

Predisposizione al cancro del pancreas: ruolo dei polimorfismi dei geni *XRCC1*, *XRCC3* e *CYP1A1**

Alessandra Falda, Filippo Navaglia, Carlo-Federico Zambon*, Paola Fogar *, Nicoletta Gallo, Eliana Greco, Piero Bonvicini, Daniela Basso, Sergio Pedrazzoli*, Mario Plebani

Servizio di Medicina di Laboratorio, *Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università-Ospedale di Padova

ABSTRACT

Pancreas cancer predisposition: role of genes *XRCC1*, *XRCC3* and *CYP1A1* polymorphisms

Background: An individual predisposition to cancer might be searched in polymorphisms of genes involved in DNA repair, as X-Ray Cross-Complementing (XRCCs), or involved in carcinogens activation, as Cytochrome p450 (CYP1A1). Our aims were to: 1. ascertain whether there was any association between the XRCC1+22163 C/T (Arg194Trp), XRCC1+24011 G/A (Arg399Gln), XRCC3+16064 C/T (Thr241Met) or CYP1A1+4889 A/G (Ile462Val) polymorphisms and pancreatic cancer; 2. verify any correlation between the serum levels of vitamins A and E and cancer diagnosis, staging, grading and survival. Patients and Methods: We studied 91 pancreatic cancer patients (CP) and 29 with chronic pancreatitis (PC). Survival was available for 44 CP. The genetic polymorphisms were analysed by RFLP. Serum vitamins A and E were measured by an HPLC procedure. Results: XRCC1+22163 C/T, XRCC1+24011 G/A, XRCC3+16064 C/T and CYP1A1+4889 A/G were not correlated with diagnosis. None polymorphism was correlated with tumor stage, tumor grade, or the onset of metastases after surgery. Survival was influenced only by stage (Log rank=12.4, $p<0.01$). In patients with less, not in those with more than 60 yrs, XRCC1+22163 CT was significantly correlated with CP (Fisher's exact test: $p<0.05$). On the contrary the genotype XRCC+22163 CC/XRCC+24011 AA was less frequently detected in patients with CP respect finding in patients with PC (Fisher's exact test: $p<0.01$). Vitamins A and E levels did not significantly differ between CP and PC. Vitamin A was significantly lower in stage III-IV (556 ± 53 nmol/L, mean \pm SE) than stage I-II CP (896 ± 112)($t=3.08$, $p<0.01$). The lowest serum levels of vitamin E were in CP patients who developed liver or local metastases after surgery (10.71 ± 1.4 umol/L, mean \pm SE), with respect to those who developed lung metastases (22.2 ± 2.9)($F=8.41$, $p<0.01$). Conclusions: XRCC1+22163 CT genotype seems involved in favouring CP in subjects with less than 60 yrs; XRCC+22163 CC/XRCC+24011 AA genotype seems to be a protective factor for CP development. These effects might be consequent to an altered protein efficiency in DNA repair. Finally, the antioxidant vitamins A and E might partly counteract tumor growth and spread.

RIASSUNTO

Premessa: una predisposizione individuale al cancro potrebbe essere ricercata nei polimorfismi dei geni preposti alla riparazione del danno al DNA, quali gli X-Ray Cross-Complementing (XRCCs), oppure coinvolti nella attivazione di carcinogeni, come il citocromo p450 (CYP1A1). Scopi: 1. verificare eventuali associazioni tra i polimorfismi dei geni XRCC1+22163 C/T (Arg194Trp), XRCC1+24011 G/A (Arg399Gln), XRCC3+16064 C/T (Thr241Met) e CYP1A1+4889 A/G (Ile462Val) ed il carcinoma pancreatico; 2. valutare possibili correlazioni tra i livelli sierici delle vitamine A ed E e la diagnosi di neoplasia pancreatica, lo stadio, il grado istologico e la sopravvivenza. Pazienti e metodi: abbiamo studiato 91 soggetti con carcinoma del pancreas (CP) e 29 soggetti affetti da pancreatite cronica (PC). Dati relativi alla sopravvivenza dei pazienti affetti da CP erano disponibili per 44 soggetti. I polimorfismi genetici sono stati analizzati mediante RFLP. I dosaggi sierici delle vitamine A ed E sono stati effettuati mediante HPLC. Risultati: i polimorfismi XRCC1+22163C/T, XRCC1+24011 G/A, XRCC3+16064 C/T e CYP1A1+4889 A/G non correlavano con la diagnosi. Nessun polimorfismo era associato allo stadio della neoplasia, al grado istologico, oppure allo sviluppo di metastasi dopo l'intervento chirurgico. La sopravvivenza era influenzata solamente dallo stadio (Log rank=12.4, $p<0.01$). Solo nei pazienti con meno di 60 anni XRCC1+22163 C/T era significativamente correlato al CP (Fisher's exact test: $p<0.05$). Al contrario il genotipo XRCC+22163 CC/XRCC+24011 AA era meno frequentemente riscontrato nei pazienti con CP rispetto a quelli con PC (Fisher's exact test: $p<0.01$). I livelli di vitamina A ed E non differivano in modo significativo tra i CP e le PC. Nei pazienti con CP i livelli sierici di vitamina A erano significativamente inferiori negli stadi III-IV (556 ± 53 nmol/L, media \pm ES) rispetto agli stadi I-II (896 ± 112)($t=3.08$, $p<0.01$). I più bassi livelli sierici di vitamina E sono stati riscontrati nei soggetti neoplastici che hanno sviluppato metastasi locali o epatiche dopo chirurgia (10.71 ± 1.4 umol/L,

*Lavoro premiato al Congresso SIBioC 2004, Padova. Accettato nel 2005

media \pm SE), in rapporto a quelli che hanno sviluppato metastasi a livello polmonare (22.2 \pm 2.9)(F=8.41, p<0.01). Conclusioni: il genotipo XRCC1+22163 C/T sembra essere un fattore di rischio per l'adenocarcinoma pancreatico ad insorgenza precoce (<60 anni); il genotipo XRCC+22163 CC/XRCC+24011 AA sembra essere un fattore protettivo per lo sviluppo del carcinoma pancreatico. Questi effetti potrebbero essere conseguenti ad un'alterata efficienza nella riparazione del DNA da parte di proteine preposte. Infine, le vitamine antiossidanti A ed E, potrebbero in parte contrastare la crescita e la diffusione della neoplasia.

INTRODUZIONE

Il carcinoma pancreatico è la quinta causa di morte per tumore nei Paesi industrializzati. Il tasso di mortalità, che negli Stati Uniti è stato di circa 30.000 morti nell'anno 2000 (1), è quasi uguale a quello di incidenza, nonostante i progressi ottenuti sia a livello diagnostico che terapeutico. La sopravvivenza a cinque anni dal momento della diagnosi è inferiore al 5%. Anche se la patogenesi di questo tumore è tuttora poco conosciuta, un aumentato rischio è stato correlato all'abitudine al fumo di sigaretta, all'eccessivo introito di calorie con la dieta e alla familiarità per tumori al colon, endometrio, ovaio e mammella (2). Lo studio del genoma umano ha permesso di chiarire molti dei meccanismi molecolari che portano allo sviluppo delle neoplasie. Un'incidenza elevata di mutazioni a livello dei geni nucleari codificanti per proteine che controllano il ciclo cellulare è stata riscontrata nelle cellule tumorali pancreatiche, non solo quando il cancro è in fase avanzata, ma anche nei suoi primi stadi di sviluppo (3-5). I principali geni nucleari mutati nelle cellule tumorali pancreatiche sono l'oncogene *K-ras*, gli oncosoppressori *p53*, *p16* e *DPC4*. Non è ancora chiaro se tutte le mutazioni geniche suddette siano causa o conseguenza della trasformazione neoplastica delle cellule duttali pancreatiche e la loro determinazione è attendibile quando vengono utilizzati, come materiale di partenza, campioni di tessuto pancreatico, succo biliare o succo pancreatico (6-8).

Il fumo di sigaretta è il principale fattore di rischio per l'adenocarcinoma del pancreas (9-11). Il fumo di sigaretta

contiene una grande quantità di carcinogeni, comprese le amine aromatiche, le nitrosamine tabacco-specifiche, gli agenti alchilanti, gli idrocarburi policiclici aromatici e le amine aromatiche eterocicliche. Attualmente è accettato il fatto che la maggior parte dei carcinogeni presenti nel fumo di sigaretta sono in primo luogo attivati da un ristretto numero di specie di citocromo *P-450*, tra cui *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2E1* e *CYP3A*, e successivamente metabolizzati dalla glutatione-S-transferasi (GST) (12-13). I polimorfismi del gene *CYP1A1*, in particolare, sono stati associati ad un aumentato rischio di tumori correlati al tabacco (polmone e vescica) (14). In letteratura sono riportati pochi dati, al riguardo, sul carcinoma del pancreas. Liu et al. (15) non hanno trovato alcuna associazione tra il rischio di cancro pancreatico e i polimorfismi dei geni *GSTM1*, *GSTT1* e *CYP1A1* e cancro pancreatico, mentre Li et al. (16) hanno riscontrato un aumentato livello di addotti aromatici al DNA nei pazienti con il cancro pancreatico in correlazione alla mutazione omozigote *MspI* del *CYP1A1*, che implica un'aumentata attività dell'enzima. La carcinogenesi legata al fumo di sigaretta potrebbe essere dovuta al danno ossidativo del DNA a cui segue l'attivazione degli oncogeni e l'inibizione degli oncosoppressori. Tra le particelle del fumo di sigaretta ci sono i chinoni che entrano nel ciclo redox generando specie reattive dell'ossigeno che, a loro volta, potrebbero danneggiare il DNA nucleare (17). Il danno ossidativo del DNA nucleare può essere riparato dall'azione di enzimi, tra i quali quelli codificati dai geni *XRCC1* e *XRCC3* (X-ray repair cross complementing) (18). Questi due geni presentano un polimorfismo

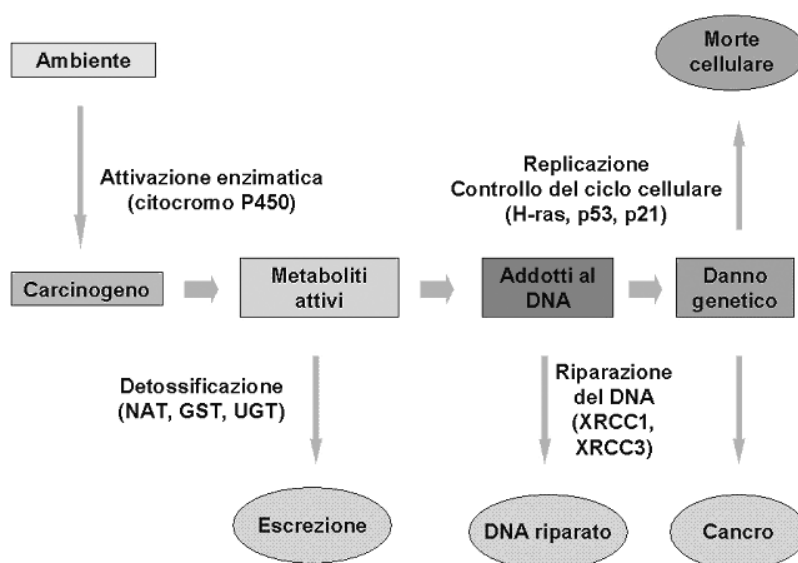


Figura 1

Ruolo dei meccanismi di detossificazione e di riparo del DNA nel processo di cancerogenesi.

genetico che sembra correlato con una diversa attività enzimatica. In particolare i polimorfismi XRCC1-Arg194Trp, XRCC1-Arg399Gln e XRCC3-Thr241Met sono stati associati ad un aumento dei livelli di addotti del DNA dopo l'esposizione al fumo di sigaretta e sembrano giocare un ruolo nel favorire l'inizio del cancro della vescica tra i fumatori (19) (figura 1). Poco o nulla si conosce sugli effetti dei polimorfismi dei geni codificanti gli enzimi coinvolti nella attivazione dei carcinogeni presenti nel fumo di sigaretta e nel riparo del danno al DNA nella carcinogenesi pancreatico.

In un interessante studio realizzato utilizzando un modello in vivo di carcinogenesi epatica (20), si è dimostrato che la supplementazione di vitamina E antiossidante nella dieta di topi transgenici, che iperesprimevano TGF α e c-myc, diminuiva del 65% l'incidenza degli adenomi e impediva la trasformazione maligna. Questi effetti risultavano associati alla prevenzione dello sviluppo di mutazioni coinvolte nei primi stadi della carcinogenesi. In uno studio epidemiologico realizzato su larga scala riguardante il cancro del pancreas (21) è stato dimostrato che la sola abitudine dietetica che sembra prevenire l'inizio dell'adenocarcinoma pancreatico è il grande consumo di crucifere, che contengono grandi quantità di vitamina E. Ciò suggerisce che la prevenzione del fenomeno ossidativo potreb-

be giocare un ruolo protettivo anche per il tumore del pancreas.

Scopi

Gli scopi del nostro studio sono stati:

1) verificare se i polimorfismi dei geni CYP1A1 +4889 A/G (Ile462Val), XRCC1 +22163 C/T (Arg194Trp), XRCC1 +24011 G/A (Arg399Gln) e XRCC3 +16064 C/T (Thr241Met) possano aumentare il rischio di neoplasia pancreatico;

2) verificare se i livelli delle vitamine A e E siano correlati allo stadio e al grading della neoplasia pancreatico e alla sopravvivenza.

Pazienti e metodi

Per lo studio sono stati arruolati 91 pazienti affetti da adenocarcinoma duttale del pancreas (intervallo di età 46-83 anni) sottoposti ad intervento chirurgico. La figura 2 riporta lo stadio ed il grading delle neoplasie. Metastasi sono state riscontrate nel 78% dei casi. Il dato sulla sopravvivenza, che variava tra 1 e 24 mesi (mediana di 19 mesi), era disponibile per 44 pazienti.

Sono stati infine studiati 29 pazienti con pancreatite

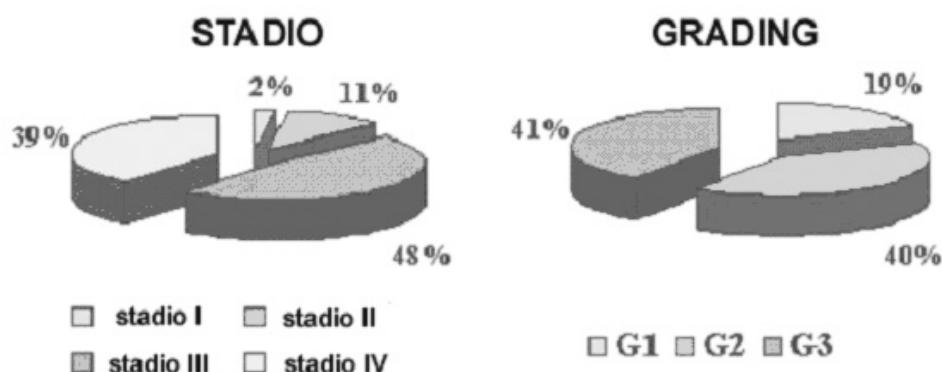


Figura 2

Stadio e grading delle neoplasie del pancreas dei pazienti arruolati nello studio.

Tabella 1

Lunghezze dei frammenti di DNA ottenuti dopo digestione enzimatica.

La base soggetta a variazione è indicata tra gli asterischi. n= qualsiasi base.

Polimorfismo	Enzima e sequenza bersaglio	Lunghezza dei prodotti dopo digestione (bp)	
XRCC1 c/t + 22163 (Arg194Trp)	Hpa II c*c*gg	allele t: 264	allele c: 226+38
XRCC1 g/a + 24011 (Arg399Gln)	Hpa II cc*g*g	allele a: 295	allele g: 246+49
XRCC3 c/t + 16064 (Thr241Met)	NlaIII ca**g	allele c: 273	allele t: 201+72
CYP1A1 a/g + 4889 (Ile462Val)	MaeIII *g*tnac	allele a: 153+93	allele g: 137+93+16

cronica della stessa età (intervallo 41-73 anni), sesso, abitudine al fumo e provenienti dalla stessa area geografica.

A tutti i pazienti è stato prelevato un campione di sangue per l'estrazione del DNA e la determinazione dei livelli sierici di vitamina A ed E.

I polimorfismi genetici di *CYP1A1*, di *XRCC1* e *XRCC3* sono stati evidenziati mediante amplificazione PCR seguita da digestione con enzimi di restrizione. La tabella 1 riporta il tipo di enzima utilizzato e la lunghezza dei prodotti ottenuti dopo digestione.

I frammenti di digestione sono stati risolti mediante elettroforesi su gel di agarosio (SeaKem 2% + NuSieve 1%, Biowhittaker Molecular Application, Rockland, USA) ed evidenziati mediante colorazione con bromuro di etidio. La figura 3 riporta, a titolo di esempio, i risultati ottenibili per i due polimorfismi del gene *XRCC1*.

Infine, da un campione di siero sono stati valutati i livelli

di vitamine A e C con metodo HPLC.

I test statistici utilizzati sono stati: Analisi della Varianza (Anova one-way), test t di Student, test del χ^2 , test di Fisher e Log rank test.

RISULTATI

La tabella 2 riporta la frequenza genotipica e l'analisi di Hardy-Weinberg relativi ai quattro polimorfismi studiati.

I polimorfismi di *XRCC1* non risultavano correlati con quello di *XRCC3* o di *CYP1A1*. I due polimorfismi di *XRCC1* risultavano fra di loro correlati ($\chi^2=24.07$, $p<0.001$); in particolare il genotipo C/T di *XRCC1+22163* risultava associato al genotipo G/G di *XRCC1+24011*.

La tabella 3 riporta le frequenze genotipiche dei polimorfismi di *XRCC1*, di *XRCC3* e di *CYP1A1* nelle singole categorie di pazienti arruolati. Nei pazienti affetti da pan-

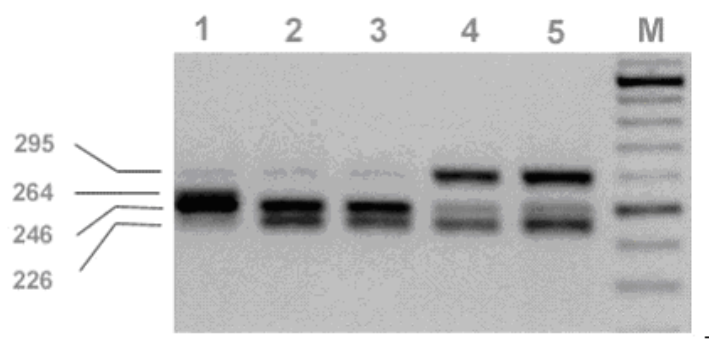


Figura 3

Elettroforesi su gel di agarosio dei prodotti di amplificazione PCR di *XRCC1* dopo digestione enzimatica con *Hpa II*. Le due regioni contenenti i polimorfismi +22163 C/T (Arg194Trp) e +24011 G/A sono state coamplificate e codigerte. M = marker di peso molecolare (50 bp ladder); 1= genotipo ct+22163/gg+24011; 2,3= genotipo cc+22163/gg+24011; 4,5= genotipo cc+22163/ga+24011.

Tabella 2

Frequenze genotipiche e analisi di Hardy-Weinberg dei polimorfismi analizzati.

Polimorfismo	Genotipo (frequenza)			Hardy Weinberg
XRCC1+22163	C/C (0.85)	C/T (0.14)	T/T (0.01)	$\chi^2=0.01$, p:ns
XRCC1+24011	A/A (0.11)	A/G (0.42)	G/G (0.47)	$\chi^2=1.29$, p:ns
XRCC3+16064	C/C (0.35)	C/T (0.46)	T/T (0.19)	$\chi^2=2.50$, p:ns
CYP1A1+4889	A/A (0.89)	A/G (0.10)	G/G (0.01)	$\chi^2=1.85$, p:ns

Tabella 3

Numero dei casi e percentuale (in parentesi) dei pazienti suddivisi sulla base della diagnosi (CP=adenocarcinoma del pancreas, PC=pancreatite cronica) e dei genotipi dei polimorfismi analizzati.

XRCC1+22163	C/C	C/T	T/T	XRCC1+24011	A/A	A/G	G/G
CP	73 (80%)	17 (19%)	1 (1%)	CP	9 (10%)	32 (35%)	50 (55%)
PC	27 (93%)	2 (7%)	0	PC	8 (28%)	11 (38%)	10 (34%)

XRCC3+16064	C/C	C/T	T/T	CYP1A1+4889	A/A	A/G	G/G
CP	23 (25%)	53 (58%)	15 (17%)	CP	81 (89%)	10 (11%)	0
PC	10 (34%)	13 (45%)	6 (21%)	PC	27 (93%)	2 (7%)	0

Tabella 4

Numero dei casi e percentuale (in parentesi) di pazienti con età inferiore a 60 anni suddivisi sulla base della diagnosi (CP=adenocarcinoma del pancreas, PC=pancreatite cronica) e del genotipo XRCC1 +22163.

XRCC1+22163	C/C	C/T	T/T
CP	13 (72%)	5 (28%)	0
PC	19 (100%)	0	0

creatite cronica si evidenziava una minore frequenza del genotipo XRCC1 +22163 C/T, anche se non statisticamente significativo, ed un aumento della frequenza degli omozigoti XRCC1+24011 A/A rispetto ai soggetti affetti da carcinoma.

I pazienti sono stati quindi suddivisi sulla base dell'età, inferiore o superiore a 60 anni, e nei due gruppi è stata effettuata l'analisi statistica dei polimorfismi che è risultata statisticamente significativa per XRCC1 +22163 ($\chi^2= 6.1$, $p<0.05$) nei pazienti di età inferiore ai 60 anni. In particolare, il genotipo CT risultava statisticamente correlato con la diagnosi di adenocarcinoma (Fisher exact test: $p<0.05$) (tabella 4).

Abbiamo quindi considerato le combinazioni genotipiche di XRCC1 +22163 e XRCC1 + 24011:

- XRCC1 +22163 CC / XRCC1+24011 AA
- XRCC1 +22163 CC / XRCC1+24011 AG

Tabella 5

Analisi di regressione logistica: polimorfismo XRCC1 e tabagismo = variabili predittive; diagnosi (carcinoma pancreatico o pancreatite cronica) = variabile dipendente

	P=	Exp (B)	IC
XRCC1+24011	0.01	5.48	1.42-21.22
Tabagismo	0.13	4.69	0.62-35.08

- XRCC1 +22163 CC / XRCC1+24011 GG
- XRCC1 +22163 CT / XRCC1+24011 AA
- XRCC1 +22163 CT / XRCC1+24011 AG
- XRCC1 +22163 CT / XRCC1+24011 GG

Per la rarità del genotipo XRCC1 +22163 TT non sono state considerate le altre possibili combinazioni. La frequenza del carcinoma pancreatico risultava ridotta nei soggetti con genotipo XRCC1 +22163 CC / XRCC1 +24011 AA rispetto alle altre combinazioni considerate globalmente (Test di Fisher: $p<0.01$; Odds ratio: 4.19, IC:1.45-12.13).

Nessuno dei polimorfismi studiati risultava correlato con le seguenti caratteristiche anatomico-cliniche del carcinoma pancreatico: stadio, grading, metastasi a distanza.

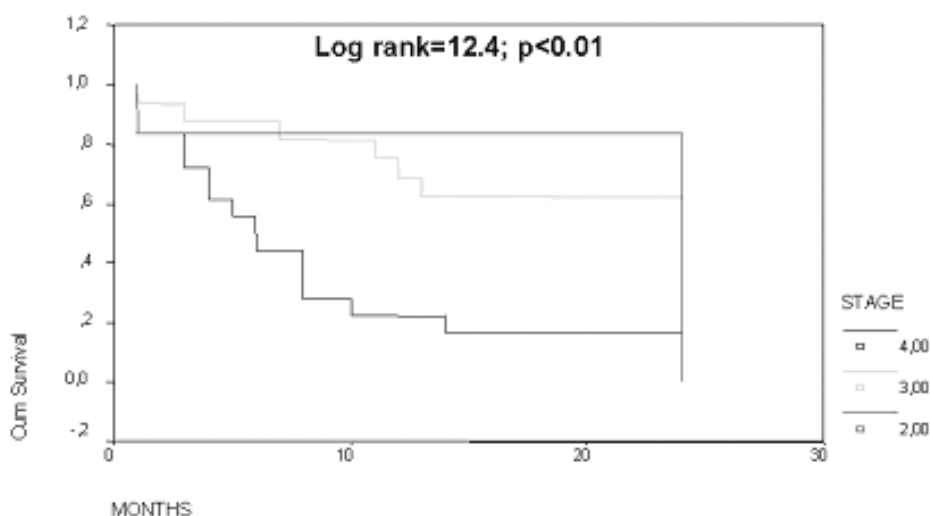
La tabella 5 riporta i risultati della analisi di regressione logistica considerando il polimorfismo XRCC1 +24011 e la presenza o assenza di una anamnesi positiva per tabagismo come variabili predittive e la diagnosi come variabile dipendente.

La sopravvivenza dei pazienti affetti da adenocarcinoma duttale del pancreas non sembra essere influenzata dal genotipo XRCC1, XRCC3 o CYP1A1, relativamente ai polimorfismi analizzati, ma solo dallo stadio (Log rank=12.4, $p<0.01$) (figura 4).

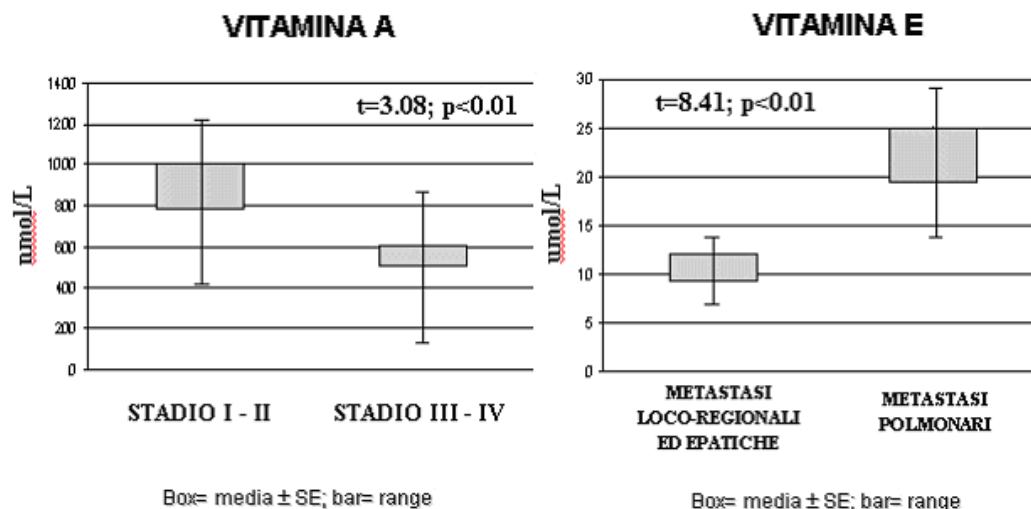
Infine, livelli significativamente più bassi di vitamina A sono stati riscontrati nei pazienti con carcinoma in stadio avanzato (III e IV) rispetto a quelli in stadio I e II. La vitamina E risultava diminuita nei pazienti che hanno sviluppato metastasi loco-regionali o epatiche rispetto a quelli con compromissione polmonare (figura 5).

DISCUSSIONE

L'unica causa accertata, che peraltro spiega solo il 30% dei casi, di adenocarcinoma pancreatico è il fumo di sigaretta. Il fumo di sigaretta contiene una grande quantità di carcinogeni, comprese le amine aromatiche, le nitroso-

**Figura 4**

Curve di sopravvivenza dei pazienti affetti da carcinoma del pancreas in relazione allo stadio di malattia.

**Figura 5**

Livelli sierici delle vitamine A e E nei pazienti affetti da carcinoma del pancreas.

mine tabacco-specifiche, gli agenti alchilanti, gli idrocarburi policiclici aromatici e le amine aromatiche eterocicliche. Attualmente è accettato il fatto che la maggior parte dei carcinogeni presenti nel fumo di sigaretta sono in primo luogo attivati da un ristretto numero di specie citocromo P-450, e successivamente metabolizzati dalla glutatione-S-transferasi (GST). La carcinogenesi legata al fumo di sigaretta potrebbe essere dovuta al danno ossidativo del DNA a cui segue l'attivazione degli oncogeni e l'inibizione degli oncosoppressori. Tra le particelle del fumo di sigaretta ci sono i chinoni che entrano nel ciclo redox generando specie reattive dell'ossigeno che, a loro volta, potrebbero danneggiare il DNA nucleare. Pertanto, anche per tale neoplasia, una ridotta capacità di riparare il danno al DNA potrebbe concorrere nel favorire la sua insorgenza dopo esposizione a specifici carcinogeni esogeni.

I polimorfismi CYP1A1 +4889 A/G (Ile462Val), XRCC1 +22163 C/T (Arg194Trp), XRCC1 +24011 G/A (Arg399Gln) e XRCC3 +16064 C/T (Thr241Met) sono risultati in equilibrio di Hardy-Weinberg. I due polimorfismi di XRCC1 sono risultati correlati fra di loro, ma non con il polimorfismo di XRCC3 o di CYP1A1. La mancata associazione fra i polimorfismi di XRCC1 e di XRCC3 o di CYP1A1 non sorprende, vista la localizzazione dei geni su cromosomi diversi. I due polimorfismi di XRCC1 sono fra loro distanziati da 1848 paia di basi. Tale distanza ricade peraltro ben al di sotto della lunghezza media di ricombinazione che è stata calcolata pari a circa 800.000 paia di basi e pertanto non può essere interpretata alla luce di un vantaggio selettivo.

Considerando i pazienti globalmente, non abbiamo riscontrato nessuna associazione statisticamente significativa fra genotipo e patologia per i polimorfismi studiati. Tuttavia, i pazienti affetti da pancreatite cronica presentavano una minore frequenza del genotipo XRCC1 +22163 CT, ed una maggiore frequenza del genotipo XRCC1 +24011 AA. L'associazione fra XRCC1 +24011 AA e la

pancreatite cronica risultava statisticamente significativa. Questo genotipo comporta la sostituzione dell'arginina in posizione 399 con l'acido glutammico, e tale sostituzione è stata associata ad una riduzione della capacità della proteina di riparare il danno al DNA. Questo riscontro è di difficile interpretazione, in quanto un genotipo potenzialmente a rischio per la neoplasia sembra invece favorire lo sviluppo di una patologia essenzialmente infiammatoria a fronte di una elevata esposizione a fattori esogeni, come il fumo di sigaretta e l'abuso alcolico, potenziali cause di danno ossidativo al DNA. I pazienti affetti da pancreatite cronica, infatti, anche nella nostra casistica sono per la maggior parte forti fumatori e forti bevitori. L'associazione di questo polimorfismo con la pancreatite cronica veniva confermata anche dall'analisi logistica, effettuata considerando come variabile dipendente la diagnosi di carcinoma o pancreatite, e come variabili predittive il polimorfismo XRCC1 +24011 ed il fumo di sigaretta. Quest'ultimo parametro non raggiungeva nell'analisi la significatività statistica, a differenza del polimorfismo genetico considerato: tale risultato conferma ulteriormente il potenziale ruolo di tale polimorfismo quale fattore di rischio per la pancreatite cronica. Abbiamo quindi suddiviso i pazienti affetti da patologia pancreatica cronica sulla base dell'età al momento della diagnosi, al fine di verificare se qualcuno dei polimorfismi studiati potesse risultare un fattore di rischio soprattutto per le neoplasie di precoce insorgenza (soggetti di età inferiore a 60 anni): il polimorfismo XRCC1 +22163 è risultato correlato al rischio di carcinoma pancreatico precoce. Il 28% dei pazienti affetti da carcinoma pancreatico era portatore dell'allele T, mentre nessuno di quelli affetti da pancreatite cronica in questa fascia d'età risultava portatore di tale allele, che può pertanto essere considerato un fattore di rischio per lo sviluppo di adenocarcinoma pancreatico precoce. Il rischio risultava pari a 1.42 (IC=1.04-1.93).

L'effetto sulla funzione proteica di più polimorfismi di

uno stesso gene potrebbe dipendere in maniera significativa dalle diverse possibili combinazioni genotipiche più che dal singolo polimorfismo. La combinazione dei genotipi dei due polimorfismi di XRCC1 studiati, in grado di modificare due aminoacidi della sequenza proteica, potrebbe influenzare in maniera significativa la funzione di XRCC1 più dei polimorfismi analizzati singolarmente. Per tale motivo abbiamo considerato sei possibili combinazioni mentre le tre derivanti dal genotipo XRCC1 +22163 TT con i tre genotipi di XRCC1 +24011 non sono state prese in considerazione per la rarità del genotipo in questione. Il genotipo XRCC1 +22163 CC/XRCC1+24011 AA risultava inversamente correlato con il carcinoma pancreatico. Questa combinazione comporta la sintesi di una proteina che in posizione 194 ha un residuo di arginina, con carica positiva, ed in posizione 399 ha un residuo di acido glutammico, con carica negativa. Le interazioni elettrostatiche fra questi due residui aminoacidici così combinati potrebbero influenzare l'attività della proteina.

La mancata correlazione fra i polimorfismi studiati e le caratteristiche anatomo-cliniche dei pazienti affetti da carcinoma pancreatico non sorprende. Una volta iniziato il processo di carcinogenesi pancreatica le mutazioni a carico di geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare sono così numerose e variabili (delezioni, mutazioni puntiformi, mutilazioni del promotore) e non correggibili per la sola azione di geni coinvolti nei meccanismi di riparo quali XRCC. Per quanto riguarda il ruolo delle vitamine A ed E, sembra che la loro capacità di prevenire il fenomeno ossidativo possa giocare un ruolo protettivo per il tumore del pancreas. In particolare, la vitamina A risultava essere più elevata nei pazienti con stadio I e II, confermando l'ipotesi di un suo ruolo nella crescita e invasività di questo tipo di neoplasia.

IN CONCLUSIONE

- I polimorfismi di XRCC1, non quello di XRCC3 e di CYP1A1, sono risultati correlati con la patologia neoplastica del pancreas
- Il genotipo XRCC1+24011 AA sembra favorire lo sviluppo di pancreatite cronica nei soggetti a rischio
- Il genotipo XRCC1+22163 CT sembra essere un fattore di rischio per l'adenocarcinoma pancreatico ad insorgenza precoce (< 60 anni)
- Il genotipo XRCC1+22163 CC/ XRCC1+24011 AA sembra invece protettivo per lo sviluppo di quest'ultima neoplasia.
- Le vitamine A ed E, sembrano avere un ruolo protettivo.

RINGRAZIAMENTI

Lo studio è stato finanziato dalla Regione del Veneto, ricerca sanitaria finalizzata n°83/02.

BIBLIOGRAFIA

1. Greenle RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer Statistics, 2000. *Cancer J Clin* 50:7-33,2000
2. Silverman DT. Risk factors for pancreatic cancer: a case-control study based on direct interviews. *Terat Carcinogenesis Mutag* 21:7-25,2001
3. Sun C, Yamato T, Furukawa T, et al. Characterization of the mutations of the K-ras, p53, p16 and SMA in 15 human pancreatic cancer cell lines. *Oncol Rep* 8:89-92,2001
4. Friess H, Kleef J, Kork M, Buchler MW. Molecular aspects of pancreatic cancer and future perspectives. *Dig Surg* 16:281-90, 1999
5. Luttges J, Schlehe B, Menke MAOH, et al. The K-ras mutation pattern in pancreatic ductal adenocarcinoma usually is identical to that in associated normal, hyperplastic, and metaplastic ductal epithelium. *Cancer* 85:1703-10,1999
6. Abruzzese JL, Evans DB, Rajman I, et al. Detection of mutated K-ras in the bile of patients with pancreatic cancer. *Anticancer Res* 17:795-802,1997
7. Wilentz RE, Chung CH, Sturm PD, et al. K-ras mutations in the duodenal fluid of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 82:96-103,1998
8. Zambon C-F, Navaglia F, Basso D, et al. ME-PCR for the identification of mutated K-ras in serum and bile of pancreatic cancer patients: an unsatisfactory technique for clinical applications. *Clinica Chimica Acta* 302:35-48,2000
9. Abruzzese JL, Evans DB, Rajman I, et al. Detection of mutated K-ras in the bile of patients with pancreatic cancer. *Anticancer Res* 17:795-802,1997
10. Wilentz RE, Chung CH, Sturm PD, et al. K-ras mutations in the duodenal fluid of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 82:96-103,1998
11. Zambon C-F, Navaglia F, Basso D, et al. ME-PCR for the identification of mutated K-ras in serum and bile of pancreatic cancer patients: an unsatisfactory technique for clinical applications. *Clinica Chimica Acta* 302:35-48,2000
12. Badawi AF, Stern SJ, Lang NP, et al. Cytochrome P-450 and acetyltransferase expression as biomarkers of carcinogen-DNA adduct levels and human cancer susceptibility. *Genetics and Cancer Susceptibility: Implications for Risk Assessment*, pages 109-140, Wiley-Liss, Inc.,1996
13. Sato M, Sato T, Izumo T, et al. Genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cancer. *Carcinogenesis* 20:1927-31,1999
14. London SJ, Yuan J-M, Coetzee GA, et al. CYP1A1 I462V Genetic polymorphism and lung cancer risk in a cohort of men in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prevent* 9:987-91,2000
15. Liu G., Ghadirian P, Vesprini D, et al. Polymorphisms in GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 and risk of pancreatic adenocarcinoma. *BR J Cancer* 82:1646-9,2000
16. Li D, Firozi PF, Zhang W, et al. DNA adducts, genetic polymorphisms, and K-ras mutation in human pancreatic cancer. *Mut Res* 513:37-48,2002
17. Squadrito GL, Cueto R, Dellinger B, et al. Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter. *Free Radical Biol & Med* 31:1132-8,2001
18. Matullo G, Palli D, Peluso M, et al. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis* 22:137-45,2001
19. Stern MC, Umbach DM, van Gils CH, et al. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:125-31,2001
20. Factor VM, Lskowska D, Rugaard M, et al. Vitamin E reduces chromosomal damage and inhibits hepatic tumor formation in a transgenic mouse model. *PNAS* 97:2196-201,2000
21. Silverman DT. Risk factors for pancreatic cancer: a case-control study based on direct interviews. *Terat Carcinogenesis Mutag* 21:7-25,2001