

Le anomalie genetiche del carcinoma pancreatico e le applicazioni cliniche

¹D. Pantalone, ²E. Pelo, ²B. Minuti, ³E. Mazza, ⁴G. Nesi, ³M. Falchini, ⁴I. Ragonieri, ¹F. Pantalone e ²F. Torricelli

¹ Dipartimento di Area Critica Medico-Chirurgica, Sezione di Chirurgia Generale e Discipline Chirurgiche, Università degli Studi di Firenze, ² U.O. di Citogenetica e Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Careggi, ³ Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Sezione Autonoma di Radiologia, Radiologia Interventistica, Università degli Studi di Firenze, ⁴ Dipartimento di Patologia Umana e Oncologia, Università degli Studi di Firenze, Firenze, Italia

Riassunto

Il carcinoma pancreatico nonostante sia una neoplasia con un'incidenza relativamente bassa rispetto ad altri tumori (2,4%), è gravato da un'elevata mortalità. Esso è presente nel mondo con circa 185.000 nuovi casi per anno e con un'incidenza di circa 0,99. Il nodo focale del trattamento è la identificazione precoce della neoplasia; infatti le migliori prospettive prognostiche si hanno per carcinomi di piccole dimensioni, confinati al pancreas. In questo articolo, considerato il grande impatto che ha avuto la ricerca sulla genetica dei tumori, è riportata una visione d'insieme sui meccanismi di carcinogenesi noti del carcinoma pancreatico con particolare attenzione alle applicazioni in campo clinico.

Il carcinoma pancreatico deriva da mutazioni acquisite o somatiche che, da quanto presente in letteratura, sarebbero rilevabili nel secreto pancreatico, nel liquido duodenale, nelle feci. Queste indagini potrebbero essere utili, ad esempio, per una migliore definizione dei precursori del carcinoma pancreatico infiltrante, oppure per l'identificazione di forme precoci (che rappresenterebbe il momento fondamentale ai fini prognostici), oppure, ancora, la caratterizzazione di lesioni istologiche di difficile interpretazione, come la pancreatite cronica.

L'obiettivo primario pertanto sarebbe quello di avere a disposizione una metodica applicabile nello screening del carcinoma pancreatico, che lo identifichi in una fase tanto precoce da essere "curabile". L'altro settore, non meno importante, è la diagnostica differenziale. Poter discriminare tra neoplasia e pancreatite cronica infatti, vuol dire modificare radicalmente la terapia e anche la qualità di vita del paziente.

Parole chiave: Carcinoma pancreatico, diagnosi differenziale, diagnosi precoce, mismatch repair genes, oncogeni, tumor suppressor genes

Introduzione

Il carcinoma pancreatico resta, alle soglie del terzo millennio una delle maggiori sfide della ricerca e della clinica nei confronti delle neoplasie maligne. Nonostante sia una neoplasia con un'incidenza relativamente bassa in confronto ad altri tumori (2,4%) (1,2) la sua mortalità

Abstract

Pancreatic cancer is a dismal disease. The 5-years overall survival ranges from 1% to 5%. Surgery is the only curative treatment available. Survival of selected patients with small lesion (<2cm) confined to the pancreas is improved to 19-41%. Presently the major effort is on studies of the cancer development phenomena to improve detection of patients with early lesions. The analysis of oncogene and tumor-suppressor gene activation may enable us to better define and cure this disease.

Molecular genetic new techniques performed on pancreatic juice, duodenal juice and stool, probably are the most promising new approach for early diagnosis of pancreatic cancer. This could be the right path to diagnose pancreatic malignant lesions at a curable stage, and to discriminate patients with a more favourable prognosis candidates to be submitted to adjuvant therapy with a curative intent, and also to discriminate real pancreatic cancer from patients with chronic pancreatitis.

Key words: Differential diagnosis, early diagnosis, mismatch repair genes, oncogenes, pancreatic cancer, tumor suppressor genes

è elevata. In Italia rappresenta la sesta causa di morte per neoplasia. Ogni anno negli Stati Uniti si verificano 28.000 nuovi casi, che sono causa di 26.000 morti e fanno di questa neoplasia la quarta causa di morte in questo paese (3-5). In Giappone, è, invece la quinta causa di morte per cancro (6), con un incremento annuale costante della mortalità (7). In generale per questo tumore

maligno nel mondo si presentano circa 185.000 nuovi casi per anno con una incidenza di circa 0,99 (8).

Il picco di maggior frequenza rispetto all'età si ha tra la settima e l'ottava decade (9). La sopravvivenza a cinque anni nei casi non trattati è del 1%, e del 5% nei casi trattati chirurgicamente.

La percentuale "cruda" di sopravvivenza post-chirurgica, si è notevolmente modificata nel tempo, in relazione anche alle variazioni di indirizzo terapeutico nei confronti di questo tumore maligno. Infatti in un primo tempo, considerata l'elevata mortalità degli interventi demolitivi e lo scarso riscontro sul piano della sopravvivenza, sono stati privilegiati trattamenti chirurgici palliativi con l'obiettivo principale di detendere l'albero biliare, in caso di ittero e di ripristinare il deflusso della bile nell'apparato digerente. (10-16).

Nell'ultimo ventennio, invece, si è verificata una inversione di tendenza, legata al progresso delle tecniche chirurgiche e rianimatorie, in direzione di un trattamento sempre più demolitivo e "radicale"; questa tendenza è confortata da dati sulla sopravvivenza globale riportati in letteratura, a partire dalle esperienze dei paesi orientali, che raggiungono valori del 35-40% a cinque anni dall'intervento (17-30).

Il nodo focale di questa terapia sta nella identificazione precoce di questa neoplasia; infatti le migliori prospettive prognostiche si hanno per carcinomi piccoli confinati al pancreas.

Sfortunatamente però nonostante i progressi compiuti dalla tecnologia (Eco, TAC, RMN, ERCP) (12,31-34) il ritardo diagnostico resta ancora elevato, (circa 4 mesi dalla comparsa dei sintomi) per cui la diagnosi è effettuata ancora su pazienti sintomatici, portatori di una neoplasia in fase avanzata con scarse possibilità terapeutiche.

Questo è comprensibile se si riflette sul fatto che le diagnostiche strumentali (35-37) a nostra disposizione sono utili per una migliore definizione dello stato locale della neoplasia, ma non influiscono sul tempo che il paziente impiega per rivolgersi al medico e quindi sullo stadio della malattia al momento in cui viene formulato il sospetto diagnostico per la prima volta. Questa latenza è dovuta alla aspecificità dei sintomi: soprattutto nella fase iniziale della malattia essi sono facilmente assimilabili a sintomi legati ad altre patologie dell'apparato digerente non maligne, come disordini gastroenterici correlabili con un generico disagio da super lavoro o da vita cosiddetta "stressante". Questi disturbi possono essere facilmente misconosciuti sia dal paziente sia dal medico.

Purtroppo la diagnosi è quindi effettuata su una popolazione già sintomatica, dove la malattia ha avuto tempo per svilupparsi (38, 39).

Visto il grande impatto avuto negli ultimi anni dalla ricerca oncologica sulle basi genetiche dei tumori (40-46), con l'obiettivo di approfondire la comprensione dei meccanismi di trasformazione neoplastica e individuare possibili risvolti applicativi in campo clinico, molti studi si sono rivolti in questa direzione anche per il carcinoma pancreatico. Gli studi sono stati principalmente dedicati ad identificare una popolazione a rischio, che, comunque è limitata a condizioni rare, quali:

pancreatite cronica familiare, oppure associazioni con altre patologie che riconoscono come base un'anomalia genetica ereditaria (FAMM (47), BRCA1 (48) e BRCA2 (49), HNPCC (50), sindrome di Peutz-Jegher (51), la sindrome di Li Fraumeni (52), La FAP (53) l'ataxia-teleangectasia (54), la sindrome di Williams (55)).

Alcuni studi presenti in letteratura sulle modificazioni genetiche somatiche presenti nel carcinoma pancreatico, mostrano come esse siano evidenziate nel secreto pancreatico (56-58), nell'aspirato di succo duodenale (59-61), nelle feci (62) e sarebbero informative della presenza del tumore pancreatico anche prima che questo sia clinicamente evidente (63).

Pertanto, il nostro obiettivo è quello di valutare il ruolo che le alterazioni genetiche, rilevabili secondo le modalità riferite in letteratura, possono avere nell'ambito clinico, in particolare nella diagnostica differenziale di quelle forme di difficile interpretazione anche per l'anatomopatologo, e nelle possibili utilizzazioni in ambito di diagnosi precoce.

Elementi di genetica dei tumori (64-67)

La carcinogenesi è generalmente conosciuta come un processo legato ad un accumulo di cambiamenti genetici. L'insieme di questi cambiamenti, o più propriamente mutazioni, costituisce la "GENETIC PATHWAY". Esse esitano in una attivazione di un oncogene che agisce in maniera dominante, o nella inattivazione di un gene che sopprime la comparsa del tumore. Ogni mutazione altera le risposte comportamentali delle cellule conferendo loro un qualche vantaggio per la crescita (Fig.1). Via via che le mutazioni si accumulano il cambiamento da crescita normale a crescita maligna si ac-

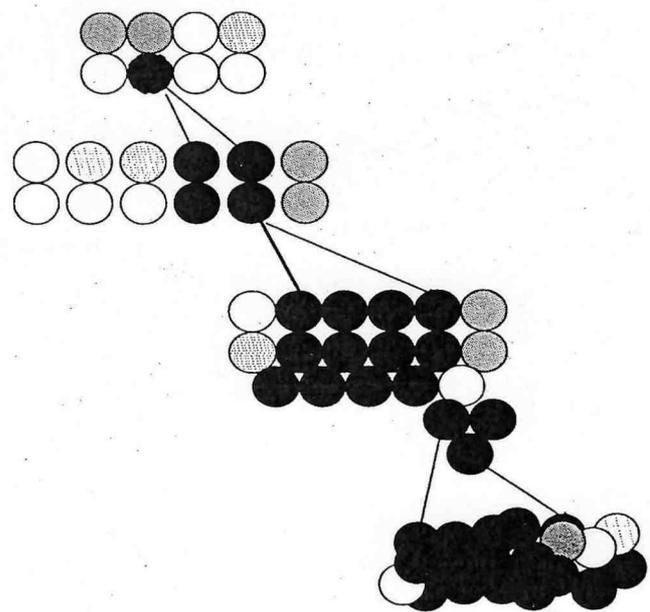


Fig.1. Tratto da: Hahn SA and Kern SE. Molecular genetics of Exocrine Pancreas Neoplasm. Surg Clin North Am 75 (5),857-

centua fino a che si sviluppa la capacità di proliferare in maniera incontrollata, di invadere i tessuti circostanti, di dare metastasi. È impossibile che una singola mutazione sia sufficiente da sola a dare un fenotipo maligno, e, poiché la percentuale di mutazione nei tessuti umani è bassa, è difficile che tutte le mutazioni per la trasformazione maligna, avvengano contemporaneamente. Da ciò ne consegue che ogni mutazione avverrà in tempi diversi dando luogo così ad un processo sequenziale progressivo, la "genetic pathway", appunto.

Da un punto di vista istopatologico, questo processo si concretizza in una lesione "precursore" che mostra un incremento progressivo delle atipie fino ai caratteri di malignità.

Questo cambiamento si verifica grazie anche, ad una fuga dai meccanismi di controllo della crescita che regolano il "turn-over" cellulare.

Poiché tessuti differenti hanno differenti meccanismi di controllo, molte delle mutazioni coinvolte nella carcinogenesi variano da tessuto a tessuto.

L'evoluzione somatica del cancro e i fattori che influenzano la "genetic pathway"

Fuga dalla "restrizione ambientale"

I tessuti hanno un'architettura molto complessa che è mantenuta attraverso una stretta regolazione della crescita tissutale mediante interazioni intercellulari e interazioni tra cellule e matrice extracellulare. Questa regolazione necessita di meccanismi di controllo della crescita tissutale sofisticati ed efficienti per assicurare che il numero di nuove cellule prodotte sia approssimativamente equivalente al numero di cellule che va incontro ad apoptosi e che l'architettura del tessuto sia mantenuta durante il turn-over cellulare.

Durante la riparazione di un danno tissutale, questi meccanismi devono permettere un incremento della proliferazione per restaurare l'architettura normale e riportare il tessuto al normale equilibrio.

I segnali per il controllo della crescita cellulare possono provenire dall'interno delle cellule come facenti parte del processo di differenziazione o possono derivare dal microambiente circostante. Questi ultimi sono legati alla interazione diretta tra i recettori di membrana, (ad es. molecole di adesione) o dalla presenza di altre molecole (come fattori di crescita e citochine).

Tutte le cellule sono predisposte a mutazioni che possono verificarsi spontaneamente o derivare dal sommarsi di fattori ambientali; le mutazioni, infatti, si verificano a caso lungo tutto il genoma, ma solo alcune porteranno a selezionare le cellule che meglio si adattano al microambiente circostante. Le limitazioni alla crescita tumorale, sono diverse in base allo stadio di evoluzione del tumore e così ad ogni ulteriore passo in direzione della trasformazione maligna, si ha una "finestra di opportunità" per selezionare le mutazioni più appropriate in quella fase.

Per esempio, negli stadi iniziali dello sviluppo, sfuggire al controllo esercitato dalle molecole d'adesione

tutte le mutazioni che coinvolgono la funzione dei recettori di membrana sarebbero selezionate in via preferenziale rispetto alle mutazioni che invece causano un incremento della proliferazione. In questo momento l'apoptosi può continuare ad essere il meccanismo di controllo più efficace, aumentando la quota di cellule distrutte e annullando così il vantaggio di crescita ottenuto.

In un ulteriore stadio l'ipossia tumorale può rappresentare il fattore limitante.

Ciò sta a dire che sebbene le mutazioni si verifichino in maniera casuale, la "genetic pathway" invece è selezionata in maniera non casuale, ma scelta in modo da selezionare in quel determinato momento il clone cellulare mutato più adatto a sopravvivere.

Interazione tra mutazioni

La "piramide inversa" e il "nexus" (fig.2,3)

Nel modello della "piramide inversa" le mutazioni sono collegate tra loro e la comparsa di una di queste mutazioni seleziona il verificarsi dell'evento successivo, per cui modificare uno di questi eventi, porta ad un diverso sviluppo o ad un "collasso" della piramide.

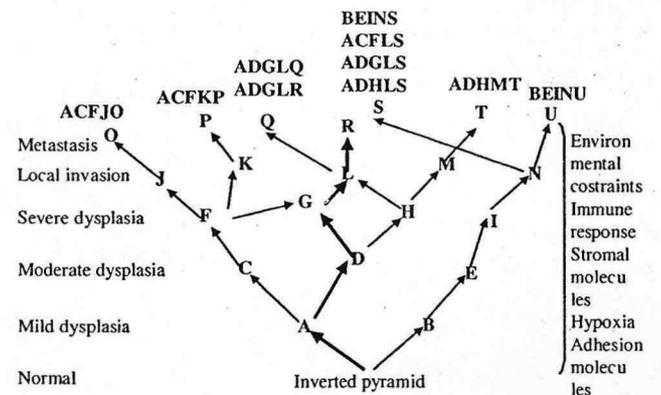


Fig. 2. Tratto da Ilyas M, Tomlinson IPM and Bodmer WF: Genetic pathway in colorectal and other cancers Eur J Cancer 35(3):335-351, 1999

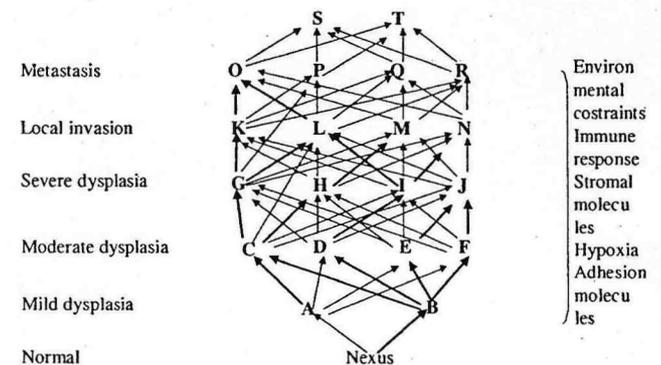


Fig. 3. Tratto da Ilyas M, Tomlinson IPM and Bodmer WF: Genetic pathway in colorectal and other cancers. Eur J Cancer 35(3):335-351, 1999

Nel "nexus" non ci sono mutazioni interdipendenti tra loro, per cui una volta che quello stadio è raggiunto e superato, le mutazioni che lo hanno caratterizzato non sono ulteriormente necessarie e agire su di esse, non comporta effetti restrittivi sulla progressione del tumore.

Geni modificatori e effetti epistatici

Altri fattori che influenzano la progressione in senso neoplastico sono presenti nell'organismo ospite e possono agire come fattori potenzianti la suscettibilità di trasformazione. Questi geni modificatori sono limitati a geni polimorfi che hanno alleli con differenti livelli di attività e che abitualmente non fanno parte della "genetic pathway".

La loro azione si esplicherà in termini di velocità della progressione neoplastica o della comparsa delle mutazioni che si presentano nella genetic pathway.

Alcune delle possibili azioni sono esemplificate qui sotto:

- Influenzano l'inizio della progressione e la sua velocità. Ad es. i radicali liberi possono danneggiare il DNA, mentre alcuni enzimi (per es. glutatione-S-transferasi) hanno un'attività detossificante per questo tipo di danno, e quindi una diminuzione della concentrazione di questi ultimi, favorisce la comparsa di mutazioni.
- Codificano per fattori di crescita, così, ad es. alcuni tumori sono in grado di provocare la comparsa di alte concentrazioni di questi fattori ed hanno quindi, crescita più accelerata rispetto ad altri.

Meccanismi di alterazione dei geni

I meccanismi con cui si verificano le alterazioni genetiche si riuniscono prevalentemente nelle seguenti:

- Perdita di omozigosi (homozygous deletion) dove entrambe le copie del gene vanno perdute.
- Mutazione in una delle copie (mutazioni intragenetiche) associate alle perdite dell'altra copia (loss of heterozygosity - LOH).
- Silenziamento dell'espressione del gene, mediante, per esempio, ipermetilazione del gene promoter.
- Accumulo di mutazioni in sequenze semplici ripetute, localizzate lungo il genoma. Le mutazioni di Citosina-Adenina (CA ripetuti), risultano in specifici genotipi molecolari RER+ (repeted error of replication) svelabili mediante il fenomeno della "micro-sallites instability".

Geni coinvolti nella trasformazione neoplastica

I geni coinvolti, identificati a tutt'oggi, possono essere riuniti a grandi linee, in tre gruppi.

"oncogenes"

Questi geni quando alterati o amplificati acquisiscono poteri di trasformazione e conducono ad una proliferazione cellulare incontrollata.

"tumor suppressor genes"

Quando inattivati essi permettono una proliferazione cellulare incontrollata. In ogni cellula esistono due copie di geni, per cui, perché la funzione vada perduta, entrambe le copie devono essere inattivate.

"dna mismatch repair genes"

Sono geni "riparatori" che riparano gli errori di duplicazione del corredo genetico codificando proteine che controllano la fedeltà nella replicazione del DNA. Poiché il numero di basi replicate a ogni divisione cellulare è superiore a 12 milioni circa, è intuibile come sia possibile e relativamente facile che avvenga un errore di replicazione.

Questi geni producono proteine che sono in grado di correggere molti di questi errori. Se queste proteine (enzimi) sono inattivate, alcuni errori casuali di replicazione del DNA non sono corretti e s'introduce così una mutazione nel genoma.

Le anomalie genetiche del carcinoma pancreatico (Fig.4)

Il carcinoma pancreatico è il risultato di una serie di mutazioni acquisite (somatiche) di geni che sono in grado di sviluppare un tumore. Tra gli "Oncogenes" abbiamo:

- k-ras: è attivato nel 90% dei casi. La proteina prodotta da questo oncogene gioca un ruolo importante nella trasduzione del segnale ed è inattivata da mutazioni nel codone 12, 13 o 61 di questo gene. La maggior parte delle mutazioni del k-ras per i carcinomi pancreatici è a livello del codone 12.

Per i "Tumor suppressor genes", sono identificabili i seguenti:

- p16 tumor suppressor gene sul cromosoma 9p: è inattivato nel 95% dei casi. Nel 40% per "homozygous deletions" in entrambi gli alleli, cioè a dire che entrambe le copie sono andate perdute. In un altro 40% per "loss of heterozygosity" (LOH), accoppiata sul secondo allele ad una "intragenic mutation". In un altro 10%-15% è inattivato da ipermetilazione di un isola CpG nel gene promoter. L'inattivazione di p16

**IL CARCINOMA DEL PANCREAS
ALTERAZIONI GENETICHE**

	Alterazione	Cromosoma
ONCOGENES	K-ras Point mutation	12q
TUMOR SUPPRESSOR GENES	p16 HD, LOH and IM, promoter hypermet	9p
	p53 LOH and IM	17p
	DPC4 RER+ LOH and IM	18q
DNA MISMATCH REPAIR GENES	MSH2 Unknown	2p
	MLH1 Unknown	3p
	PMS2 Unknown	7p

Fig. 4.

porta alla alterazione nella codifica di una proteina che è regolatrice del ciclo cellulare.

- *p53 sul braccio corto del cromosoma 17p*: è inattivato nel 50-70% dei carcinomi pancreatici. Il meccanismo di inattivazione è di solito quello della perdita di un allele (LOH) e mutazione intragenica nell'altro. Anch'esso codifica per una proteina che regola il ciclo cellulare, ma, in più, il gene *p53* induce il fenomeno dell'apoptosi determinando così un danno anche dei meccanismi di morte cellulare programmata.
- *DPC4 sul cromosoma 18q* è inattivato approssimativamente nel 75% dei casi. Nel 30% dei casi per "homozygous deletions", e nel 20% dei casi per "loss of heterozygosity" accoppiata a "intragenic mutation" dell'altro allele. Le restanti forme presentano un RER+ (errore di replicazione ripetuto). Il prodotto di questo gene ha un ruolo nel segnale di trasduzione coinvolto nella trasformazione del growth factor β . L'inattivazione di questo gene è particolarmente importante perché sembra essere specifico per il carcinoma pancreatico (4). In particolare, da un punto di vista istopatologico questo carcinoma pancreatico, sarebbe un carcinoma poco differenziato con un pattern di crescita di tipo sinciziale, a margine di crescita di tipo "expanding".

Da ricordare anche il BRCA2 (già conosciuto per il carcinoma mammario), che, sebbene sia presente in una bassa percentuale (7%), è importante perché rappresenterebbe una linea cellulare ereditaria.

- Per i "DNA mismatch repair genes", è stato suggerito che anche essi dovrebbero costituire un "target" nel carcinoma pancreatico, ma solo negli ultimi anni sono stati esaminati sistematicamente in un'ampia serie di carcinomi pancreatici. Anche nel loro caso si tratterebbe di una mutazione RER+ con presenza di "microsatellite instability".

Note sui meccanismi di azione (fig.5) (64,66)

Il p16, p53 e k-ras danno segnali che controllano il ciclo di divisione cellulare. Vale a dire che formano parte del sistema di controllo per la progressione di una cellula lungo il ciclo cellulare.

Le fasi alterne della replicazione del DNA e della mitosi dipendono fortemente dalla interazione di 3 classi di proteine: le chinasi cicline-dipendenti (CDKs), le cicline, e gli inibitori delle chinasi cicline-dipendenti. Le prime regolano la progressione di una cellula lungo il ciclo di divisione in diversi "check point".

Nel loro stato attivo le CDKs formano un complesso con differenti subunità di regolazione, le cicline. L'attività delle CDKs è inibita mediante la fosforilazione e mediante l'azione di una famiglia di proteine inibitorie dette inibitori delle chinasi cicline dipendenti (CKIs).

Nell'uomo le CDKs sono coinvolte nel controllo del ciclo cellulare a diversi livelli. La fase S precoce e l'ingresso nella fase M coinvolge il rapporto CDK2/cicline A e CDK2/cicline B, rispettivamente. Per progredire dalla fase G1 alla fase S le cellule devono passare attra-

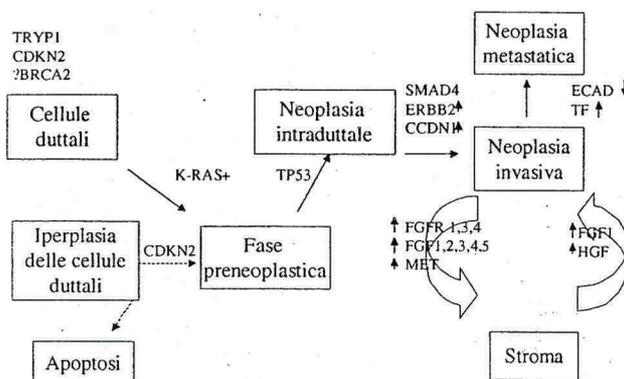


Fig.5. Tratto da Lemoine NR. Molecular advances in pancreatic cancer. Digestion 58:550-56,1997

verso un "restriction point" fondamentale o START point, nella ultima parte della fase G1 dove i segnali esterni positivi e negativi vengono integrati determinando o meno il progresso verso la fase successiva. L'attivazione di CDK4 mediante cicline D guida le cellule attraverso il restriction point. Durante la fase finale della fase G1, ci sono "checkpoint" che coinvolgono la p53.

Oltre al danno del DNA o ad altri stimoli l'aumentata espressione della p53 induce la trascrizione del gene p21, un inibitore della CDK. La proteina p21, lega e inattiva una varietà di complessi di cicline/CDK tra le quali alcune rallentano o prevengono l'ingresso nella fase S delle cellule, permettendo la riparazione in questa fase del DNA danneggiato, o deviano le cellule danneggiate verso il programma che guida alla apoptosi.

Alcuni studi hanno dimostrato come le forme wild di p16 e di p53 possono inibire la proliferazione di cellule contenenti i geni ras mutati, ma questa condizione non è vera in tutte le cellule. In conclusione un tema genetico comune nella carcinogenesi coinvolge da un lato il fallimento dell'azione soppressiva del tumore di p53 e p16 e dall'altro lato, l'attivazione della mutazione del k-ras.

Entrambe risultano in una alterata regolazione del processo di divisione cellulare.

Per quanto riguarda il DPC4, questo gene può contribuire primariamente alla comparsa di neoplasie pancreatiche sporadiche (anche se può essere presente in minor misura in altri cancri). Sul meccanismo con cui questo gene contribuisce alla formazione del cancro, abbiamo avuto informazioni dal suo omologo nella drosophila SMAD4; mediante la sua fosforilazione svolgerebbe un ruolo di "master switch" nella regolazione di segnali simil Trasforming Growth Factor - β .

Discussione

Le tecniche di studio delle alterazioni genetiche a nostra disposizione attualmente ci permettono l'identificazione delle singole cellule portatrici di una mutazione, persino quando queste sono mescolate con migliaia di cellule normali.

Studi sono presenti in letteratura sulle modificazioni genetiche rilevabili non solo su campioni di tessuto tumorale, ma anche su campioni di cellule presenti nel secreto pancreatico ottenuto dopo stimolo secretorio, o anche in assenza di esso (57,58), nel succo duodenale (59-61), nelle feci (62). Tutti questi studi sono volti alle possibili applicazioni in campo clinico:

- la definizione dei precursori del carcinoma pancreatico infiltrante. Infatti le "papillary intraductal proliferation" anche conosciute come iperplasia duttale sono portatrici di mutazioni sia del k-ras che di p16.
- caratterizzare lesioni istologiche di difficile interpretazione. Non sempre infatti la diagnosi differenziale strumentale ma soprattutto istologica tra carcinoma e altra affezione pancreatica, (as esempio, la pancreatite cronica) è dirimente e di facile interpretazione.
- applicare queste metodiche anche per la diagnosi precoce. Infatti secondo Alcuni Autori (4,41,56-62) tali alterazioni sarebbero identificabili e indicative anche prima che la lesione neoplastica sia evidenziabile clinicamente. A questo proposito inizialmente gli studi si sono rivolti alle anomalie genetiche rilevabili su materiale recuperato in corso di ERCP, prima dopo stimolo con secretina e poi in assenza di stimolo; in seguito le ricerche hanno indagato le alterazioni identificabili anche nei campioni di liquido duodenale senza stimolo secretorio di sorta e persino nelle feci, proprio perché tali alterazioni sarebbero tipiche e specifiche della neoplasia.

Questi dati avvalorano la tesi di una sufficiente "informatività" di queste metodiche nella la diagnosi di carcinoma pancreatico.

A nostro avviso, tuttavia un problema importante è quello del materiale genetico normale proveniente da altre cellule di sfaldamento presente nei campioni esaminati, nonostante quanto riferito in letteratura. Sebbene le alterazioni genetiche del carcinoma pancreatico siano tumore-specifiche, il materiale genetico normale proveniente dalle cellule di sfaldamento degli epiteli intestinali, potrebbe, per così dire, "mascherarne" la presenza. In particolare, la ricchezza di cellule con contenuto genetico normale ci induce a guardare con una certa cautela il materiale recuperato su campioni di feci, dove la quota di cellule normali è sicuramente superiore a quella rilevabile nell'aspirato duodenale o nel secreto duodenale, con un maggiore rischio di falsi negativi. Questo problema inoltre, (68) potrebbe essere più evidente per la perdita di eterozigosità (LOH), dove il materiale genetico normale può, per così dire, "occultare" l'anomalia dell'allele modificato presente nelle cellule cancerogene pancreatiche.

Sempre tra le anomalie genetiche rilevabili su materiale recuperato, invece che su tessuto tumorale, ci sembra (69) più interessante lo studio sugli errori di replicazione (RER+); essi si svelano come un picco anomalo (Fig.6) sovrannumerario rispetto al profilo genetico di controllo del sangue periferico. Sono cioè espressi come un "di più", rispetto al materiale genetico normale, e quindi potrebbero essere più facilmente identificabili non solo nel tessuto tumorale, ma anche nel materiale cellulare recuperato appunto dai secreti o dalle feci.

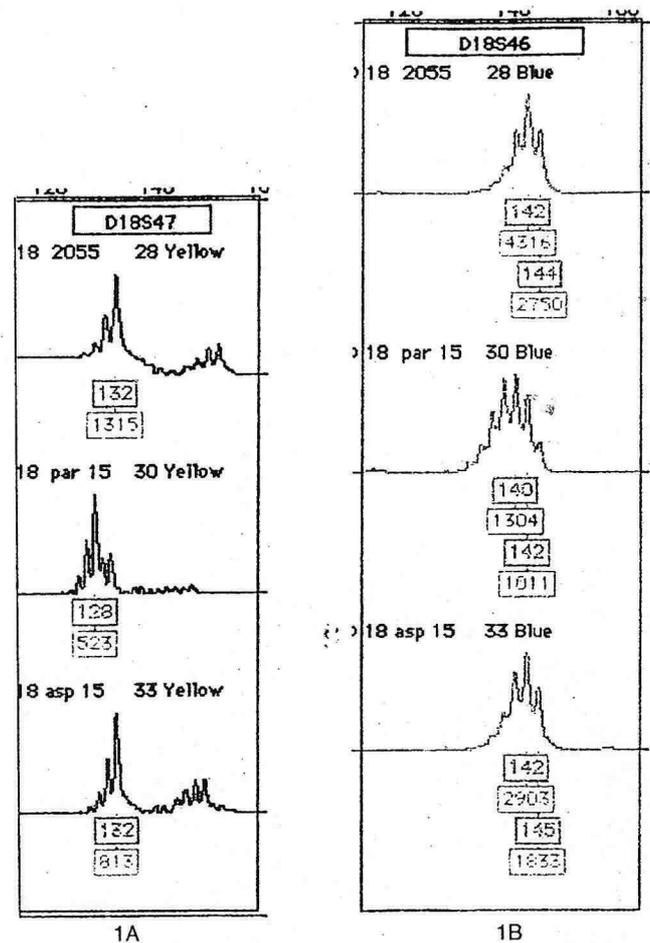


Fig. 6. Loci esaminati per campioni di sangue, aspirato e paraffinato (1A:D18s47 e 1B:D18S46). Pantalone D., et al.: Genetic alterations in the duodenal juice of patients with pancreatic carcinoma. ESSO 2000, Gronigen (the Netherlands) Eur J Surg Oncol 3: 291, 2000 (Esperienza personale)

Tra le i geni mutati, a nostro avviso, il più interessante sarebbe DPC4.

DPC4, infatti è considerato specifico per il carcinoma pancreatico e la sua alterazione si concretizzerebbe in un tumore di tipo sinciziale con fronte di crescita "expanding" relativamente meno maligno rispetto alle altre forme.

Riassumendo, lo studio delle anomalie genetiche su materiale facilmente reperibile, quale campioni di aspirato duodenale senza stimolo secretorio di sorta da raccogliere, ad esempio, in corso di un esame endoscopico standard, aprirebbe interessanti prospettive. Infatti, poiché le alterazioni genetiche riferibili al carcinoma pancreatico sono evidenzialbili anche prima che il tumore sia clinicamente apprezzabile, l'indagine potrebbe applicarsi a tutti quei pazienti che presentano un vago senso di disagio dell'area addominale e che vengono avviati ad accertamenti volti alla identificazione di patologie benigne epatobiliari (calcolosi della colecisti ed es.) o ad indagini per una generica gastroduodenite. Essi potrebbero rappresentare una "popolazione a rischio" da studiare mediante analisi genetica dell'aspirato, proprio ricordando l'esordio così insidioso e vago con cui il carcinoma pancreatico dà segno di se nelle

fasi iniziali. Il punto più importante, quindi, è quello di definire un metodo di screening efficace nella diagnosi precoce del carcinoma pancreatico, capace di cogliere la neoplasia in una fase tanto precoce da essere "curabile".

Da ricordare, a questo proposito anche gli studi sui possibili legami esistenti tra pancreatite cronica e cancro dove sarebbe possibile identificare la mutazione specifica del k-ras al codone 12, e, dove la presenza della pancreatite farebbe da substrato alla comparsa della iperpalsia duttale e quindi alla trasformazione maligna. (70)

L'altro settore di applicazione, infatti è la diagnostica differenziale tra cancro e pancreatite cronica.

Poter discriminare tra neoplasia e non-neoplasia, infatti, vuol dire modificare radicalmente la terapia. Spesso la diagnosi differenziale è un problema di difficile risoluzione anche per l'anatomopatologo oltre che per il chirurgo o il radiologo. Fruire di strumenti idonei ad indirizzare il paziente, con ragionevole margine di certezza verso un protocollo terapeutico piuttosto che un altro più o meno aggressivo e demolitivo, incide grandemente non solo sulle aspettative di vita del paziente, ma anche sulla qualità di vita stessa.

Per concludere, pur con le dovute cautele, legate alla fase ancora iniziale di queste ricerche, lo studio delle anomalie genetiche rilevabili su cellule recuperate anche in corso di una endoscopia standard, ci appare come una promettente metodica di indagine applicabile su larga scala nella diagnosi e nella definizione prognostica di questa neoplasia maligna.

Bibliografia

- Flanders TY, Foulkes WD: Pancreatic adenocarcinoma: epidemiology and genetics. *J Med Genet* 33: 889-898, 1996
- Mulvihill SJ: Pancreaticoduodenectomy: current techniques and expected peroperative results. American College of Surgeons 83rd Annual Clinical Congress 1997 Chicago October 12-17 Postgraduate Course 3 (Disease of the liver, biliary tract, and pancreas) Section IIA pp 26-29
- Pedrazzoli S, Pasquali C, Sperti C: General aspects of surgical treatment of pancreatic cancer. *Dig Surg* 16: 265-275, 1999
- Yeo CJ, Conlon KC, Sarr MG et al.: Symposium. Pancreatic cancer: 1998 update. *J Am Coll Surg* 430: 429-441, 1998
- Yeo CJ: Pancreatic cancer: long term survival. American College of Surgeons 83rd Annual Clinical Congress 1997 Chicago October 12-17, Postgraduate Course 3 (Disease of the liver, biliary tract, and pancreas) Section IIA pp 29-31
- Kawarada Y, Yokoi H, Isaji S et al.: Modified standard pancreaticoduodenectomy for the treatment of pancreatic head cancer. *Digestion* 60: 120-225, 1999
- Furukawa H, Okada S, Saisho H, et al.: Clinicopathologic features of small pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 78: 986-990, 1996
- Sperti C, Pasquali C, Piccoli A, et al.: Survival after resection for ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Surg* 83:625-631, 1996
- Todd KE, Reber HA: Pancreatic neoplasm. *Current Opinion in Gastroenterology* 13: 392-397, 1997
- Cameron JL, Pitt HA, Yeo CJ, et al.: One hundred and forty-five consecutive pancreaticoduodenectomies without mortality. *Ann Surg* 217: 430-438, 1993
- Bakkevold KE, and Kambestad B: Morbidity and mortality after radical and palliative pancreatic cancer surgery. *Ann Surg* 217: 356-368, 1993
- Fernandez-del Castillo C, Rattner DW, Warshaw L: Standards for pancreatic resection in the 1990s. *Arch Surg* 130: 295-300, 1995
- Pitt HA: Curative treatment for pancreatic neoplasm. *Surg Clin North Am* 75: 891-904, 1995
- Cameron JL: Long-term survival following pancreaticoduodenectomy for the carcinoma of the head of the pancreas. *Surg Clin North Am* 75 (5): 939-951, 1995
- Alvarez C, Livingstone EH, Ashley SW, et al.: Cost-benefit analysis of the work-up for pancreatic cancer. *Am J Surg* 165: 53-60, 1993
- Mossa AR, Gamagami RA: Diagnosis and staging of pancreatic neoplasms. *Surg Clin North Am* 75: 871-890, 1995
- Yeo CJ, Cameron JL, Lillemoe KD, et al.: Pancreaticoduodenectomy for cancer of the head of the pancreas. 201 patients. *Ann Surg* 221 (6): 721-733, 1995
- Conlon KC, Klimstra DS, Brennan MF: Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg* 223 (3): 273-279, 1996
- Sorensen MB, Lundemose JB, Rokkjaer M, et al.: Whipple's operation for carcinoma of the pancreatic head and the ampullary region. *Scan J Gastroenterol* 33: 759-764, 1998
- Imamura M, Hosotani R, Kogire M: Rationale of the so-called extended resection for pancreatic invasive ductal carcinoma. *Digestion* 60 (suppl 1): 126-129, 1999
- Reber HA, Ashley SW, McFadden D: Curative treatment for pancreatic neoplasm. *Surg Clin North Am* 75: 905-912, 1995
- Hedberg M, Borgström A, Genell S, et al.: Survival following pancreatic carcinoma: a follow-up study of all cases recorded in Malmö, Sweden, 1977-1991. *Br J Surg* 85:1641-1644, 1998
- Edge SB, Schmiege RE, Rosenlof LK, et al.: Pancreas cancer resection outcome in American University Center in 1989-1990. *Cancer* 71: 3502-3508, 1993
- Baumel H, Huguier M, Manderscheid JC, et al.: Results of resection for cancer of exocrine pancreas: a study from the French Association of Surgery. *Br J Surg* 81: 102-107, 1994
- Peters JH, Carey LC: Historical review of pancreaticoduodenectomy. *Am J Surg* 161: 219-225, 1991
- Trede M, Schwall G, Saeger HD: Survival after pancreaticoduodenectomy. 118 consecutive resections without an operative mortality. *Ann Surg* 211 (4): 447-458, 1990
- Mosca F, Giulianotti PC, Balestracci T, et al.: Long term survival in pancreatic cancer: pylorus-preserving versus Whipple pancreaticoduodenectomy. *Surgery* 122: 533-566, 1997
- Di Carlo V, Balzano G, Zerbi A, et al.: Pancreatic cancer resection in elderly patients. *Br J Surg* 85: 607-610, 1998
- Stephens J, Kuhn J, O'Brien J, et al.: Surgical morbidity, mortality and long-term survival in patients with peripancreatic cancer following pancreaticoduodenectomy. *Am J Surg* 174: 600-604, 1997
- Fortner JG: Regional pancreatectomy for cancer of the pancreas, ampulla, and other related sites. *Ann Surg* 199 (4): 418-425, 1984
- Satake K, Nishiwaki H, Yokomatsu H, et al.: Surgical curability and prognosis for standard versus extended resection for T1 carcinoma of the pancreas. *Surg Gynecol Obstet* 175: 259-265, 1992

32. Tsuchiya R, Noda T, Harada N, et al.: Collective review of small carcinomas of the pancreas. *Ann. Surg.* 203 (1):77-81, 1986
33. Manabe T, Miyashita T, Ohshio G, et al.: Small carcinoma of the pancreas. Clinical and pathologic evaluation of 17 patients. *Cancer* 62: 135-141, 1998
34. Phoa SSKS, Reeders WAJ, Rauws EAJ, et al.: Spiral computed tomography for preoperative staging of potentially resectable carcinoma of the pancreatic head. *Br J Surg* 86: 789-794, 1999
35. Rivera JA, Fernandez-del Castillo C, Warshaw AL: The preoperative staging of pancreatic adenocarcinoma. *Advances in Surgery* 30: 90-97, 1997
36. Frazee RC, Singh H, Erickson RA: Endoscopic ultrasound for peripancreatic masses. *Am J Surg* 174: 596-599, 1997
37. Furukawa H, Kosuge T, Mukai K, et al.: Helical Computed tomography in the diagnosis of portal vein invasion by pancreatic head carcinoma. Usefulness for selecting surgical procedures and predicting the outcome. *Arch Surg* 133: 61-65, 1998
38. Pantalone D, Nesi G: New trends in pancreatic cancer: the "early pancreatic cancer" Case report. *Int J Surg Sci* 6: 68-71, 1999
39. Pantalone D, Bontà M, Allocca A, et al.: Effetti del ritardo diagnostico sul trattamento e sulla sopravvivenza nei pazienti affetti da cancro duttale pancreatico. *Chirurgia* 12: 291-294, 1999
40. Urrutia R, Di Magno EP: Genetic markers: the key to early diagnosis and improved survival in pancreatic cancer. *Gastroenterology* 110: 306-310, 1996
41. Hruban R, Goggings M, Kern SE: Molecular genetics and related developments in pancreatic cancer. *Curr Opin Gastroenterology* 15: 404-409, 1999
42. Humphrey GME, Squire R, Lansdown M, et al.: Cytogenetics and the surgeon: an invaluable tool in diagnosis, prognosis and counselling of patients with solid tumours. *Br J Surg* 85: 725-734, 1998
43. Finch MD, Howes N, Ellis I, et al.: Hereditary pancreatitis and familial pancreatic cancer. *Digestion* 58: 564-569, 1997
44. Andren-Sandberg A, Dervenis C, Lowenfels B: Etiologic link between chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Scand J Gastroenterol* 32: 97-103, 1997
45. Witzel JN: Genetic cancer risk assessment. *Cancer* 86: 2483-2492, 1999
46. Lynch TH, Watson P, Shaw TG et al.: Clinical impact of molecular genetic diagnosis, genetic counseling, and management of hereditary cancer. Part I: Studies of cancer family. *Cancer* 86: 2449-2456, 1999
47. Lynch HT, Fusaro L, Lynch JF: Familial pancreatic cancer: a family study. *Pancreas* 7: 511-515, 1992
48. Simard J, Tonin P, Durocher F, et al.: Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families. *Nat Genet* 8: 392-398, 1994
49. Tonin P, Ghadirian P, Phelan C et al.: A large multisite cancer family is linked to BRCA2. *J Med Genet* 32: 982-994, 1995
50. Lynch HT, Voorhees GJ, Lanspa SJ et al.: Pancreatic carcinoma and hereditary non polyposis colorectal cancer: a family study. *Br J Cancer* 52: 271-273, 1985
51. Spigelman AD, Mueday V, Phillips RK: Cancer and the Peutz Jeghers syndrome. *Human Pathol* 17: 97-90, 1986
52. Li FP, Fraumeni JF, Mulvihill JJ et al.: A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 48: 5358-5362, 1988
53. Giardiello FM, Offerhaus GJ, Lee DH, et al.: Increased risk of thyroid and pancreatic carcinoma in familial adenomatous polyposis. *Gut* 34: 1394-1396, 1993
54. Swift M, Chase CL, Morrell D: Cancer predisposition of ataxia-telegenectasia heterozygotes. *Cancer Genet Cytogenet* 46: 21-27, 1990
55. Morris CA, Thomas IT, Greenberg F: Williams syndrome: autosomal dominant inheritance. *Am J Med Genet* 47: 478-481, 1993
56. Friess H, Kleef J, Gumbs A, et al.: Molecular versus conventional markers in pancreatic cancer. *Digestion* 58: 557-563, 1997
57. Kondo H, Sugano K, Fukayama N, et al.: Detection of point mutations in the ki-ras oncogene at codon 12 in pure pancreatic juice for diagnosis of pancreatic carcinoma. *Cancer* 73: 1589-1594, 1994
58. Watanabe H, Ha A, Hu YX, et al.: K-ras mutations in duodenal aspirate without secretin stimulation for screening of pancreatic and biliary tract carcinoma. *Cancer* 86: 1441-1448, 1999
59. Iguchi H, Sugano K, Fukuyama N, et al.: Analysis of Ki-ras codon 12 mutation in the duodenal juice of patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology* 110: 221-226, 1996
60. Abruzzese JL, Evans DB, Rajman I, et al.: Detection of mutated c-ki-ras in the bile of patients with pancreatic cancer. *Anticancer research* 17: 795-802, 1997
61. Willentz RE, Chung CH, Sturm PDJ, et al.: K-ras mutations in the duodenal fluid of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 82: 96-103, 1998
62. Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, et al.: Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res* 54: 3568-3573, 1994
63. Lemoine NR, Jain S, Hughes CM, et al.: Ki-ras oncogene activation in preinvasive pancreatic cancer. *Gastroenterology* 102: 230-236, 1992
64. Ilyas M, Straub F, Tomlinson IPM, et al.: Colorectal and other cancers. *Eur J Surg* 35(3): 335-351, 1999
65. Yeo CJ: Tumor suppressor genes: a short review. *Surgery* 125: 363-366, 1999
66. Lemoine NR: Molecular advances in pancreatic cancer. *Digestion* 58: 550-556, 1997
67. Hahan, SA, Schmiegel WH: Recent discoveries in cancer genetics of exocrine pancreatic neoplasia. *Digestion* 59: 493-501, 1998
68. Pantalone D, Torricelli F, Pelo E, et al.: I marcatori genetici e il carcinoma pancreatico. *Atti XXIII Congresso Nazionale Sico Perugia* 16-18 Settembre 1999, pp. 111-114
69. Pantalone D, Torricelli F, Mazza E, et al.: Genetic alteration in the duodenal juice of patients with pancreatic carcinoma. *ESSO 2000, Groningen (The Netherlands)*. *Eur J Surg Oncol* 3: 291, 2000
70. Rivera JA, Rall CJN, Graeme Cook F, et al.: Analysis of K-ras oncogene mutations in chronic pancreatitis with ductal hyperplasia. *Surgery* 121: 42-49, 1997