tra loro o con l'ossigeno formando specie ossidanti [13]. Queste reazioni causano danni indiretti al DNA e alle altre biomolecole essenziali nelle cellule, nel dettaglio:

- i radicali idrossilici sono altamente reattivi e danneggiano direttamente DNA, lipidi e proteine;
- l'elettrone acquoso può ridurre ioni metallici o reagire con l'ossigeno formando superossido, che genera H_2O_2 e attiva vie di segnalazione;
- l'ossigeno può reagire con l'ossido nitrico formando perossinitrito ($ONOO^-$) che è molto reattivo [1].

La principale differenza rispetto alla radioterapia convenzionale è la vita media e la concentrazione dei radicali che si sono formati. La radiazione FLASH è estremamente rapida e combinata con una densità di radicali elevata favorisce la ricombinazione radicale, riducendo di conseguenza radicali liberi disponibili per il danneggiamento delle biomolecole [13]. Inoltre, la struttura del fascio, il numero d'impulsi e il tempo di erogazione influenzano i risultati sperimentali; l'aumento del LET delle particelle determina una riduzione della produzione di radicali liberi e un aumento dei prodotti stabili (H_2O_2 e O_2), contribuendo alla modulazione dell'effetto FLASH [12].

2.2 Deplezione radiolitica dell'ossigeno

La deplezione radiolitica dell'ossigeno (Radiolytic Oxygen Depletion, ROD) rappresenta una delle principali ipotesi formulate per spiegare il meccanismo biologico alla base dell'effetto FLASH. L'ossigeno molecolare O_2 disciolto è infatti un noto radiosensibilizzante: la sua presenza aumenta la radiosensibilità cellulare e l'Oxygen Enhancement Ratio (OER)¹, mentre la sua riduzione tende a rendere le cellule più radioresistenti. Ciò si può osservare nella Figura 2.2 [1]. Secondo l'ipotesi ROD, durante l'irradiazione a UHDR che permette l'effetto FLASH, l'ossigeno reagirebbe con i radicali generati dalla radiolisi dell'acqua (in particolare con l'elettrone idratato e il radicale idrogeno), determinando una riduzione temporanea della pressione parziale dell'ossigeno prima che la perfusione sanguigna possa ristabilire le condizioni basali, generando in questo modo una condizione di ipossia transitoria che potrebbe indurre una radioprotezione selettiva nei tessuti sani [12][13].

Tuttavia, le evidenze sperimentali mostrano come questo meccanismo da solo non sia sufficiente per spiegare l'effetto FLASH osservato *in vivo*. Simulazioni Monte Carlo hanno mostrato come la ricombinazione dei radicali conservi una parte significativa dell'ossigeno, limitando così la deplezione netta [13]. Inoltre, misurazioni dirette in acqua, soluzioni proteiche e linee cellulari tumorali e sane hanno evidenziato come la deplezione di ossigeno dipende principalmente dalla dose e non dalla modalità, e che a ratei di dose più elevati può essere consumato addirittura meno ossigeno rispetto ai ratei convenzionali. Le variazioni misurate risultano quantitativamente modeste e insufficienti a generare una ipossia locale totale capace di giustificare la maggior parte dell'effetto radioprotettivo

¹Oxygen Enhancement Ratio (OER): parametro che misura quanto la presenza di ossigeno aumenta l'efficacia delle radiazioni ionizzanti nel danneggiare le cellule. È definito dal rapporto tra la dose in condizioni ipossiche e la dose in presenza di ossigeno necessaria per ottenere lo stesso effetto biologico [14].

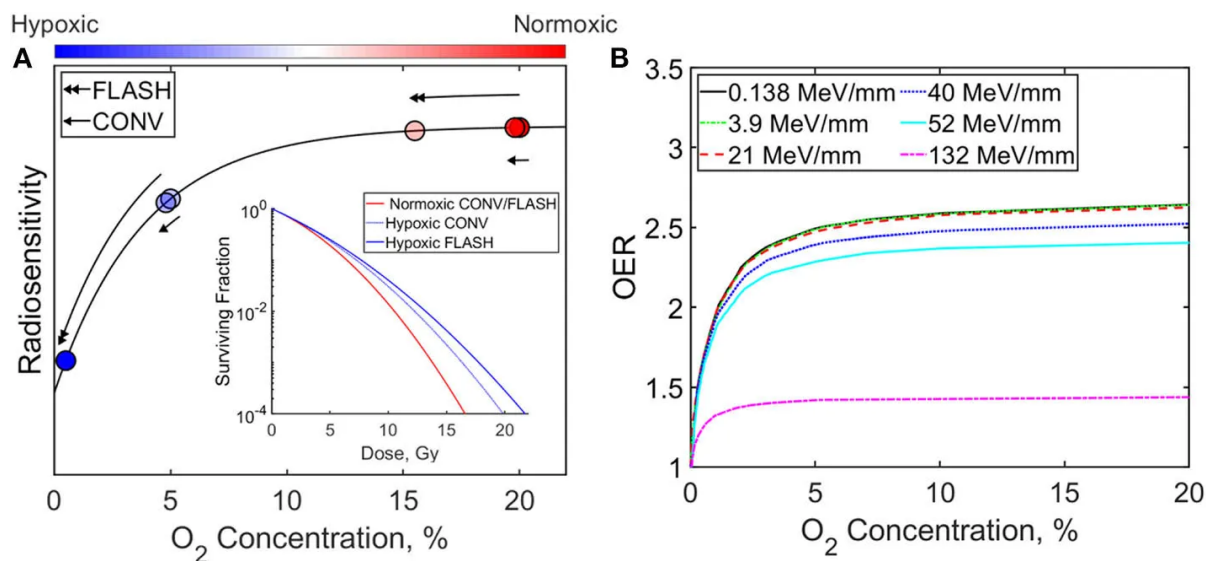


Figura 2.2: Nel grafico A sono riportate la sensibilità alle radiazioni e la frazione di sopravvivenza cellulare in funzione della concentrazione di O_2 per la radioterapia FLASH e per quella convenzionale. Nel grafico B è presente il parametro OER in funzione della concentrazione di ossigeno per l'irradiazione con diversi LET. Grafici ripresi da [13].

osservato. Gli studi hanno definito un intervallo dinamico di concentrazione di ossigeno in cui l'effetto FLASH è massimo, compreso approssimativamente tra 0,25% e 1,5% di O_2 , mentre scompare sia in condizioni di anossia completa (0%) sia in normassia (20%) [12].

In vivo, la deplezione locale di ossigeno è stata osservata in diversi tessuti in modalità FLASH ma non in modalità convenzionale, poiché la distribuzione della dose nel tempo permette all'ossigeno di ricostruirsi. Tuttavia, l'entità della riduzione dipende fortemente dallo stato iniziale di ossigenazione: nei tumori già ipossici la deplezione indotta da FLASH risulta attenuata, poiché già ridotta la disponibilità delle molecole di ossigeno, mentre nei tessuti normossici la cinetica è simile a quella dei tessuti sani. Considerando l'elevata eterogeneità dell'ossigenazione tumorale, la variabilità temporale dell'ipossia e l'influenza di fattori sperimentali, come l'anestesia e condizioni sistemiche di ossigenazio-

ne, risulta evidente che la ROD possa contribuire al fenomeno, ma non rappresentarne il meccanismo dominante alle dosi terapeutiche [12].

2.3 Metabolismo redox e antiossidanti

Uno dei possibili meccanismi alla base dell'effetto FLASH è il metabolismo redox, inteso come l'insieme dei processi che regolano la produzione e la neutralizzazione delle specie reattive generate dall'irradiazione. Le radiazioni ionizzanti inducono infatti la radiolisi dell'acqua, con formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS), come superossido, perossido di idrogeno, radicali perossilici e ossido nitrico. Tali specie sono responsabili di una parte rilevante del danno biologico associato all'esposizione alle radiazioni [1] [13].

Il metabolismo redox può essere considerato un "regolatore" del danno ossidativo, ossia del danno causato dalle specie reattive, e quindi dell'esito terapeutico. Ciò è legato alle differenze basali nello stato redox tra cellule tumorali e cellule sane: le prime presentano un assetto ossidativo alterato rispetto ai tessuti sani, condizione che può influenzare in modo significativo la risposta all'irradiazione. Questo aspetto potrebbe contribuire all'effetto FLASH, nel quale si misura una minore tossicità nei tessuti sani rispetto alla radioterapia convenzionale [1].

Gli antiossidanti endogeni ² svolgono un ruolo fondamentale nella modulazione della risposta redox, alcuni come il glutatione (GSH), la vitamina C (ascorbato, AH^-) e la vitamina E (tocoferoli, TOH), aiutano a proteggere le cellule dai danni delle radiazioni. Catturano i radicali liberi prodotti dalla radioterapia e in particolare quelli che possono danneggiare i grassi delle membrane cellulari. Modelli di simulazione Monte Carlo

²Gli antiossidanti endogeni sono molecole prodotte all'interno dell'organismo umano e servono a proteggere le cellule dai danni ossidativi causati dalle specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto.

indicano che gli antiossidanti competono efficacemente con i processi di ricombinazione radicale-radicalica, contribuendo a ridurre il danno ossidativo. Questa maggiore capacità dei tessuti sani di attivare rapidamente i sistemi di difesa antiossidante potrebbe spiegare il cosiddetto “effetto di risparmio” dei tessuti osservato con la radioterapia FLASH [13].

Quando una cellula subisce stress ossidativo acuto, risponde attraverso una riorganizzazione metabolica che aumenta la produzione di NADPH, una molecola necessaria al funzionamento dei sistemi antiossidanti. Allo stesso tempo, si verificano modifiche nel metabolismo energetico e nell'attività mitocondriale, influenzando sia la produzione di radicali liberi (ROS) sia il consumo di ossigeno. Inoltre, si attivano segnali cellulari che promuovono la riparazione dei danni, la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule [1].

In caso di stress ossidativo cronico, le cellule si adattano modificando l'espressione genica, cioè quali geni vengono attivati. Fattori di trascrizione come HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1) e NRF-2 (Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2) controllano geni legati al metabolismo energetico, alla difesa antiossidante e alla gestione del ferro. Questi fattori influenzano anche la sensibilità delle cellule alle radiazioni, suggerendo che possano avere un ruolo nell'effetto FLASH [1].

Un altro aspetto importante è che la risposta redox non riguarda solo la singola cellula, ma può avere effetti sull'intero organismo. Nella radioterapia convenzionale, i prodotti generati dalla radiolisi possono accumularsi e diffondersi, favorendo una forte risposta infiammatoria e un danno più esteso ai tessuti. Nella modalità FLASH, invece, l'irradiazione è molto più rapida e spesso coinvolge volumi più limitati: le specie reattive che si formano tendono a rimanere più localizzate. Questo potrebbe ridurre la diffusione sistemica dello stress ossidativo e contenere l'iperinfiammazione, contribuendo alla minore tossicità nei tessuti sani osservata con la radiazione FLASH [12].

È inoltre importante distinguere tra sistemi chiusi e sistemi aperti. Negli studi

in vitro, dove l'intero campione è irradiato, l'effetto predominante può essere l'auto-annichilazione dei radicali in un sistema chiuso, con riduzione complessiva dei livelli di ROS. Negli studi *in vivo*, cioè in organismi parzialmente irradiati, l'effetto FLASH sembra coinvolgere anche una risposta cooperativa dell'intero organismo, nella quale la comunicazione tra aree irradiate e non irradiate gioca un ruolo rilevante [12].

In sintesi, il metabolismo redox nell'effetto FLASH può essere interpretato come il risultato della competizione tra produzione radicalica ultra-rapida e capacità di compensazione del sistema biologico. Le differenze tra tessuti sani e tumorali nello stato redox e nella gestione delle specie reattive, insieme alla diversa distribuzione spaziale e temporale dei prodotti della radiolisi, rappresentano possibili elementi chiave nella spiegazione della ridotta tossicità osservata con la radioterapia FLASH.

2.4 Ruolo del ferro e della perossidazione dei lipidi

Un possibile meccanismo aggiuntivo dell'effetto FLASH riguarda la ferroptosi, una forma di morte cellulare legata alla perossidazione dei grassi³ nelle membrane cellulari e alla presenza di ferro. Nei tessuti sani, i sistemi di difesa delle cellule, come il glutatione, riescono a neutralizzare gran parte dei radicali lipidici prodotti dalla radiazione, proteggendo così le cellule sane. Nei tumori, invece, le cellule contengono più ferro disponibile per reazioni chimiche e sono meno capaci di contrastare l'ossidazione dei grassi. Di conseguenza, anche bassi livelli di radicali lipidici generati dalla radiazione FLASH possono danneggiare preferenzialmente le cellule tumorali. Questo meccanismo, illustrato in Figura 2.3, potrebbe contribuire alla maggiore protezione dei tessuti sani e all'efficacia selettiva della radioterapia FLASH contro i tumori [1].

³La perossidazione dei grassi è un processo chimico in cui i radicali liberi ossidano i grassi presenti nelle membrane cellulari, rendendole più fragili e, se il danno è grave, favorendo la morte cellulare.

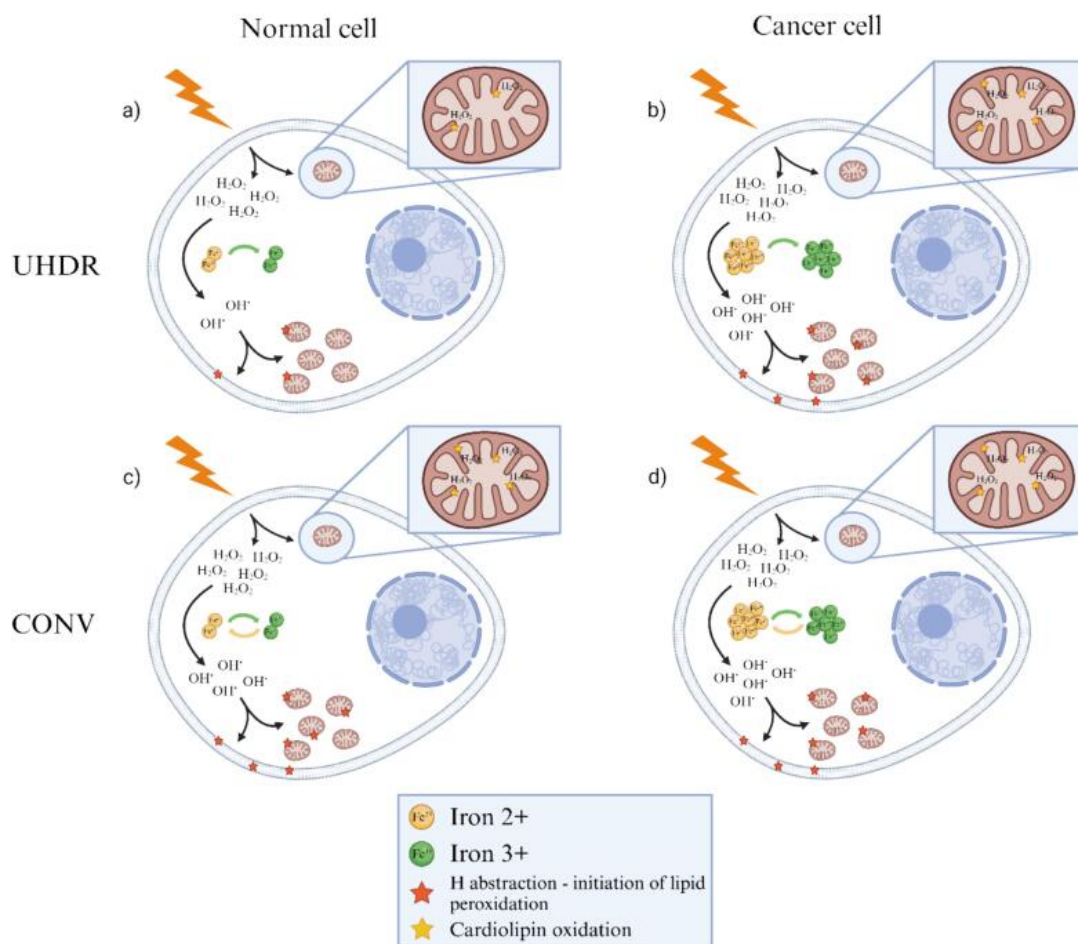


Figura 2.3: Modello ipotetico del danno indotto dai ROS con irradiazione FLASH rispetto alla radioterapia convenzionale. Con la FLASH-RT, il brevissimo tempo di irradiazione produce un rapido picco di perossido di idrogeno (H_2O_2) che satura il ferro disponibile nelle cellule sane (a), impedendogli di partecipare a ulteriori reazioni dannose e proteggendo così i mitocondri dall'ossidazione. Nelle cellule tumorali, che contengono più ferro, questo meccanismo protettivo non si attiva (b). Con la radioterapia convenzionale, invece, il tempo di irradiazione più lungo permette al ferro di rigenerarsi continuamente, producendo una maggiore quantità di radicali liberi dannosi sia nelle cellule sane (c) che in quelle tumorali (d), con conseguente maggiore perossidazione lipidica. Immagine ripresa da [15].

2.5 Risposta immunitaria

Un ulteriore possibile contributo all'effetto FLASH è rappresentato dalla risposta immunitaria. Diversi studi suggeriscono che la radioterapia ad altissimo rateo di dose interagisca in modo diverso con il sistema immunitario rispetto alla radioterapia convenzionale, influenzando sia le cellule immunitarie circolanti sia il microambiente tumorale [16][17]. La Figura 2.4 illustra i tre principali meccanismi attraverso cui la FLASH-RT interagisce con il sistema immunitario, che verranno analizzati nei paragrafi seguenti.

Uno degli aspetti più rilevanti riguarda la preservazione delle cellule immunitarie periferiche: i linfociti. Quelli circolanti sono altamente radiosensibili e la loro riduzione (linfocitopenia) è un effetto collaterale frequente della radioterapia convenzionale, spesso associato a prognosi peggiore e a minore efficacia dell'immunoterapia⁴. Poiché la radioterapia FLASH eroga la dose in un intervallo temporale estremamente breve, il tempo di esposizione delle cellule immunitarie circolanti è ridotto. Di conseguenza, una frazione maggiore di linfociti viene risparmiata rispetto alla modalità convenzionale. Questo effetto sembra aumentare con la dose somministrata e potrebbe contribuire al mantenimento della funzione immunitaria sistemica [16][17].

La radioterapia FLASH sembra inoltre modulare il microambiente immunitario tumorale (Tumor Immune MicroEnvironment, TIME). Rispetto alla radioterapia convenzionale, è stata osservata una maggiore infiltrazione di linfociti T citotossici ($CD8^+$)⁵ nel tumore e una riduzione di segnali associati a danno vascolare e infiammazione eccessiva. Questo potrebbe aiutare a trasformare tumori che sfuggono al sistema immunitario in

⁴L'immunoterapia è un trattamento medico che sfrutta il sistema immunitario per combattere le malattie, soprattutto i tumori. Invece di colpire direttamente le cellule tumorali con farmaci chimici o radiazioni, l'immunoterapia istruisce il sistema immunitario a riconoscere e attaccare le cellule malate.

⁵I linfociti T citotossici ($CD8^+$) sono cellule del sistema immunitario specializzate nell'uccidere cellule infettate da virus e cellule tumorali.

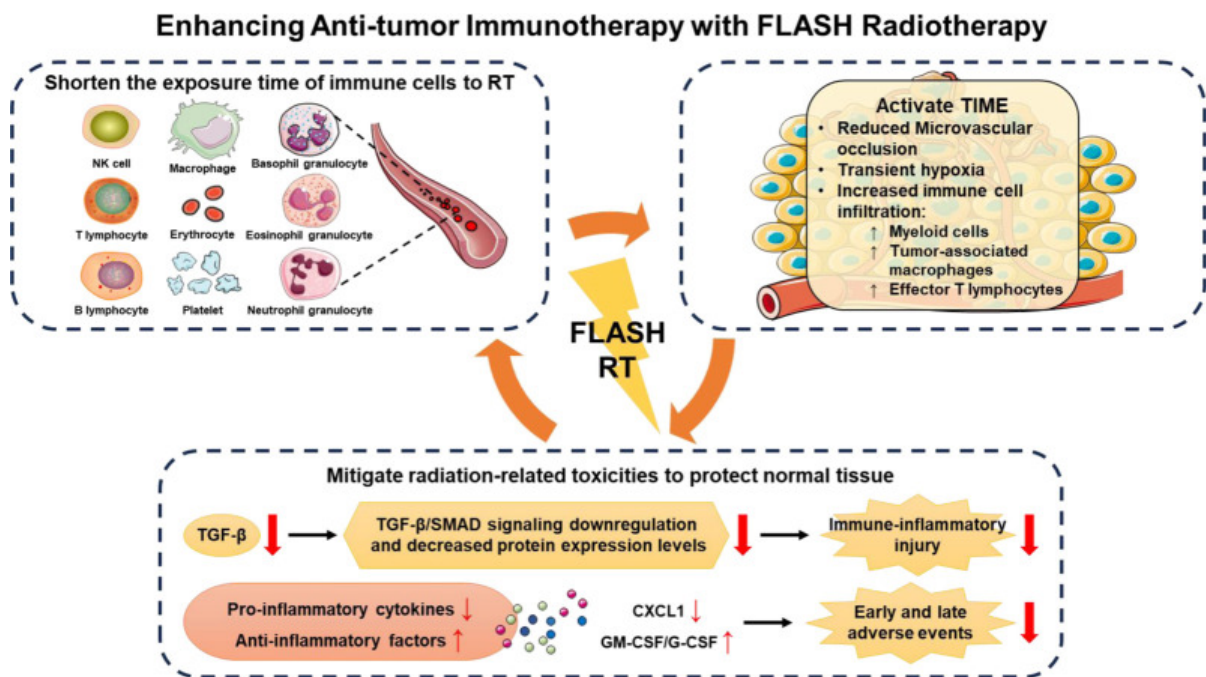


Figura 2.4: Possibili meccanismi attraverso cui la FLASH-RT modula la risposta immunitaria e potenzia l'efficacia dell'immunoterapia. In alto a sinistra è raffigurata la riduzione dell'esposizione delle cellule immunitarie circolanti alla dose di radiazione, con la conseguente preservazione della loro funzione. In alto a destra è mostrato l'aumento dell'infiltrazione immunitaria nel microambiente tumorale (TIME). In basso, l'attenuazione della tossicità infiammatoria nei tessuti sani attraverso la riduzione di specifici segnali biologici pro-infiammatori. Figura ripresa da [17].

tumori più facilmente riconosciuti e attaccati dalle difese immunitarie, rendendoli quindi più sensibili a una risposta antitumorale efficace [16][17].

Un altro meccanismo importante è quello che regola l'infiammazione, cioè la reazione del corpo a un danno. Dopo la radioterapia convenzionale si attivano maggiormente alcuni segnali biologici che possono favorire cicatrizzazioni anomale e irrigidimento dei tessuti, soprattutto a livello polmonare. Con la radioterapia FLASH, invece, questi segnali risultano meno intensi. Anche le molecole che normalmente amplificano l'infiammazione sembrano essere presenti in quantità minore. Questa risposta infiammatoria più contenuta potrebbe contribuire a spiegare perché la FLASH-RT sia associata a meno effetti collaterali nei tessuti sani [16][17].

L'insieme di questi effetti — preservazione delle cellule immunitarie circolanti, modulazione del microambiente tumorale e attenuazione dell'infiammazione nei tessuti sani — fornisce una base teorica per la possibile combinazione tra radioterapia FLASH e immunoterapia, in particolare con inibitori dei checkpoint immunitari, cioè farmaci che aiutano il sistema immunitario a riconoscere e attaccare meglio il tumore. Tuttavia, le evidenze attualmente disponibili sono ancora limitate e in gran parte precliniche, rendendo necessari ulteriori studi per chiarire il contributo specifico della risposta immunitaria all'effetto FLASH [17].

Capitolo 3

Evidenze sperimentali

Le evidenze sperimentali rappresentano un passaggio fondamentale per valutare la reale portata dell'effetto FLASH, in particolare per quanto riguarda il possibile incremento del rapporto terapeutico. Gli studi condotti finora includono sia esperimenti *in vivo*, su organismi animali, sia indagini *in vitro*, su linee cellulari tumorali e sane, e le prime applicazioni cliniche, utilizzando differenti tipologie di fasci. L'analisi congiunta di questi risultati consente di delineare un quadro complessivo delle potenzialità e dei limiti attuali della FLASH-RT, fornendo le basi scientifiche per una futura traduzione clinica.

3.1 *In vivo*

Gli studi *in vivo* costituiscono la principale fonte di evidenze a supporto dell'esistenza dell'effetto FLASH. Attraverso organismi animali, è stato possibile valutare direttamente la risposta dei tessuti sani e dei tumori all'irradiazione a dose ultra-alta, analizzando sia la tossicità acuta e tardiva sia l'efficacia antitumorale.

Gli esperimenti *in vivo* su animali permettono infatti di riprodurre la complessità

dell'organismo, includendo fattori quali la vascolarizzazione, il sistema immunitario e le interazioni tra differenti compartimenti tissutali, elementi che non possono essere completamente ricreati *in vitro*. I risultati ottenuti finora, distinti in base alla tipologia di fascio utilizzato, hanno fornito indicazioni promettenti sul potenziale risparmio dei tessuti sani senza perdita di controllo tumorale.

3.1.1 Fasci di elettroni

Nei studi sugli animali l'irradiazione a UHDR mediante fasci di elettroni ha ridotto la tossicità acuta e tardiva in diverse zone anatomiche, tra cui il sistema ematopoietico, la cute, il sistema nervoso centrale, il torace e l'addome.

I primi studi si sono concentrati sulla cute, dimostrando che l'irradiazione FLASH provoca reazioni cutanee meno gravi e di durata inferiore rispetto alla modalità convenzionale. Un esempio di trattamento radioterapico della cute su un animale (mini-pig) si può osservare nella Figura 3.1. Nel sistema ematopoietico la FLASH-RT ha mostrato una maggiore capacità di preservare le cellule staminali responsabili della produzione delle cellule del sangue.

Nel sistema nervoso centrale, esperimenti su murini¹ adulti e pediatrici hanno evidenziato come la radioterapia ad alti UHDR riduce il danno alla neurogenesi, ossia al processo di formazione di nuovi neuroni, e preserva funzioni cognitive come memoria e apprendimento, a differenza della CONV. Questo risultato assume particolare rilevanza, poiché la tossicità neurologica costituisce una delle principali limitazioni della radioterapia cerebrale.

¹Murini: roditori della sottofamiglia *Murinae*, tra cui principalmente topi e ratti, largamente utilizzati negli studi sperimentali.

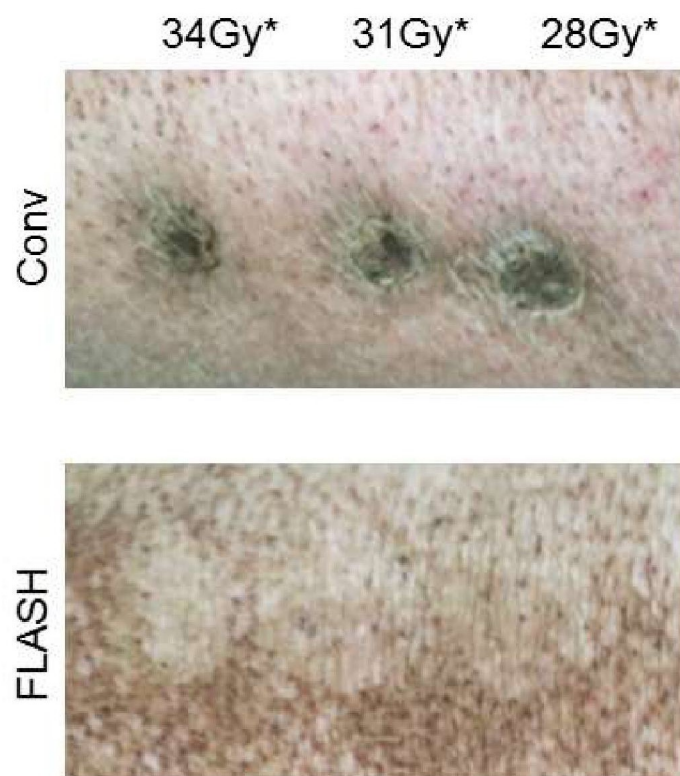


Figura 3.1: Cute di un mini-pig a 36 settimane dal trattamento radioterapico. Si presentano gravi lesioni fibronecrotiche nelle aree trattate con la CONV, mentre le zone irradiate con la FLASH-RT mostrano un aspetto cutaneo sostanzialmente normale. Immagine ripresa da [18], pannello B.

Anche a livello toracico, l'irradiazione FLASH ha mostrato una riduzione significativa della fibrosi polmonare e una minore attivazione di processi infiammatori. Analogamente, negli studi sull'addome, la FLASH-RT ha dimostrato di proteggere le cripte intestinali, strutture fondamentali per il rinnovamento della mucosa, limitando la tossicità gastrointestinale e preservando l'integrità del microbioma intestinale. Ad esempio in Figura 3.2, la rigenerazione cellulare nelle cripte, valutata mediante marcatura con BrdU — una molecola che si incorpora nel DNA delle cellule in proliferazione e le colora di marrone nelle immagini — risulta significativamente più rapida e robusta nei topi trattati con FLASH rispetto a quelli trattati con radioterapia convenzionale.

Un elemento centrale emerso da questi studi è che la protezione dei tessuti sani non sembra compromettere il controllo del tumore. In diversi organismi animali, infatti, la riduzione del volume tumorale ottenuta con FLASH-RT è risultata sovrapponibile a quella della radioterapia convenzionale.

Nel complesso, le evidenze *in vivo* indicano che la FLASH-RT potrebbe incrementare il rapporto terapeutico. Tuttavia, l'entità dell'effetto dipende da diversi parametri fisici del fascio (come dose per impulso e frequenza degli impulsi) e dal tipo di tessuto irradiato, rendendo necessari ulteriori studi prima di una piena applicazione clinica [8].

3.1.2 Fasci di fotoni

Risultati simili sono stati osservati anche con fasci di fotoni, sebbene le evidenze siano più limitate a causa delle complessità tecniche nell'erogazione a UHDR.

Montay-Gruel et al. [20] hanno irradiato il cervello di topi senza tumore con fasci convenzionali o UHDR: i topi trattati a UHDR hanno mantenuto la memoria e mostrato meno danni cellulari rispetto ai controlli convenzionali, confermando la protezione dei

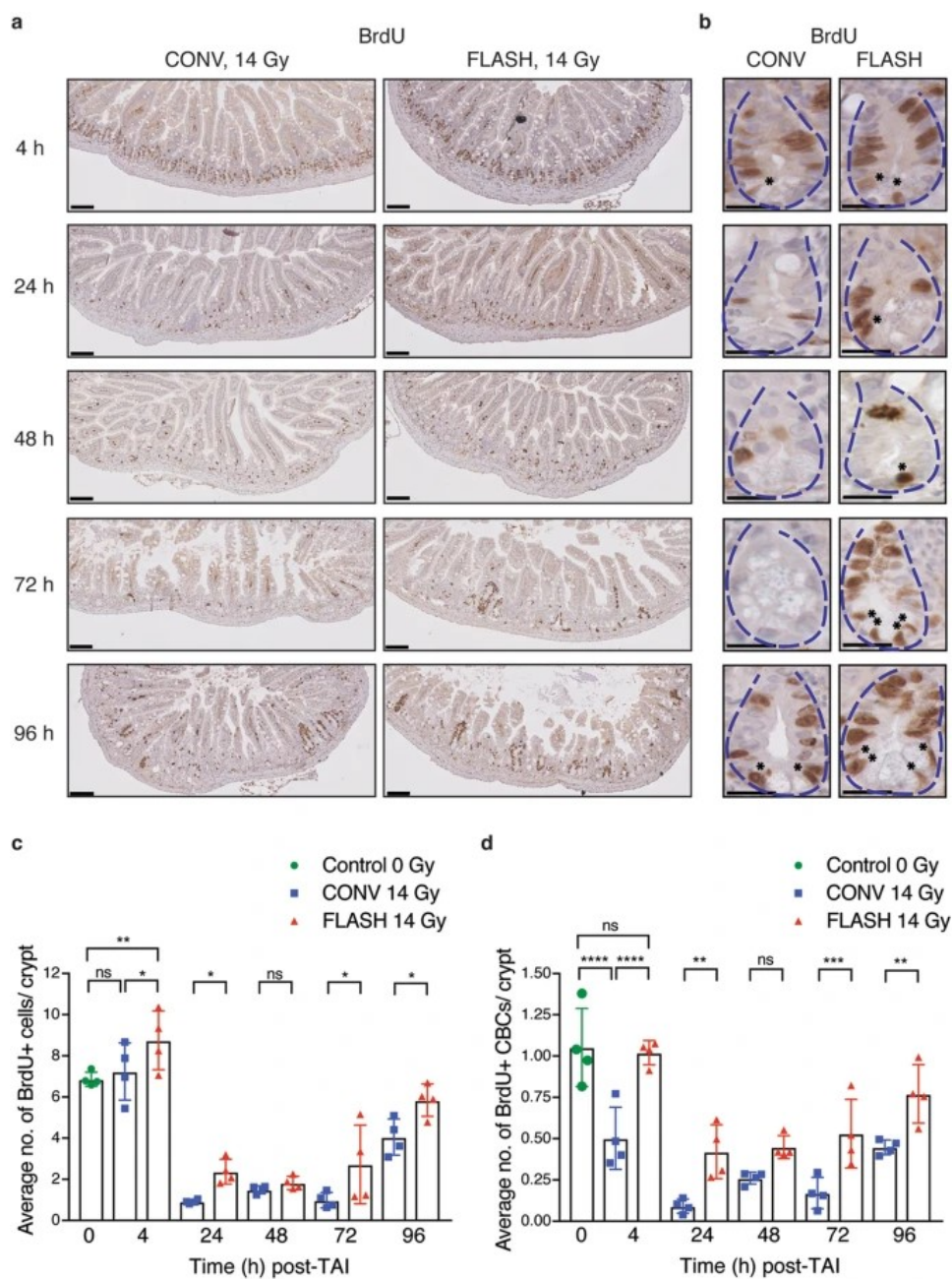


Figura 3.2: Confronto della rigenerazione delle cripte intestinali in topi sani trattati con radioterapia CONV o FLASH (14 Gy). Il pannello (a) mostra sezioni dell'intestino a diversi tempi dopo l'irradiazione: nei topi CONV le cellule in proliferazione diminuiscono progressivamente, mentre nei topi FLASH la rigenerazione è più rapida. Il pannello (b) mostra un ingrandimento delle cripte, con gli asterischi neri che indicano le cellule staminali alla base. I pannelli (c) e (d) confermano graficamente che il gruppo FLASH preserva un numero significativamente maggiore di cellule staminali attive rispetto al gruppo CONV, suggerendo una maggiore protezione della mucosa intestinale. Figura ripresa da [19].

tessuti sani.

Altri esperimenti su polmone e intestino hanno evidenziato risultati simili: nel polmone, UHDR ha preservato la struttura alveolare e ridotto l'infiammazione, migliorando la sopravvivenza; nell'addome, dosi leggermente inferiori (12 Gy) hanno aumentato la sopravvivenza rispetto alla radioterapia convenzionale.

Questi dati suggeriscono che i raggi X a ultra-alta dose possono riprodurre l'effetto FLASH, proteggendo i tessuti sani e aprendo nuove prospettive per la radioterapia di tumori profondi [9].

3.1.3 Fasci di protoni

Anche gli studi *in vivo* con fasci di protoni a dose ultra-alta hanno mostrato risultati promettenti.

Nella specie murina, l'irradiazione addominale con protoni FLASH ha ridotto la perdita di cellule staminali intestinali proliferanti rispetto alla radioterapia a dose convenzionale e ha limitato lo sviluppo di fibrosi intestinale a lungo termine, mantenendo la struttura tissutale simile a quella dei controlli non irradiati. Analogamente, l'irradiazione toracica di topi con UHDR ha determinato una riduzione fino al 30% della fibrosi polmonare, una minore incidenza di dermatite cutanea e un miglioramento significativo della sopravvivenza rispetto ai topi trattati con radioterapia convenzionale.

Per quanto riguarda il controllo tumorale, topi con carcinoma polmonare Lewis² irradiati con protoni FLASH hanno mostrato tumori significativamente più piccoli rispetto a quelli irradiati a dose convenzionale, suggerendo che il regime a dose ultra-alta possa preservare i tessuti sani senza compromettere l'efficacia antitumorale; come si può osservare

²Il carcinoma polmonare Lewis (Lewis Lung Carcinoma, LLC) è una linea tumorale murina ampiamente utilizzata nella ricerca oncologica preclinica.

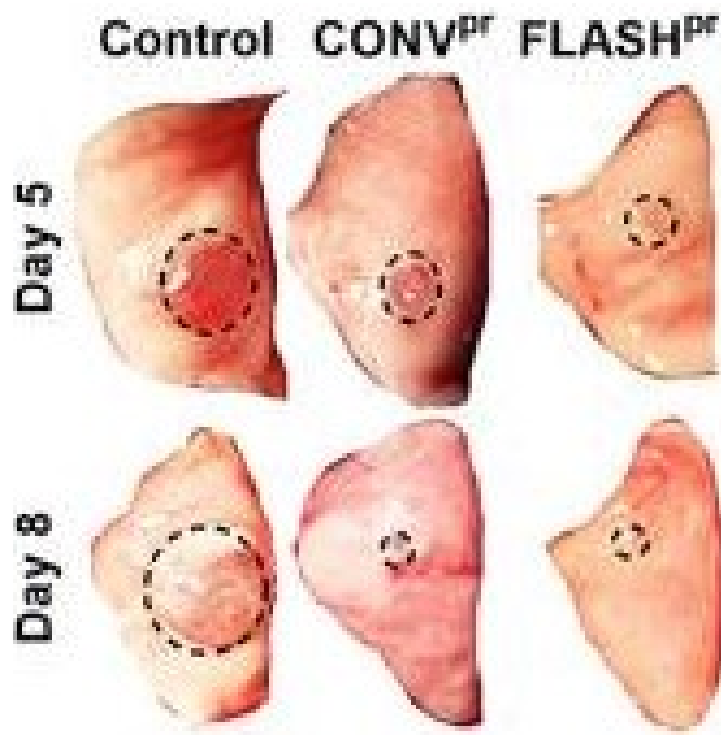


Figura 3.3: Lobo polmonare sinistro contenente il tumore di topi trattati con radiazione convenzionale e FLASH, ciascun gruppo al giorno 5 e al giorno 8 dopo l'irradiazione. Immagine ripresa da [21], pannello C.

in Figura 3.3. Inoltre, in alcuni studi sono stati osservati effetti positivi sull'infiltrazione immunitaria nel microambiente tumorale, con maggiore presenza di linfociti T nei tumori trattati con FLASH. Questi risultati supportano l'esistenza dell'effetto FLASH con protoni *in vivo*, evidenziando una riduzione della tossicità sui tessuti sani e, in alcuni casi, un miglioramento del controllo tumorale, aprendo prospettive interessanti per la traduzione clinica della radioterapia protonica a dose ultra-alta [10].

3.2 *In vitro*

Parallelemente agli studi *in vivo*, numerose indagini *in vitro* sono state condotte con l'obiettivo di comprendere i meccanismi cellulari alla base dell'effetto FLASH. Gli esperimenti su colture cellulari offrono la possibilità di studiare in modo controllato parametri fondamentali come la sopravvivenza clonogenica, ossia la capacità delle cellule di dividersi e formare nuove colonie, il danno al DNA e i processi di riparazione dei danni stessi, oltre alle risposte molecolari immediate allo stress da radiazioni. Questi studi permettono di isolare variabili specifiche, come il dose rate o la concentrazione di ossigeno, e di osservare le reazioni delle cellule senza l'influenza di altri fattori presenti nell'organismo vivente, come il sistema vascolare, il microambiente o le interazioni tra diversi tipi cellulari.

Nonostante questi vantaggi, i risultati ottenuti *in vitro* hanno mostrato differenze limitate tra irradiazione convenzionale e FLASH. In linee cellulari sane e tumorali, la sopravvivenza clonogenica e la formazione di foci di riparazione del DNA, come 53BP1 e γ -H2AX, risultano spesso simili, a meno di applicazioni di dosi molto elevate (>10 Gy), molto superiori a quelle necessarie per osservare l'effetto FLASH nei tessuti *in vivo*. Questi dati suggeriscono che gli endpoint tradizionali *in vitro*, come la morte cellulare e la riparazione del DNA, non siano i principali mediatori dell'effetto FLASH osservato negli organismi. In altre parole, le cellule da sole, senza la complessità del tessuto e del microambiente, sembrano incapaci di manifestare il beneficio protettivo osservato *in vivo*.

Proprio alla luce di questi risultati, la ricerca si è progressivamente orientata verso sistemi biologici più complessi, capaci di includere almeno in parte le interazioni tra popolazioni cellulari differenti. Un esempio è rappresentato dagli esperimenti di co-

coltura cellulare mostrati nella Figura 3.4 riportata nello studio “*First in vitro cell co-culture experiments using laser-induced high-energy electron FLASH irradiation for the development of anti-cancer therapeutic strategies*” [22]. In questo caso, cellule tumorali e cellule sane vengono coltivate insieme e irradiate mediante elettroni FLASH ad alta energia generati da sistemi laser. L’obiettivo non è soltanto valutare la risposta della singola linea cellulare, ma analizzare come la presenza simultanea di compartimento tumorale e tessuto sano possa influenzare la risposta biologica all’irradiazione. Questo approccio consente di studiare possibili effetti indiretti e dinamiche di comunicazione cellulare che nei modelli bidimensionali tradizionali risultano assenti, rappresentando quindi un passo intermedio tra le colture standard e i sistemi tridimensionali più avanzati.

Negli esperimenti *in vitro* è stato indagato il contributo dell’ossigeno, poiché si è ipotizzato che l’irradiazione FLASH possa ridurre temporaneamente la disponibilità nei tessuti, proteggendo così le cellule sane dal danno da radiazione. Tuttavia, studi *ex vivo* e misurazioni in tempo reale *in vivo* hanno dimostrato che la deplezione di ossigeno indotta dai fasci FLASH è troppo modesta per spiegare la protezione osservata nei tessuti sani. Solo modelli tridimensionali più complessi, come sfere cellulari o organoidi, che ricreano le regioni interne più ipossiche tipiche dei tessuti reali, hanno mostrato effetti transitori sulla disponibilità di ossigeno e un aumento moderato della sopravvivenza cellulare. Questo suggerisce che la struttura del tessuto e la distribuzione dell’ossigeno siano fattori importanti per l’insorgenza dell’effetto FLASH, evidenziando come la risposta cellulare sia influenzata non solo dalle proprietà intrinseche della singola cellula, ma anche dall’ambiente circostante.

Quindi gli studi *in vitro* hanno fornito finora solo indizi limitati sui meccanismi principali dell’effetto FLASH e sembrano più utili per testare ipotesi specifiche, come quella della dinamica dell’ossigeno. La relativa assenza di effetti marcati in modelli bidimensio-

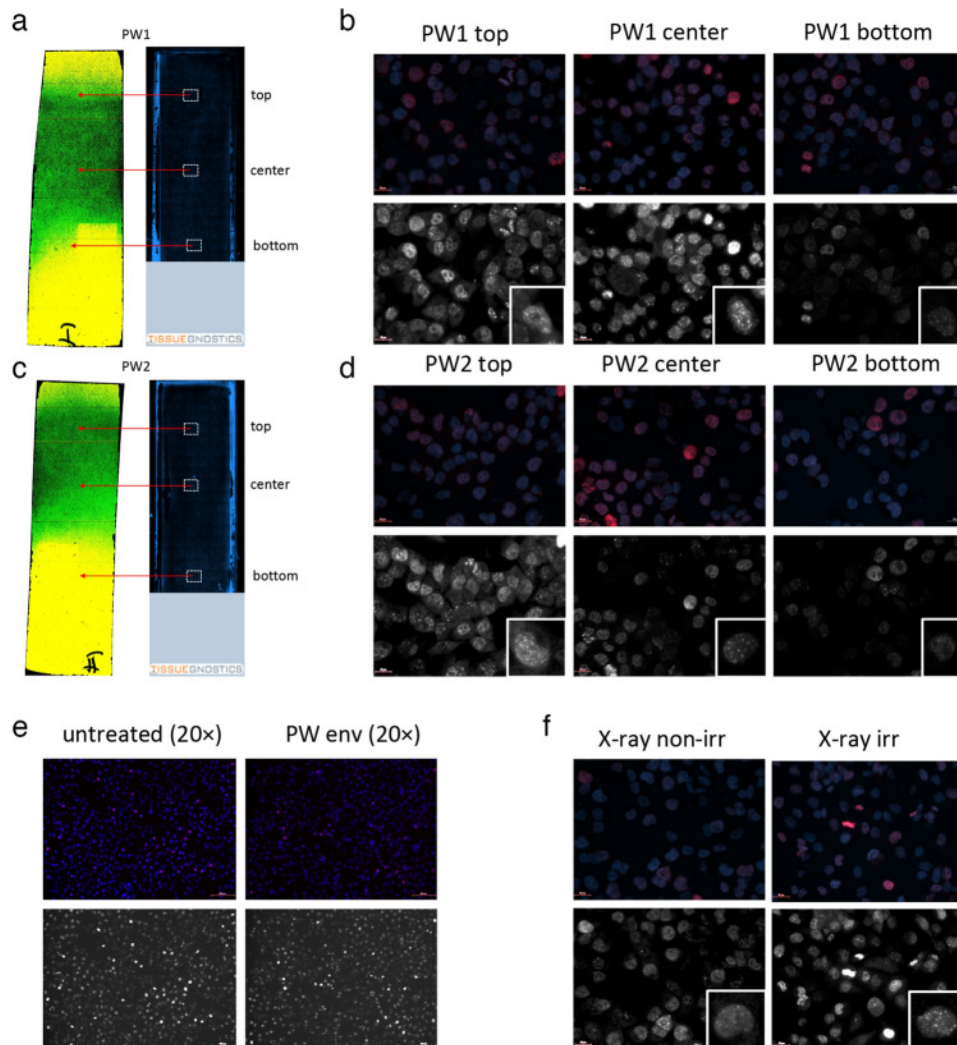


Figura 3.4: Analisi delle co-culture di cellule A375 melanoma e melanociti normali (Normal Human Epidermal Melanocytes, NHEM) dopo esposizione a fasci di elettroni (PW1 e PW2) e a raggi X pulsati. (a, c) Mostrano la distribuzione della dose sul contenitore. (b, d, f) Valutazione del danno al DNA a 30 minuti dall'irradiazione mediante immunofluorescenza per p- γ -H2AX, marcatore delle rotture a doppio filamento del DNA. I controlli negativi includono cellule non irradiate e cellule esposte solo all'ambiente del laboratorio (PW env). Le immagini combinano il colore blu dei nuclei e il rosso dei foci di DNA; in basso è mostrato solo il segnale rosso. (e) Vista panoramica dei campioni. (f) Ingrandimento dei nuclei con foci di DNA. Figura ripresa da [22].

nali sottolinea la necessità di sviluppare sistemi tridimensionali e organoidi che ricreino in modo più realistico il microambiente dei tessuti, permettendo così di ottenere dati meccanicistici più rilevanti e di ridurre la dipendenza dagli studi sugli animali. Questo approccio futuro appare cruciale per chiarire quali fattori cellulari e tissutali contribuiscono realmente alla protezione dei tessuti sani osservata con FLASH, e per trasferire queste conoscenze alla pratica clinica [1].

3.3 Applicazioni cliniche

La prima applicazione clinica su un paziente è avvenuta nel 2019 a Losanna, in Svizzera, trattando un linfoma cutaneo resistente con 15 Gy in 90 millisecondi. Il tumore si è ridotto rapidamente e la risposta completa è stata mantenuta per diversi mesi, con effetti collaterali sulla pelle limitati e reversibili. Successivi trattamenti su differenti siti hanno confermato la sicurezza e efficacia della tecnica [23][24].

Alcuni studi clinici pilota, come il trial FAST-01, hanno valutato la FLASH-RT su metastasi ossee dolorose, mostrando sollievo dal dolore significativo e assenza di effetti collaterali gravi. Successivamente, il trial FAST-02 ha ampliato questi studi su metastasi ossee toraciche, con lo scopo di valutare sia il sollievo dal dolore sia la sicurezza rispetto a organi critici come polmone e cuore. Tuttavia l'uso clinico della FLASH-RT è ancora limitato da vincoli tecnici: i fasci di elettroni convenzionali raggiungono solo tumori superficiali, mentre fasci più energetici o di protoni possono trattare tumori profondi, ma richiedono macchinari complessi e costosi. L'uso di raggi X a ultra-alta dose è ancora sperimentale [24].

Un altro aspetto importante riguarda dose e frazionamento: somministrare tutta la dose in un'unica sessione può ridurre i danni ai tessuti sani, ma dosi troppo basse o campi

molto grandi potrebbero ridurre l'effetto protettivo. Per questo, schemi ipofrazionati (dosi divise in poche sessioni) potrebbero essere la soluzione più equilibrata [24].

La radioterapia FLASH può anche essere combinata con altre terapie, aumentando l'efficacia complessiva: può supportare l'immunoterapia, migliorando la risposta del sistema immunitario; la chemioterapia, consentendo dosi più alte senza aumentare la tossicità; o la chirurgia, riducendo la massa tumorale prima o dopo l'intervento [24].

Infine, la sicurezza della FLASH-RT richiede protocolli rigorosi e strumenti di controllo avanzati per assicurare che la dose somministrata sia precisa. Diversi studi clinici in corso su melanoma cutaneo, metastasi ossee e tumori della pelle stanno valutando sicurezza, efficacia e tollerabilità, aprendo la strada a un possibile utilizzo più ampio di questa tecnologia in oncologia [23][24].

Capitolo 4

Prospettive di sviluppo e traduzione clinica

4.1 Dalla ricerca preclinica ai trial clinici

Nel 2019, la FLASH-RT ha fatto il suo debutto clinico a Losanna trattando un linfoma cutaneo refrattario, la cui riduzione rapida del tumore e la risposta completa mantenuta per mesi hanno portato all'avvio dei primi trial clinici pilota. Tra questi, il trial LANCE ha valutato pazienti con carcinoma basocellulare¹ e squamocellulare² cutaneo non candidabili a resezione chirurgica, confrontando FLASH-RT e radioterapia convenzionale in singola dose o in frazioni ipofrazionate. I risultati preliminari hanno confermato la buona tollerabilità e l'efficacia della FLASH-RT, in particolare nella riduzione della tossicità cutanea e nella protezione dei tessuti sani [25]. I trial FAST-01 e FAST-02, focalizzati

¹Con il termine "basocellulare" ci si riferisce a un tipo di tumore della pelle che origina dalle cellule basali, cioè le cellule più profonde dell'epidermide.

²Il termine "squamocellulare" indica un tipo di tumore della pelle che origina dalle cellule squamose, ossia un tipo di cellula presente nello strato superiore dell'epidermide.

sulle metastasi ossee dolorose, hanno confermato l'efficacia nel migliorare il sollievo dal dolore e la sicurezza, con effetti collaterali minimi anche per gli organi critici come cuore e polmoni [26].

Parallelamente agli studi clinici, la ricerca internazionale si è concentrata sullo sviluppo tecnologico necessario per una diffusione più ampia della FLASH-RT. Il progetto italiano FRIDA ha affrontato le sfide della produzione e del monitoraggio di fasci a dose ultra-alta con elettroni e protoni, sviluppando acceleratori dedicati, dosimetri lineari adattati a UHDR e software di pianificazione e simulazione dei trattamenti, fondamentali per una futura applicazione clinica [27]. In Francia, il progetto FRATHEA, guidato dall'Institut Curie in collaborazione con il CEA (Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives), mira a installare un irradiatore a elettroni ad altissima energia (Very High Energy Electrons, VHEE) presso l'ospedale di Orsay, con l'obiettivo di avviare i primi trial clinici su tumori profondi a prognosi sfavorevole entro il 2028. Il progetto integra lo sviluppo di strumenti di dosimetria avanzata, studi radiobiologici e gestione delle sfide ingegneristiche e regolatorie, consolidando la competenza internazionale nella tecnologia FLASH [28].

A livello globale, le GLMF Working Groups della Radiosurgery Society hanno promosso simposi e workshop per armonizzare parametri fisici, biologici e clinici di GRID³, LATTICE⁴ e FLASH-RT. Questi gruppi hanno favorito la condivisione di conoscenze tra centri di ricerca e clinici, contribuendo allo sviluppo di protocolli sperimentali e alla standardizzazione dei trial [26].

Questi sviluppi rappresentano le fondamenta su cui si baseranno le future applicazioni cliniche della FLASH-RT, le cui sfide tecnologiche e biologiche ancora aperte sono

³GRID: struttura regolare di elementi utilizzata in radioterapia per distribuire radiazioni.

⁴LATTICE: rete periodica di punti o celle usata in radioterapia per modellare la distribuzione di particelle o radiazioni.

discusse nei paragrafi seguenti.

4.2 Prospettive future

Le prospettive future della radioterapia FLASH richiedono un cambiamento importante nell'approccio alla ricerca. Non sarà più sufficiente osservare gli effetti della radiazione, ma sarà necessario sviluppare modelli predittivi in grado di integrare dati fisici e biologici per comprendere meglio il comportamento dei tessuti irradiati. Nonostante i risultati promettenti emersi dagli studi preclinici, i meccanismi alla base dell'effetto FLASH non sono ancora completamente chiari e rappresentano una delle principali sfide della ricerca attuale [29].

Strumenti sempre più utilizzati nella pianificazione dei trattamenti radioterapici sono l'intelligenza artificiale e il deep learning. Questi, nel caso della FLASH-RT, potrebbero diventare fondamentali, poiché i tempi di erogazione estremamente brevi rendono il trattamento molto sensibile anche a piccoli movimenti degli organi o a differenze nelle caratteristiche dei tessuti. Inoltre, uno degli obiettivi futuri è rendere questa terapia sempre più adatta alle caratteristiche biologiche individuali del paziente: a differenza della radioterapia convenzionale, già ampiamente personalizzata dal punto di vista dosimetrico, la FLASH-RT richiederà lo sviluppo di modelli biologici specifici capaci di tenere conto di parametri propri di questo regime di irradiazione, come lo stato di ossigenazione dei tessuti, la loro composizione cellulare e la risposta redox individuale. A tal fine, sarà necessario sviluppare tecniche non invasive in grado di monitorare in tempo reale questi parametri, che sembrano avere un ruolo determinante nel modulare l'effetto protettivo sui tessuti sani. [29].

Lo sviluppo della FLASH-RT richiederà quindi una forte collaborazione tra diverse

discipline, tra cui fisica, radiobiologia e informatica. In questo contesto, la creazione di registri internazionali che colleghino i parametri fisici dell'irradiazione con gli effetti biologici osservati potrebbe facilitare il confronto tra studi diversi e contribuire a rendere i risultati più riproducibili [29]. Sarà importante anche capire se l'effetto FLASH continui ad aumentare con l'aumentare del dose rate oppure se esista una soglia oltre la quale il beneficio tende a stabilizzarsi [30].

Dal punto di vista tecnologico, una delle principali limitazioni attuali riguarda le apparecchiature necessarie per generare dose rate così elevati. Gli acceleratori in grado di produrre questi fasci di radiazione richiedono infatti macchinari molto potenti, spesso grandi e costosi, che potrebbero richiedere la realizzazione di strutture dedicate. In futuro, lo sviluppo di tecnologie più compatte e accessibili potrebbe favorire una diffusione più ampia della FLASH-RT nella pratica clinica [30].

Per quanto riguarda le applicazioni cliniche, i primi ambiti in cui questa tecnica potrebbe essere utilizzata con maggiore facilità sono quelli in cui la riduzione della tossicità sui tessuti sani rappresenta un vantaggio particolarmente importante, come nei trattamenti conservativi d'organo o nei casi di re-irradiazione di tumori recidivi. In definitiva, una comprensione più approfondita dei meccanismi biologici e dei parametri fisici che regolano l'effetto FLASH sarà fondamentale per permettere una reale applicazione clinica di questa promettente tecnica radioterapica e sarà fondamentale per consentire una reale traduzione clinica della FLASH-RT e per trasformarla in uno strumento terapeutico consolidato [30].

Conclusioni

Il presente elaborato ha analizzato la radioterapia FLASH come tecnica innovativa con il potenziale di migliorare significativamente il rapporto terapeutico nella cura dei tumori. Attraverso l'esame dei meccanismi biologici proposti, delle evidenze sperimentali disponibili, delle prime applicazioni cliniche e delle prospettive di sviluppo futuro, emerge un quadro complessivo promettente ma ancora incompleto.

Le evidenze precliniche raccolte finora, sia *in vivo* che *in vitro*, indicano che l'erogazione a dose ultra-alta è in grado di ridurre la tossicità nei tessuti sani rispetto alla radioterapia convenzionale, mantenendo al contempo un'efficacia antitumorale comparabile. Questo effetto è stato osservato in diversi organismi animali e con differenti tipologie di fascio, tra cui elettroni, fotoni e protoni, suggerendo che il fenomeno non sia legato a una specifica sorgente di radiazione ma rappresenti una caratteristica intrinseca dell'irradiazione a dose ultra-alta.

Ciononostante, i meccanismi biologici alla base dell'effetto FLASH non sono completamente chiari: le ipotesi formulate, tra cui la deplezione radiolitica dell'ossigeno, le modificazioni del metabolismo redox, il ruolo della ferroptosi e la modulazione della risposta immunitaria, sembrano contribuire in modo combinato al fenomeno osservato, senza che nessuna di esse sia sufficiente da sola a spiegarlo completamente. In particolare, gli studi *in vitro* hanno mostrato effetti limitati rispetto a quelli osservati *in vivo*,

sottolineando come il microambiente tissutale e le interazioni tra popolazioni cellulari diverse giochino un ruolo fondamentale nella manifestazione dell'effetto FLASH.

Dal punto di vista tecnologico, le sfide legate alla generazione di fasci a dose ultra-alta rimangono significative. Lo sviluppo di apparecchiature più compatte, accessibili e dotate di sistemi di monitoraggio dedicati rappresenta una condizione necessaria per la diffusione clinica della FLASH-RT. In questo senso, i progressi nello sviluppo di acceleratori dedicati, sistemi di dosimetria adatti alle condizioni di dosi ultra-alte e programmi di ricerca internazionali volti alla realizzazione di infrastrutture sperimentali dedicate lasciano intravedere sviluppi concreti nei prossimi anni.

In conclusione, la radioterapia FLASH si configura come una delle direzioni più interessanti della ricerca radioterapica contemporanea. La sua piena traduzione clinica richiederà tuttavia un approfondimento dei meccanismi biologici sottostanti, lo sviluppo di modelli predittivi individualizzati e una stretta collaborazione tra fisica, radiobiologia e clinica. Se queste sfide verranno affrontate con successo, la radioterapia FLASH potrebbe rappresentare un importante passo avanti nella cura dei tumori, offrendo ai pazienti trattamenti più efficaci e meglio tollerati.

Appendice A

Parametri fisici fascio di elettroni

Parametro	Valori tipici	Descrizione del parametro
Dose totale	4-40 Gy	Dose complessiva somministrata al tessuto target durante il trattamento FLASH.
Rateo di dose medio	40-300 Gy/s	Dose totale divisa per il tempo complessivo di irradiazione; parametro chiave per osservare l'effetto FLASH
Rateo di dose istantaneo	$10^5 - 10^6$ Gy/s	Dose rilasciata durante le micro-pulsazioni; cruciale per l'effetto FLASH.
Dose per impulso	0.5-2 Gy	Dose rilasciata in ciascun impulso del fascio pulsato.
Tempo totale di esposizione	μs - 200 ms	Durata complessiva dell'irradiazione; tempi brevi favoriscono l'effetto FLASH.
Energia del fascio	4-20 MeV	Determina la profondità di penetrazione e la distribuzione spaziale della dose.

Tabella A.1: Parametri fisici principali di un fascio di elettroni FLASH [31].

Appendice B

Parametri fisici fascio di fotoni

Parametro	Valori tipici	Descrizione del parametro
Dose totale	5-25 Gy	Dose complessiva somministrata al tessuto target durante il trattamento FLASH.
Rateo di dose medio	40-300 Gy/s	Dose totale divisa per il tempo complessivo di irradiazione; parametro chiave per osservare l'effetto FLASH.
Rateo di dose istantaneo	fino a 4×10^6 Gy/s	Dose rilasciata durante le micro-pulsazioni; cruciale per l'effetto FLASH.
Dose per impulso	0.5-2 Gy	Dose rilasciata in ciascun impulso del fascio pulsato.
Tempo totale di esposizione	μ s - 200 ms	Durata complessiva dell'irradiazione; tempi brevi favoriscono l'effetto FLASH.
Energia del fascio	6-10 MeV	Determina la profondità di penetrazione del fascio; adatta a tumori profondi.

Tabella B.1: Parametri fisici principali dei fasci di fotoni ad alta energia utilizzati in FLASH-RT [9].

Appendice C

Parametri fisici fascio di protoni

Parametro	Valori tipici	Descrizione del parametro
Dose totale	10-99 Gy	Dose complessiva somministrata al tessuto target durante il trattamento FLASH.
Rateo di dose medio	40-200 Gy/s	Dose totale divisa per il tempo complessivo di irradiazione; parametro chiave per osservare l'effetto FLASH.
Rateo di dose istantaneo	10^4 - 10^9 Gy/s	Dose rilasciata durante le micro-pulsazioni; cruciale per l'effetto FLASH.
Dose per impulso	0,1-1 Gy	Dose rilasciata in ciascun impulso del fascio pulsato.
Tempo totale di esposizione	1-300 ms	Durata complessiva dell'irradiazione; tempi brevi favoriscono l'effetto FLASH.
Energia del fascio	70-230 MeV	Range energetico tipico della protonterapia clinica.

Tabella C.1: Parametri fisici principali di un fascio di protoni per irradiazione FLASH [32].

Bibliografia

- [1] M.-C. Vozenin et al., “FLASH: New intersection of physics, chemistry, biology, and cancer medicine,” *Reviews of Modern Physics*, 2024. DOI: 10.1103/RevModPhys.96.035002.
- [2] B. P. Ravindran, *Image Guided Radiation Therapy: Physics and Technology*. Institute of Physics Publishing, 2022. DOI: 10.1088/978-0-7503-3363-4.
- [3] S. Baatout, cur., *Radiobiology Textbook*. Springer International Publishing, 2023. DOI: 10.1007/978-3-031-18810-7.
- [4] R. Huang e P.-K. Zhou, “DNA damage repair: historical perspectives, mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy,” *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021. DOI: 10.1038/s41392-021-00648-7.
- [5] B. Lin et al., “FLASH Radiotherapy: History and Future,” *Frontiers in Oncology*, 2021. DOI: 10.3389/fonc.2021.644400.
- [6] V. Favaudon et al., “Ultrahigh dose-rate FLASH irradiation increases the differential response between normal and tumor tissue in mice,” *Science Translational Medicine*, 2014. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008973.
- [7] H. J. No et al., “Clinical Linear Accelerator-Based Electron FLASH: Pathway for Practical Translation to FLASH Clinical Trials,” *International Journal of Ra-*

- diation Oncology, Biology, Physics*, 2023. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2023.04.011.
- [8] N. Giannini et al., “Electron FLASH radiotherapy in vivo studies: A systematic review,” *Frontiers in Oncology*, 2024. DOI: 10.3389/fonc.2024.1373453.
- [9] P. Montay-Gruel, S. Corde, J. A. Laissue e M. Bazalova-Carter, “FLASH radiotherapy with photon beams,” *Medical Physics*, 2021. DOI: 10.1002/mp.15222.
- [10] J. R. Hughes e J. L. Parsons, “FLASH Radiotherapy: Current Knowledge and Future Insights Using Proton-Beam Therapy,” *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. DOI: 10.3390/ijms21186492.
- [11] F. Geirnaert, L. Kerkhove, P. Montay-Gruel, T. Gevaert, I. Dufait e M. D. Ridder, “Exploring the Metabolic Impact of FLASH Radiotherapy,” *Cancers (Basel)*, 2025. DOI: 10.3390/cancers17010133.
- [12] S. I. Glukhov, E. A. Kuznetsova e S. V. Akulinichev, “Factors Influencing the Biological Effects of FLASH Irradiation,” *Antioxidants*, 2025. DOI: 10.3390/antiox14111372.
- [13] I. G. Ali e I. E. Naqa, “The Biophysics of Flash Radiotherapy: Tools for Measuring Tumor and Normal Tissues Microenvironment,” *Antioxidants*, 2025. DOI: 10.3390/antiox14080899.
- [14] E. J. Hall e A. J. Giaccia, *Radiobiology for the Radiologist*, 7th. Lippincott Williams & Wilkins, 2012, ISBN: 978-1-60831-193-4.
- [15] A. Scarmelotto, V. Delprat, C. Michiels, S. Lucas e A.-C. Heuskin, “The oxygen puzzle in FLASH radiotherapy: A comprehensive review and experimental

- outlook,” *Clinical and Translational Radiation Oncology*, 2024. DOI: 10.1016/j.ctro.2024.100860.
- [16] G. Rosini, E. Ciarrocchi e B. D’Orsi, “Mechanisms of the FLASH effect: current insights and advances,” *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2025. DOI: 10.3389/fcell.2025.1575678.
- [17] Y. Wang, S.-N. Qi, N. Bi e Y.-X. Li, “FLASH radiotherapy combined with immunotherapy: From biological mechanisms to blockbuster therapeutics,” *Translational Oncology*, 2024. DOI: 10.1016/j.tranon.2024.102183.
- [18] M.-C. Vozenin et al., “The advantage of Flash radiotherapy confirmed in mini-pig and cat-cancer patients,” *Clinical Cancer Research*, 2019. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3375.
- [19] K. Levy et al., “Abdominal FLASH irradiation reduces radiation-induced gastrointestinal toxicity for the treatment of ovarian cancer in mice,” *Scientific Reports*, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-78588-0.
- [20] P. Montay-Gruel et al., “Irradiation in a flash: Unique sparing of memory in mice after whole brain irradiation with dose rates above 100 Gy/s,” *Radiotherapy and Oncology*, 2017. DOI: 10.1016/j.radonc.2017.05.003.
- [21] S. Shukla et al., “Ultra-High Dose-Rate Proton FLASH Improves Tumor Control,” *Radiotherapy and Oncology*, 2023. DOI: 10.1016/j.radonc.2023.109741.
- [22] S. Orobeti et al., “First in vitro cell co-culture experiments using laser-induced high-energy electron FLASH irradiation for the development of anti-cancer therapeutic strategies,” *Scientific Reports*, 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-65137-7.

- [23] J. S. Kim e H. J. Kim, “FLASH radiotherapy: bridging revolutionary mechanisms and clinical frontiers in cancer treatment – a narrative review,” *Ewha Medical Journal*, 2024. DOI: 10.12771/emj.2024.e54.
- [24] X.-X. Yang, H. Luo, J.-J. Zhang, H. Ge e L. Ge, “Clinical translation of ultra-high dose rate flash radiotherapy: Opportunities, challenges, and prospects,” *World Journal of Radiology*, 2025. DOI: 10.4329/wjr.v17.i4.105722.
- [25] R. Kinj et al., “Randomized phase II selection trial of FLASH and conventional radiotherapy for patients with localized cutaneous squamous cell carcinoma or basal cell carcinoma: A study protocol,” *Clinical and Translational Radiation Oncology*, 2024. DOI: 10.1016/j.ctro.2024.100743.
- [26] J. W. Snider, N. A. Mayr, J. Molitoris, C. N. Coleman, M. Ahmed e I. Charles B. Simone, “The Radiosurgery Society Working Groups on GRID, LATTICE, Microbeam, and FLASH Radiotherapies: Advancements Symposium and Subsequent Progress Made,” *Practical Radiation Oncology*, 2024. DOI: 10.1016/j.prro.2024.09.015.
- [27] I. C. Division e D. F. Romano, *FRIDA - FLASH Radiotherapy with High Dose-rate Particle Beams*, 2023. indirizzo: <https://www.ct.infn.it/it/on-going-projects/frida.html>.
- [28] I. Curie, *Institut Curie Enters a New Era of FLASH Radiotherapy*, 2024. indirizzo: <https://institut-curie.org/news/institut-curie-enters-new-era-flash-radiotherapy>.
- [29] Y. Di, L. Meng, Y. Wang e J. Li, “Advances in FLASH radiation therapy: A review on biological foundations and clinical prospects,” *Translational Oncology*, 2026. DOI: 10.1016/j.tranon.2026.102676.

- [30] M.-C. Vozenin, P. Montay-Gruel, P. Tsoutsou e C. L. Limoli, “Mechanisms, challenges and opportunities for FLASH radiotherapy in cancer,” *Nature Reviews Cancer*, 2026. DOI: 10.1038/s41568-025-00878-9.
- [31] E. Schüler, M. Acharya, P. Montay-Gruel, B. W. Loo Jr, M.-C. Vozenin e P. G. Maxim, “Ultra-high dose rate electron beams and the FLASH effect: from pre-clinical evidence to a new radiotherapy paradigm,” *Medical Physics*, 2022. DOI: 10.1002/mp.15442.
- [32] K. P. Nesteruk e S. Psoroulas, “FLASH Irradiation with Proton Beams: Beam Characteristics and Their Implications for Beam Diagnostics,” *Applied Sciences*, 2021. DOI: 10.3390/app11052170.