



UNIVERSITÀ DI PISA

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN
TECNOLOGIE PER LA SALUTE: VALUTAZIONE E GESTIONE
DELLE
INNOVAZIONI NEL SETTORE BIOMEDICALE**

Direttore: Prof. Mauro Ferrari

Tesi sperimentale di dottorato

***Fattori predittivi di attività ed efficacia della chemioterapia
nel trattamento del carcinoma pancreatico***

Dottorando

Dr. Enrico Vasile

Relatore

Prof. Alfredo Falcone

Anno Accademico 2010

*A Carlotta,
a mia parziale discolpa per
tutto il tempo sottratto ...*

Indice

Riassunto analitico e parole chiave	pag. 4
English abstract and keywords	pag. 8
1. Introduzione	pag. 9
1.1 Il trattamento medico del carcinoma del pancreas.....	pag. 10
1.1.1 La chemioterapia adiuvante.....	pag. 10
1.1.2 La chemioterapia nel trattamento della malattia localmente avanzata o metastatica.....	pag. 13
1.2 Fattori predittivi di efficacia del trattamento chemioterapico.....	pag. 18
1.2.1 Pathway di EGFR.....	pag. 18
1.2.2 Polimorfismi di geni chiave per i farmaci chemioterapici.....	pag. 20
1.2.3 Micro-RNA.....	pag. 27
1.3 Razionale dello studio.....	pag. 28
2. Metodi	pag. 29
2.1 Disegno dello studio e obiettivi.....	pag. 29
2.2 Pazienti selezionati e trattamenti.....	pag. 30
2.3 Tecnologie utilizzate.....	pag. 33
3. Risultati	pag. 36
3.1 Analisi di espressione di EGFR.....	pag. 36
3.2 Analisi di espressione dei microRNA.....	pag. 38
3.3 Analisi di polimorfismi genici.....	pag. 41
4. Discussione, conclusioni e prospettive future	pag. 44
5. Collaborazioni scientifiche	pag. 48
6. Bibliografia	pag. 49
7. Articoli pubblicati con i risultati delle ricerche e allegati	pag. 59

Riassunto analitico

Il carcinoma pancreatico rappresenta la quarta causa di morte per neoplasia nei paesi occidentali con oltre 200.000 nuovi casi e decessi all'anno nel mondo e oltre 7.000 in Italia ogni anno.

Circa l'80% dei casi alla diagnosi si presenta in stadio localmente avanzato o metastatico, non suscettibile di trattamenti locali con intento curativo; per questi pazienti il trattamento medico rappresenta la principale opzione terapeutica.

Anche per i pazienti che si presentano alla diagnosi con una malattia resecabile, il trattamento medico rappresenta un'importante arma terapeutica in quanto una chemioterapia adiuvante postoperatoria permette un prolungamento significativo della sopravvivenza libera da ripresa di malattia e globale.

Il trattamento chemioterapico ha dimostrato di poter migliorare la sopravvivenza dei pazienti con carcinoma pancreatico in stadio avanzato rispetto alla migliore terapia di supporto; in particolare, un trattamento con l'analogo nucleotidico pirimidinico gemcitabina ha rappresentato a partire dalla fine degli anni '90 il trattamento standard in questa malattia permettendo una sopravvivenza superiore rispetto alla terapia con 5-fluorouracile e alla sola terapia di supporto. Purtroppo, però, il trattamento con gemcitabina permette di ottenere una risposta obiettiva di malattia in solo il 10% dei pazienti circa e una sopravvivenza mediana di solo 6 mesi. La gemcitabina è risultata efficace anche in fase adiuvante ottenendo un raddoppiamento della percentuale di pazienti liberi da malattia e vivi a 5 anni dall'intervento chirurgico rispetto alla sola chirurgia. Purtroppo, però, anche in questo setting, la percentuale di pazienti che beneficia del trattamento è molto limitata e solo il 20% dei pazienti rimane libero da progressione della malattia a lungo termine.

Molte strategie sono state sperimentate per cercare di migliorare i risultati del trattamento del carcinoma pancreatico; un primo tentativo è stato quello di ottimizzare l'uso della gemcitabina modificandone dosi e tempi di infusione; in particolare, il prolungamento dell'intervallo di infusione del farmaco potrebbe permettere una maggiore attivazione dello stesso a livello intracellulare e quindi una maggiore attività. Altra possibilità molto studiata è stata quella di utilizzare combinazioni di altri chemioterapici in associazione alla gemcitabina; in particolare a questo riguardo i farmaci risultati più attivi sono stati i derivati del platino (cisplatino ed oxaliplatino) e le fluoropirimidine (5-fluorouracile e capecitabina).

Sono stati studiati anche regimi di combinazione polichemioterapici a 3 o 4 farmaci contenenti gemcitabina (es. PEFG, PEXG, PDXG) e anche senza gemcitabina (es. FOLFIRINOX).

Ulteriore strada percorsa dalla ricerca oncologica degli ultimi anni è stata quella di associare alla chemioterapia farmaci diretti contro specifici bersagli molecolari potenzialmente implicati nella progressione della malattia; nonostante i molti farmaci studiati, solo un inibitore dell'attività tirosin-chinasica del recettore per l'Epidermal Growth Factor (EGFR), l'erlotinib, ha dimostrato di poter prolungare la sopravvivenza dei pazienti rispetto al solo trattamento chemioterapico con gemcitabina.

Nonostante i molti sforzi, purtroppo, però, ancora oggi il trattamento medico del carcinoma pancreatico permette di ottenere risultati limitati, con regressioni della malattia in una minoranza dei pazienti e sopravvivenza mediana dei pazienti inferiore a 1 anno. Inoltre tutti i trattamenti disponibili comportano effetti collaterali che possono inficiare ulteriormente i risultati della terapia.

In considerazione di tutto questo e vista l'attuale disponibilità di più farmaci, appare importante cercare degli strumenti che possano permettere una migliore selezione del trattamento nel singolo paziente in modo da aumentare le probabilità di risposta al trattamento e ridurre il rischio di effetti collaterali non necessari.

La variabilità genetica individuale in geni chiave coinvolti nell'azione del singolo farmaco (presente come mutazioni somatiche o polimorfismi genici) potrebbe giustificare le differenze individuali nella risposta e nella tossicità dei trattamenti medici.

Anche per i farmaci utilizzati nel trattamento del carcinoma del pancreas avanzato (gemcitabina, derivati del platino, fluoropirimidine, erlotinib) è stato dimostrato come alterazioni di alcuni geni presenti con notevole frequenza nella popolazione generale possano condizionare la sensibilità o la resistenza al trattamento.

Ad esempio, polimorfismi o variabile espressione nei geni che codificano per enzimi coinvolti nel metabolismo o nel meccanismo d'azione della gemcitabina (CDA, DCK, RRM1, hENT1, ecc.) e dei derivati del platino (ERCC1, XPD, ecc.) possono risultare fattori predittivi di attività e/o efficacia del trattamento.

Un campo di notevole interesse recente in questo ambito è quello dell'espressione dei microRNA, piccole molecole di RNA che hanno dimostrato un ruolo cruciale nella modulazione post-trascrizionale dell'RNA messaggero potendo agire sulla proliferazione e differenziazione cellulare, sull'apoptosi e sulla risposta cellulare ai chemioterapici.

L'obiettivo di questa ricerca è stato quello di studiare fattori predittivi di attività ed efficacia nel trattamento medico del carcinoma del pancreas avanzato mediante l'utilizzo di nuove tecnologie puntando alla personalizzazione del trattamento.

Sono stati studiati i polimorfismi dei geni candidati (ERCC1, XRCC1, XPD, RRM1 e CDA) e i livelli di espressione di proteine (EGFR) e microRNA in 187 pazienti affetti da carcinoma del pancreas avanzato trattati con chemioterapia con gemcitabina (65) oppure con associazioni di farmaci contenenti derivati del platino (122) e in 100 pazienti radicalmente resecati trattati con gemcitabina adiuvante.

I fattori studiati sono stati correlati con la sopravvivenza globale dei pazienti, l'intervallo libero da progressione o recidiva di malattia, l'attività e la tossicità del trattamento.

Sono stati inclusi nello studio i pazienti affetti da carcinoma del pancreas in stadio avanzato o radicalmente resecati trattati con terapia medica presso il Polo Oncologico dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana. Sono stati raccolti e analizzati per gli studi di polimorfismi anche prelievi ematici ottenuti da pazienti metastatici trattati presso le U.O. di Oncologia Medica dell'Ospedale San Raffaele di Milano e di Carrara. I pazienti sono stati trattati secondo l'indicazione oncologica prevista per il caso clinico. I dati clinici necessari riguardanti la malattia, la risposta al trattamento e la sopravvivenza sono stati registrati per le successive analisi.

Sono stati inoltre prelevati e conservati adeguatamente campioni ematici di sangue venoso periferico dei pazienti per le analisi genetiche individuali e sono stati richiesti campioni di materiale tumorale paraffinato già ottenuto a scopo diagnostico e conservato presso le U.O. di Anatomia Patologica per le analisi di espressione a livello tumorale. Prima delle analisi i campioni sono stati associati ai rispettivi dati clinici mediante un codice alfanumerico e quindi i dati sono stati resi anonimi.

Le tecnologie utilizzate per l'analisi dei fattori biomolecolari sono state:

- la microdissezione laser per selezionare cellule tumorali e cellule dell'epitelio duttale normale dai campioni tumorali conservati;
- estrazione del DNA e dell'RNA dal sangue periferico dei pazienti e dai campioni tumorali paraffinati precedentemente trattati con microdissezione laser;
- retro-trascrizione del RNA;
- amplificazione del DNA e del cDNA mediante PCR;
- analisi dei polimorfismi mediante PCR quantitativa;
- analisi dei microRNA mediante tecniche di microarray;
- analisi dell'espressione proteica a livello tumorale mediante tecniche di immunohistochimica con specifici anticorpi.

I risultati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il test t di Student, il test χ^2 di Pearson e il test di Wilcoxon; le curve di sopravvivenza sono state costruite secondo il metodo di Kaplan-

Meier; i dati di sopravvivenza sono stati confrontati mediante il log-rank test; sono state condotte analisi multivariate dei dati secondo il modello a rischio proporzionale di Cox. Le analisi statistiche sono state eseguite mediante il software SPSS.

L'espressione di EGFR sui 100 pazienti operati e trattati con chemioterapia adiuvante è risultata correlata al grado di differenziazione tumorale ma non ha dimostrato un impatto significativo prognostico o predittivo di per se.

L'espressione di miR-21 invece è risultata un fattore prognostico/predittivo di peggiore sopravvivenza sia in pazienti con adenocarcinoma del pancreas avanzato che in pazienti resecati trattati con gemcitabina ed è inoltre stato implicato nei meccanismi di resistenza a questo chemioterapico.

Inoltre analizzando l'espressione di oltre 1200 microRNA, abbiamo identificato miR-211 come uno dei principali fattori prognostici/predittivi in pazienti resecati e trattati con gemcitabina adiuvante.

Dall'analisi di polimorfismi, abbiamo verificato il ruolo di polimorfismi di geni di riparazione del DNA come fattore predittivo di efficacia della chemioterapia con derivati del platino; infatti, i polimorfismi di XPD (Lys751Gln e Asp312Asn), ERCC1 (C118T) e XRCC1 (Arg399Gln) hanno dimostrato una correlazione con la sopravvivenza di pazienti metastatici trattati con derivati del platino ma non di pazienti nello stesso stadio di malattia trattati con sola gemcitabina.

In conclusione, gli studi di questo progetto di tesi hanno permesso di dimostrare nuovi fattori prognostici e predittivi in pazienti con carcinoma del pancreas. Questi fattori andranno validati prospetticamente in studi clinici e potranno rappresentare in futuro le basi per un trattamento personalizzato anche per i pazienti con tumore del pancreas. Inoltre, l'analisi funzionale dei microRNA implicati come fattore prognostico e di resistenza ai farmaci, potranno permettere di identificare nuovi bersagli molecolari importanti per il trattamento di questa difficile malattia e per il superamento della resistenza ai chemioterapici.

Parole chiave

Carcinoma del pancreas; fattori predittivi; fattori prognostici; polimorfismi; microRNA; EGFR.

English Abstract

Pancreatic cancer is one of the leading cause of cancer-related death. The majority of patients has locally advanced or metastatic disease at diagnosis; for these patients, chemotherapy demonstrated the possibility to prolong survival and palliate symptoms. The most active drugs in this disease are gemcitabine, platinum derivates and fluoropyrimidines. Gemcitabine and fluoropyrimidines demonstrated prolonged survival even as adjuvant treatment after surgical resection of pancreatic tumor in patients with localized disease.

However, the results of chemotherapeutic treatment are still suboptimal with a median overall survival of less than 1 year in the metastatic setting and less than 40% of patients responding to chemotherapy; even patients who underwent surgical resection show high risk of disease recurrence with a 5-year overall survival rate of about 20%.

Therefore, the identification of prognostic and predictive factors seems to be crucial for maximizing therapeutic efficacy and minimizing useless treatment in pancreatic ductal adenocarcinoma.

In this study we evaluate the prognostic and predictive role of microRNA expression, candidate gene polymorphisms (CDA, RRM1, ERCC1, XRCC1, XPD) and EGFR expression in 100 patients resected for pancreatic adenocarcinoma and treated with adjuvant gemcitabine, 65 patients treated with first-line gemcitabine for advanced disease and 122 patients treated with combination chemotherapy for advanced disease.

The expression of miR-21 resulted a major prognostic/predictive factors of shorter survival in patients treated with gemcitabine both in adjuvant and in metastatic setting and it could be implicated in resistance to gemcitabine by activating intracellular pathways of proliferation in cancer cells. Even the expression of miR-211 resulted a significant prognostic factor in the adjuvant group and its functional role is under investigation. Single-nucleotide polymorphisms of DNA reparation genes (ERCC1 C118T, XPD Lys751Gln, XPD Asp312Asn, XRCC1 Arg399Gln) resulted significant predictors of survival in metastatic patients treated with platinum derivates but not in patients receiving only gemcitabine.

These results, if validated in prospective study in the future, may help the selection of specific treatment for individual patients leading to the personalization of care in pancreatic adenocarcinoma.

Keywords

Pancreatic cancer; predictive factors; prognostic factors; microRNA; polymorphisms; EGFR.

1. Introduzione

Il carcinoma pancreatico rappresenta la quarta causa di morte per neoplasia nei paesi occidentali con oltre 250.000 nuovi casi e decessi all'anno nel mondo di cui 8.000 in Italia dove causa più del 5% dei decessi per causa tumorale con un'incidenza e una mortalità che permangono in aumento in entrambi i sessi (1; 2). Negli Stati Uniti ha raggiunto il secondo posto per incidenza e mortalità tra le neoplasie gastroenteriche dopo le neoplasie del colon-retto (3).

Il carcinoma del pancreas rappresenta una malattia altamente letale con una mortalità che approssima l'incidenza della patologia; infatti, la probabilità di sopravvivenza a 5 anni con questa malattia si attesta intorno al 3-4% e mostra solo lievissimi miglioramenti negli ultimi decenni (4). Le cause di questa elevata letalità sono da ricercarsi in una malattia biologicamente molto aggressiva, nella diagnosi tardiva e nella resistenza ai trattamenti disponibili (5).

Al momento della diagnosi della malattia, circa il 20% dei pazienti presenta una malattia localizzata a livello del pancreas suscettibile di resezione chirurgica; per questi pazienti la chirurgia resettiva rappresenta la migliore opzione di trattamento sebbene anche in caso di resezione radicale della neoplasia vi sia un elevato rischio di recidiva, intorno all'80%, con una sopravvivenza mediana dei pazienti resecati che si attesta intorno ai 2 anni e una percentuale di pazienti viva a 5 anni dall'intervento intorno al 20% (6).

Il 30% dei pazienti con carcinoma pancreatico presenta alla diagnosi una malattia localmente avanzata prevalentemente per infiltrazione extrapancreatica loco-regionale con coinvolgimento dei tessuti retroperitoneali, dei vasi venosi e arteriosi della regione, delle stazioni linfonodali e degli organi vicini. La migliore terapia per questi pazienti è rappresentata da un approccio combinato che possa includere un trattamento chemioterapico seguito da chirurgia o chemio-radioterapia. Anche per questi pazienti la prognosi non è buona con una sopravvivenza mediana compresa tra 1 e 2 anni (6).

Il rimanente 50% dei pazienti con carcinoma del pancreas presenta una malattia metastatica al momento della diagnosi; le sedi più frequenti di diffusione della malattia sono il fegato e il peritoneo, seguiti da polmone e linfonodi extra-regionali. Per questi pazienti l'unica terapia capace di prolungare l'aspettativa di vita è un trattamento medico chemioterapico che attualmente permette di ottenere una sopravvivenza mediana prossima a 12 mesi (6).

In considerazione della limitata prognosi associata al tumore del pancreas e dei possibili effetti collaterali dei trattamenti medici disponibili, appare certamente necessario in questa patologia valutare strategie alternative che possano consentire di migliorare i risultati del

trattamento; in questa prospettiva, la ricerca di nuovi farmaci e trattamenti innovativi e lo studio di fattori predittivi di efficacia e attività dei trattamenti utili per poter personalizzare la terapia al singolo paziente sono certamente le strade più promettenti.

1.1 Il trattamento medico del carcinoma del pancreas

1.1.1 La chemioterapia adiuvante

La chemioterapia ha un ruolo importante nel trattamento del carcinoma del pancreas in due setting principali distinti: la fase adiuvante dopo intervento chirurgico nei pazienti resecabili; il trattamento esclusivo o comunque primario in pazienti con malattia localmente avanzata non resecabile o metastatica.

L'elevato rischio di recidiva dopo chirurgia resettiva anche radicale sia loco-regionale che con metastasi a distanza ha portato a valutare l'utilizzo di una chemioterapia e radioterapia postoperatorie a scopo adiuvante (6).

Il primo studio che ha dimostrato un possibile ruolo per un trattamento adiuvante è stato uno studio del Gastrointestinal Tumor Study Group (GITSG) pubblicato nel 1985 che ha arruolato poco più di 40 pazienti randomizzati a ricevere chemio-radioterapia con 5-fluorouracile postoperatoria seguita da 2 anni di chemioterapia esclusiva sempre con fluorouracile o sola osservazione dopo la chirurgia; lo studio, che non ha completato l'arruolamento previsto, ha mostrato un incremento di sopravvivenza in pazienti che ricevevano chemio-radioterapia adiuvante verso la sola osservazione (21 mesi di sopravvivenza mediana verso 10.9 mesi e 19% di pazienti vivi a 5 anni contro il 5%), generando le basi per gli studi futuri (7).

L'European Organization for the Research and Treatment of Cancer (EORTC) ha condotto negli anni '90 uno studio per confermare i dati del GITSG, randomizzando oltre 200 pazienti con neoplasie periampollari a ricevere chemio radioterapia con 5-fluorouracile o sola osservazione dopo intervento chirurgico; 120 pazienti avevano una neoplasia della testa del pancreas. In questo studio non era prevista chemioterapia di mantenimento dopo la fase concomitante alla radioterapia. I risultati dello studio, sebbene inizialmente interpretati negativamente, ad una analisi statistica più attenta confermano il vantaggio in sopravvivenza con il trattamento, sebbene di entità lievemente minore (sopravvivenza mediana 17.5 mesi verso 12.6 mesi; percentuale di pazienti vivi a 2 anni 36% vs 23%) (8; 9).

Sebbene negli stessi anni siano stati presentati altri piccoli studi randomizzati o serie retrospettive di confronto che abbiano valutato il ruolo di una chemioterapia esclusiva rispetto alla sola osservazione (10; 11), il primo grande studio in questo ambito è stato presentato solo

agli inizi degli anni 2000; lo studio è stato il risultato di uno sforzo internazionale europeo (European Study Group for Pancreatic Cancer, ESPAC) che ha consentito di arruolare quasi 300 pazienti randomizzati in 4 braccia di trattamento a ricevere sola osservazione, sola chemioterapia adiuvante, sola chemioterapia adiuvante con 5-fluorouracile per 6 mesi o chemio-radioterapia (12; 13). Lo studio ESPAC-1 ha confermato il ruolo della chemioterapia adiuvante nel prolungare la sopravvivenza di pazienti sottoposti a resezione chirurgica di tumori del pancreas mentre ha messo in dubbio il ruolo della radioterapia; infatti, la sopravvivenza mediana dei pazienti che hanno ricevuto radioterapia è stata 15.9 mesi, rispetto ai 17.9 mesi dei pazienti che non la hanno ricevuta e la sopravvivenza mediana dei pazienti che hanno ricevuto chemioterapia è stata di 20.1 mesi, rispetto ai 15.5 mesi dei pazienti che non hanno ricevuto chemioterapia; tale vantaggio si conferma anche con un 13% di sopravvivenza a 5 anni in più con la chemioterapia adiuvante (21% vs 8% con sola osservazione) (figure 1 e 2).

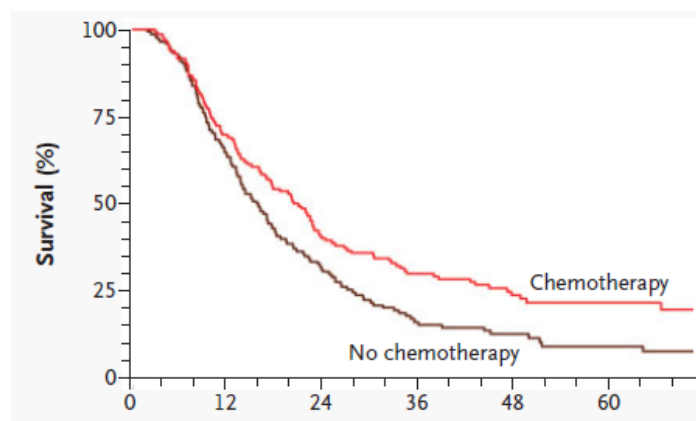


Figura 1. Curve di sopravvivenza dei pazienti dello studio ESPAC-1 nel confronto chemioterapia verso non-chemioterapia

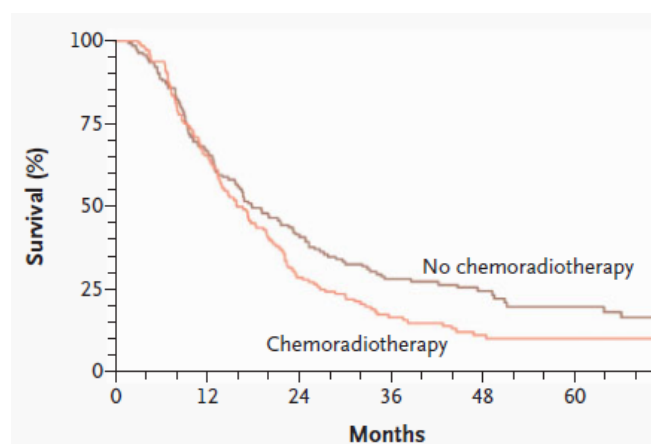


Figura 2. Curve di sopravvivenza dei pazienti dello studio ESPAC-1 nel confronto chemioradioterapia verso non-chemioradioterapia

Sebbene lo studio ESPAC-1 sia stato molto criticato per alcuni problemi tecnici e metodologici, esso è stato il primo studio a sancire il ruolo della chemioterapia esclusiva come trattamento adiuvante dopo pancreasectomia per carcinoma del pancreas e i risultati di questo studio sono stati rafforzati da una metanalisi della letteratura che arruolando quasi 1000 pazienti ha confermato una sopravvivenza mediana vicina ai 20 mesi e una sopravvivenza a 5 anni intorno al 20% per i pazienti trattati (14).

Un altro studio europeo, tedesco in particolare, ha voluto confermare il ruolo della chemioterapia adiuvante in questi pazienti, randomizzando oltre 350 pazienti a ricevere sola osservazione dopo la chirurgia o un trattamento chemioterapico con gemcitabina (CONKO-001). I risultati dello studio evidenziano un raddoppiamento nella sopravvivenza mediana libera da progressione con la chemioterapia (13.4 verso 6.9 mesi) e un prolungamento significativo anche della sopravvivenza globale con una percentuale di pazienti vivi a 5 anni dall'intervento raddoppiata (sopravvivenza mediana 22.8 vs 20.2 mesi; pazienti vivi a 5 anni 22.5% vs 11.5%) (15) (figura 3).

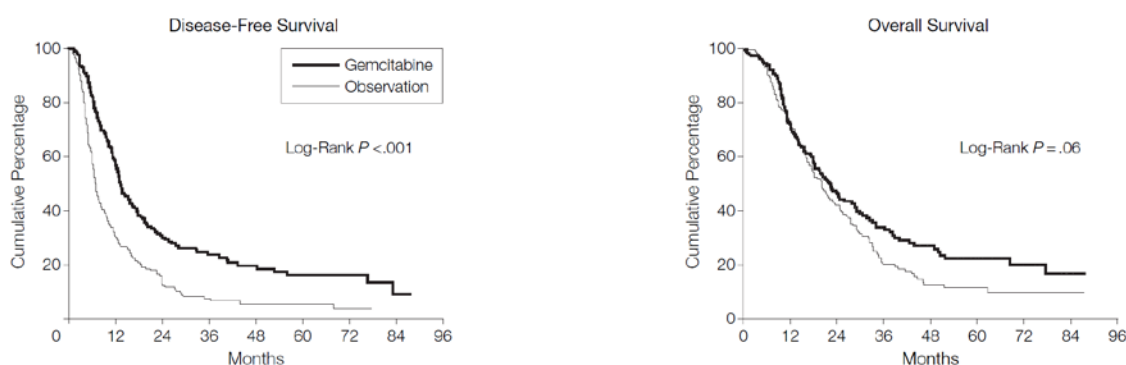


Figura 3. Curve di sopravvivenza libera da progressione e sopravvivenza globale dei pazienti dello studio CONKO-001

In considerazione dei risultati positivi degli studi ESPAC-1 e CONKO-001, sono stati condotti altri 2 studi randomizzati che hanno confrontato una chemioterapia adiuvante con gemcitabina verso 5-fluorouracile; nello studio ESPAC-3 era prevista sola chemioterapia mentre nello studio RTOG-9704 i pazienti erano randomizzati a ricevere uno dei due trattamenti chemioterapici prima e dopo un periodo di chemio-radioterapia con fluorouracile (16; 17). I due studi che hanno arruolato nel complesso oltre 1500 pazienti hanno evidenziato un'uguale efficacia tra gemcitabina e 5-fluorouracile con un differente profilo di tossicità a vantaggio della gemcitabina per minori effetti tossici gastrointestinali.

1.1.2 La chemioterapia nel trattamento della malattia localmente avanzata o metastatica

In pazienti con malattia localmente avanzata la combinazione di chemioterapia e terapie locali ha dimostrato di poter migliorare la sopravvivenza (5; 6; 18). Nell'ambito di questa strategia è comunque opportuno che il primo approccio sia quello chemioterapico.

Gli obiettivi del trattamento medico del carcinoma del pancreas localmente avanzato sono quelli di ridurre le dimensioni e l'estensione della lesione per poter consentire successivamente un trattamento locale (chirurgico o radioterapico), sterilizzare eventuali focolai micrometastatici non evidenti agli esami di stadiazione, valutare la sensibilità in vivo al trattamento chemioterapico e permettere una maggiore "compliance" da parte dei pazienti alla terapia.

Alla luce di questi obiettivi, i trattamenti utilizzati in questo ambito corrispondono a quelli utilizzati anche nella malattia metastatica privilegiando comunque trattamenti con elevata attività.

Nell'ambito del trattamento della malattia metastatica, gli obiettivi della terapia medica sono il prolungamento della sopravvivenza, il miglioramento della qualità di vita e la palliazione dei sintomi.

La dimostrazione di efficacia di un trattamento chemioterapico nel prolungare la sopravvivenza di pazienti con carcinoma del pancreas metastatico è stata prodotta per la prima volta all'inizio degli anni '80 in uno studio randomizzato che ha valutato chemioterapia verso sola terapia di supporto (19). Il trattamento, basato prevalentemente sul 5-fluorouracile, ha dimostrato di poter prolungare la sopravvivenza mediana dai circa 2 mesi dei pazienti non trattati a oltre 6 mesi.

Dopo questa dimostrazione di efficacia una chemioterapia con fluorouracile è diventata normale pratica clinica per i pazienti.

Il primo progresso successivo in questo ambito è arrivato solo alla fine degli anni '90 quando sono stati presentati i dati di uno studio di fase III che ha randomizzato 126 pazienti con carcinoma del pancreas avanzato a chemioterapia con 5-fluorouracile o con gemcitabina (20). Lo studio ha dimostrato un vantaggio in risposte obiettive (5.4% verso 0%), sopravvivenza libera da progressione (mediana 2.33 verso 0.92 mesi), sopravvivenza globale (mediana 5.65 verso 4.41 mesi) e qualità di vita a vantaggio del trattamento con gemcitabina, che pertanto è diventata il nuovo standard di trattamento (figura 4).

Successivi tentativi di migliorare i risultati del trattamento medico di questi pazienti sono stati l'ottimizzazione del trattamento con gemcitabina e la valutazione di associazioni di chemioterapici o nuovi farmaci a bersaglio molecolare con la gemcitabina stessa.

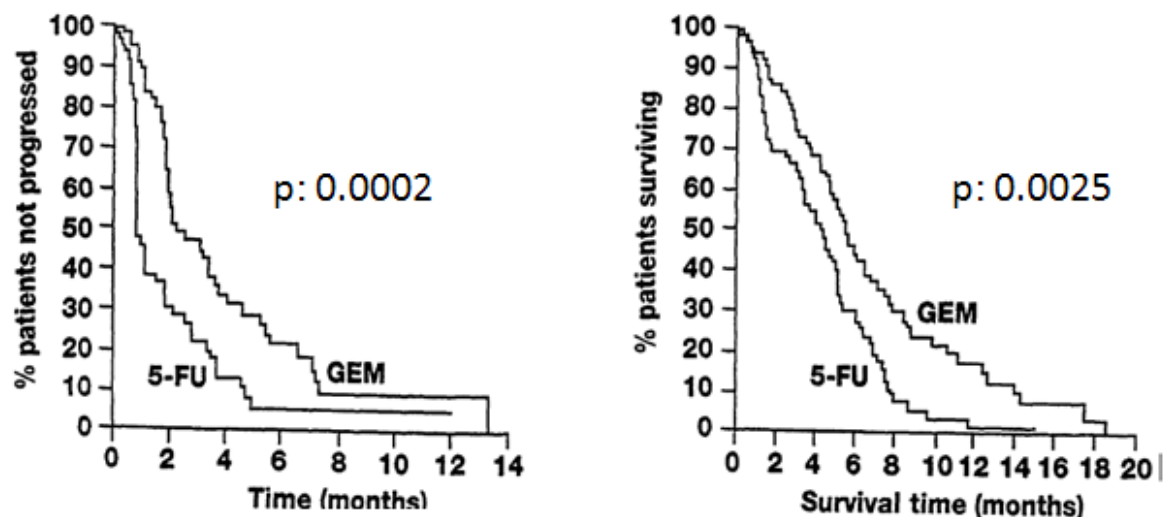


Figura 4. Curve di sopravvivenza libera da progressione e sopravvivenza globale dei pazienti trattati con 5-fluorouracile o gemcitabina

Per quanto riguarda il primo punto, è stato valutato come la gemcitabina sia un profarmaco che agisce come analogo di nucleotide dopo essere stato trasportato all'interno delle cellule tumorali da parte di sistemi di trasporto non enzimatici e fosforilato come gemcitabina trifosfato da parte della deossicitidina chinasi. È stato valutato come le tappe che portano all'attivazione della gemcitabina siano saturabili e quindi come una somministrazione del farmaco con infusione a velocità fissa e più lenta di quella tradizionale (10 mg di farmaco/mq di superficie corporea al minuto) (definita FDR, dall'acronimo inglese fixed dose rate) possa aumentare a livello cellulare le concentrazioni di farmaco attivo. Utilizzando queste conoscenze sono stati condotti alcuni studi clinici che hanno confrontato la gemcitabina in infusione FDR verso quella tradizionale; in particolare, un primo studio di fase II presentato da Margaret Tempero e coll. nel 2003 aveva dimostrato un possibile prolungamento di sopravvivenza con mediana per i pazienti trattati in modalità FDR di 8 mesi (21) sebbene con un aumento parallelo anche della tossicità prevalentemente ematologica.

Purtroppo un successivo studio di fase III non ha confermato questi risultati indicando come la modalità di infusione standard del farmaco rimanga quella da utilizzare nella pratica clinica sebbene i risultati ottenuti rimangano abbastanza deludenti con una risposta obiettiva ottenuta in meno del 10% dei pazienti, una sopravvivenza mediana di circa 5 mesi per i pazienti metastatici e una percentuale di pazienti vivi a 1 anno dall'inizio del trattamento di meno del 20% (22).

Ulteriore tentativo è stato quello di valutare regimi di combinazione basati sulla gemcitabina. Dall'inizio degli anni 2000 molti studi di fase III sono stati condotti confrontando la

gemcitabina verso l'associazione di gemcitabina e un altro chemioterapico; tra questi i farmaci più studiati sono stati i derivati del platino (oxaliplatino e cisplatino) e le fluoro pirimidine (5-fluorouracile e capecitabina) ma sono stati presentati anche dati con altri farmaci (ad esempio irinotecan e pemetrexed) (22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30; 31). Nessuno di questi studi ha singolarmente dimostrato un importante beneficio in sopravvivenza globale rispetto alla sopravvivenza. Tuttavia, sono state condotte metanalisi di questi studi (32) che hanno evidenziato un vantaggio in sopravvivenza globale con i regimi contenenti derivati del platino con una riduzione del rischio di morte del 15% (Hazard Ratio HR 0.85; 95% Confidence Interval CI 0.76-0.96) e con i regimi contenenti fluoropirimidine (Hazard Ratio 0.90; 95%CI 0.81-0.99); questo beneficio si osserva maggiormente in pazienti con buone condizioni generali (HR 0.76; 95%CI 0.67-0.87) (figura 5).

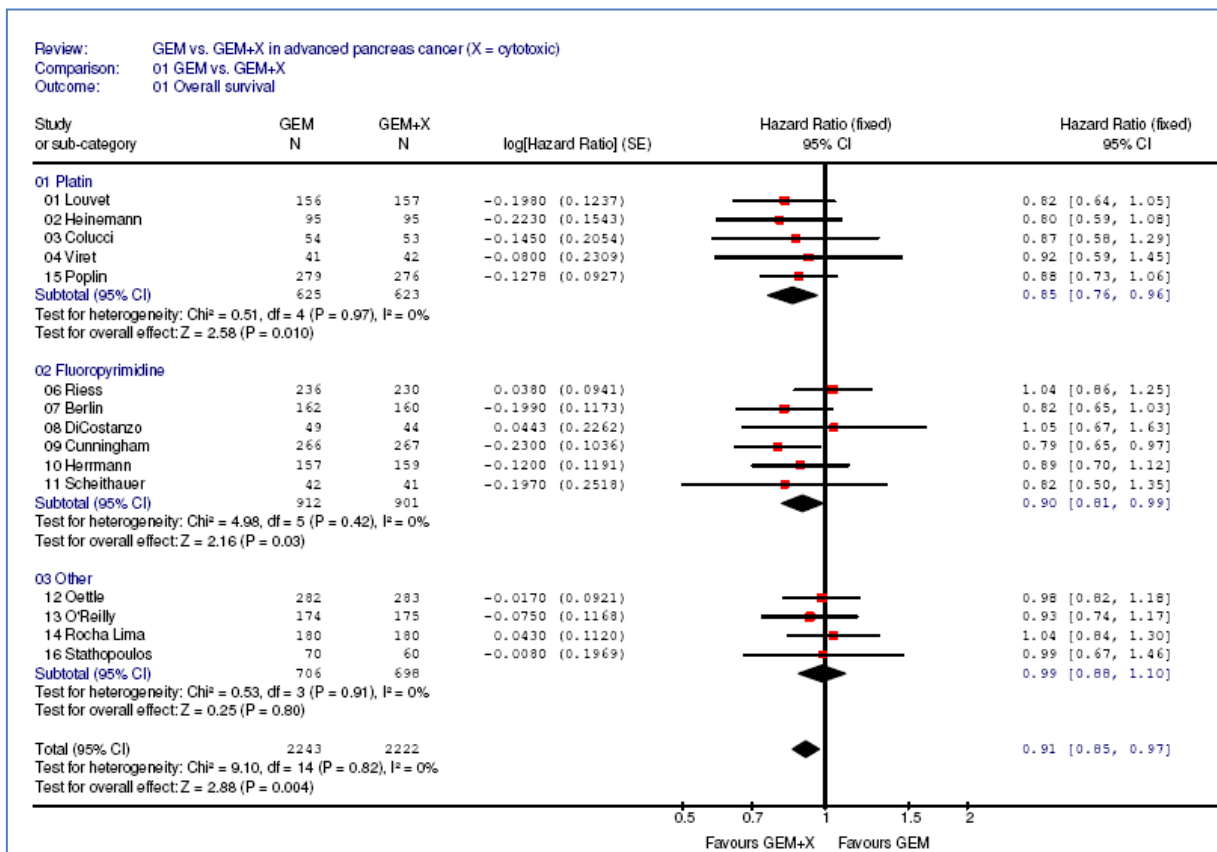


Figura 5. Forest plot dei risultati della metanalisi sugli studi di gemcitabina verso gemcitabina associata ad un altro chemioterapico nella malattia avanzata

Alla luce di queste considerazioni e dei risultati di questi studio vediamo come dalla metà del 2000 l'armamentario terapeutico per il trattamento del carcinoma pancreatico sia aumentato disponendo oltre che della gemcitabina anche di altre 2 classi di farmaci attivi, le fluoro pirimidine e i derivati del platino. L'utilizzo di combinazioni a base di gemcitabina ha

permesso di ottenere una sopravvivenza mediana dei pazienti intorno agli 8 mesi e tassi di risposte obiettive intorno al 20%.

Il tentativo di trovare anche farmaci biologici che potessero essere attivi in questa patologia in combinazione con la chemioterapia, invece, non ha portato risultati significativi; infatti, nonostante i molti farmaci testati (antiangiogenici, anti-EGFR, diretti contro metalloproteasi o farnesiltrasferasi) non è stato ottenuto nessun miglioramento rispetto ai risultati della sola chemioterapia (33; 34; 35; 36; 37). Unica segnalazione la merita uno studio di fase III che ha confrontato la gemcitabina in monochimioterapia verso l'associazione di gemcitabina ed erlotinib, una piccola molecola ad assunzione per via orale che inibisce l'attività tirosin chinasi del recettore per l'Epidermal Growth Factor (EGFR). In questo studio l'aggiunta di erlotinib ha prodotto un lieve ma significativo vantaggio in sopravvivenza con una mediana che passa da 5.91 a 6.24 mesi (HR 0.82, 95% CI 0.69-0.99) che, sebbene non si traduca in un importante beneficio clinico da poter dare ai nostri pazienti, conferma come la "pathway" di EGFR richieda successive ulteriori valutazioni (33) (figura 6).

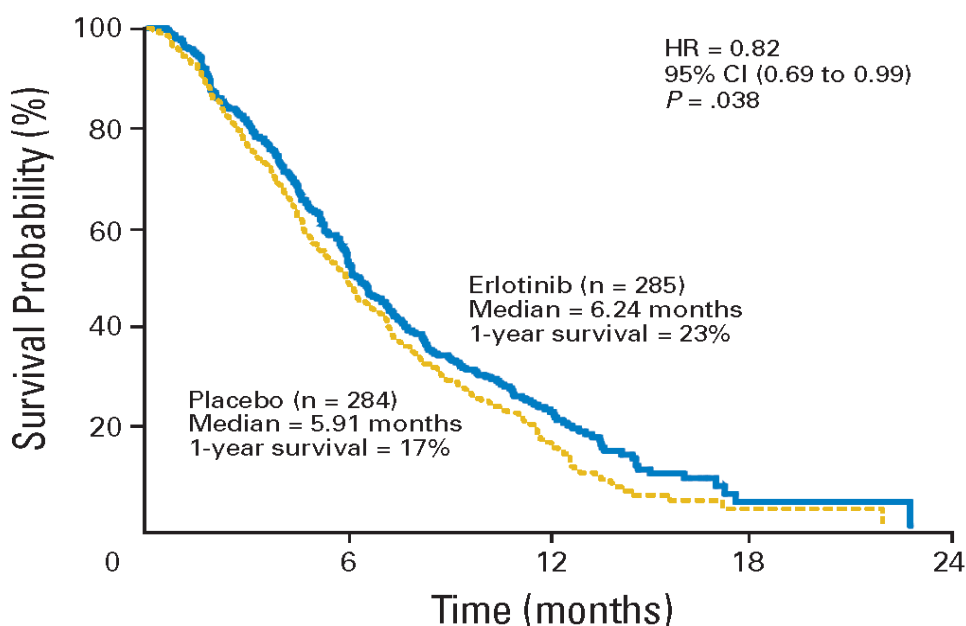


Figura 6. Curve di sopravvivenza globale dei pazienti con malattia avanzata trattati con gemcitabina in associazione a erlotinib o placebo

Negli ultimi anni, una nuova strategia ha prodotto risultati incoraggianti; infatti, sono stati condotti due studi randomizzati che hanno valutato regimi polichimioterapici con più di due farmaci verso la sola gemcitabina e che hanno dimostrato miglioramenti nella sopravvivenza. Un primo piccolo studio italiano è stato pubblicato nel 2005 e ha valutato un'associazione a 4 farmaci con gemcitabina, cisplatino, epirubicina e 5-fluorouracile su un totale di circa 100

pazienti; rispetto alla monochimioterapia con gemcitabina, il trattamento a 4 farmaci, sebbene gravato da una tossicità maggiore, ha dimostrato un aumento significativo delle risposte obiettive (38.5% vs 8.5%) e della sopravvivenza libera da progressione e un lieve incremento della sopravvivenza globale ai limiti della significatività (38).

Un recente studio intergruppo francese ha valutato un'ulteriore polichimioterapia su un numero più ampio di pazienti affetti da carcinoma pancreatico metastatico. Il regime di chemioterapia utilizzato in questo studio prevedeva la combinazione di 5-fluorouracile/acido folinico, oxaliplatino e irinotecan (FOLFIRINOX), in assenza di gemcitabina. Lo studio ha arruolato 342 pazienti randomizzati a ricevere uno dei due trattamenti.

Lo studio francese ha chiaramente dimostrato che in pazienti ben selezionati un trattamento più aggressivo con FOLFIRINOX produce un aumento delle risposte obiettive (32% vs 9%), della sopravvivenza libera da progressione (6.4 verso 3.3 mesi; HR 0.47, 95% CI 0.37-0.59) e soprattutto della sopravvivenza globale (11.1 verso 6.8 mesi; HR 0.57, 95% CI 0.45-0.73) (39) (figura 7).

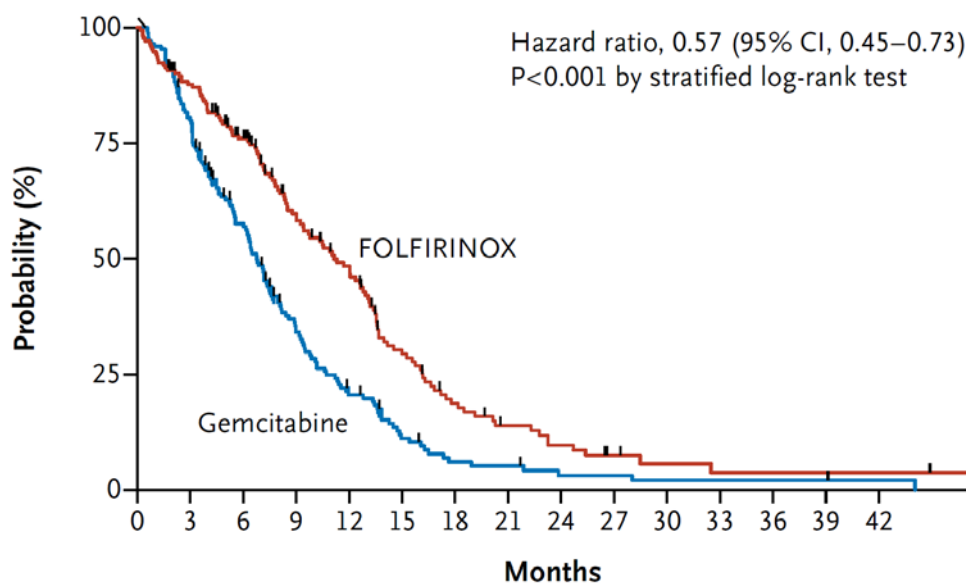


Figura 7. Curve di sopravvivenza globale dei pazienti con malattia avanzata trattati con FOLFIRINOX o gemcitabina

Pertanto oggi i regimi di chemioterapia più utilizzati contengono gemcitabina, derivati del platino, fluoropirimidine e irinotecan e permettono di ottenere in pazienti in buone condizioni generali suscettibili di trattamenti aggressivi una percentuale di risposte obiettive intorno al 30% e una sopravvivenza mediana intorno a 1 anno; sebbene questi dati numerici siano limitati, assumono elevata importanza tenendo conto di quella che sarebbe la prognosi e la

storia naturale della malattia in assenza di trattamento con una sopravvivenza mediana attesa con la sola terapia di supporto inferiore a 3 mesi. Tuttavia, molti pazienti continuano a non beneficiare in modo significativo delle terapie disponibili e quindi sono esposti inutilmente alle tossicità associate a questi trattamenti. Per questo motivo e per migliorare i risultati delle nostre armi terapeutiche che sono diventate plurime un approccio di selezione dei pazienti sulla base di caratteristiche genetiche individuali o della neoplasia potrebbe permettere una personalizzazione della cura e un'ottimizzazione dei risultati.

1.2 Fattori predittivi di efficacia del trattamento chemioterapico

Nonostante i molti sforzi, purtroppo, però, ancora oggi il trattamento medico del carcinoma pancreatico permette di ottenere risultati limitati, con regressioni della malattia in una minoranza dei pazienti e sopravvivenza mediana dei pazienti inferiore a 1 anno. Inoltre tutti i trattamenti disponibili comportano effetti collaterali che possono inficiare ulteriormente i risultati della terapia.

In considerazione di tutto questo e vista l'attuale disponibilità di più farmaci, appare importante cercare degli strumenti che possano permettere una migliore selezione del trattamento nel singolo paziente in modo da aumentare le probabilità di risposta al trattamento e ridurre il rischio di effetti collaterali non necessari.

La variabilità genetica individuale in geni chiave coinvolti nell'azione del singolo farmaco (presente come mutazioni somatiche o polimorfismi genici) oppure differenti pattern di espressione genica a livello tumorale potrebbero giustificare le differenze individuali nella risposta e nella tossicità dei trattamenti medici.

Le principali aree di interesse nello studio di fattori predittivi nel carcinoma pancreatico sono rappresentate da: "pathway" di EGFR; polimorfismi di geni chiave coinvolti nel metabolismo o nel meccanismo di azione dei chemioterapici; micro-RNA.

1.2.1 Pathway di EGFR

EGFR è un recettore tirosin-chinasico, membro della famiglia ErbB che include altri tre recettori. È costituito da tre regioni: un dominio extracellulare con i siti di attacco per i ligandi; un dominio transmembranario; una parte intracellulare con l'attività tirosin-chinasica responsabile dell'attivazione della cascata del segnale. L'attivazione del recettore può avvenire con un meccanismo ligando-dipendente o indipendente. Molti ligandi possono attivare EGFR, come amfipregulina, epiregulina, EGF, TGF- α , betacellulina e HB-EGF.

Indipendentemente dal meccanismo che la ha causata, l'attivazione di EGFR comporta trasmissione di un segnale intracellulare attraverso diverse vie: RAS-RAF-MAPK; PI3K-AKT; fosfolipasi C; SRC chinasi; STAT. Nel loro insieme queste cascate sono cruciali nel controllare la crescita cellulare, l'apoptosi, la proliferazione, la migrazione cellulare e l'angiogenesi, tutti meccanismi chiave nel conferire un fenotipo maligno alla cellula (40; 41; 42) (figura 8).

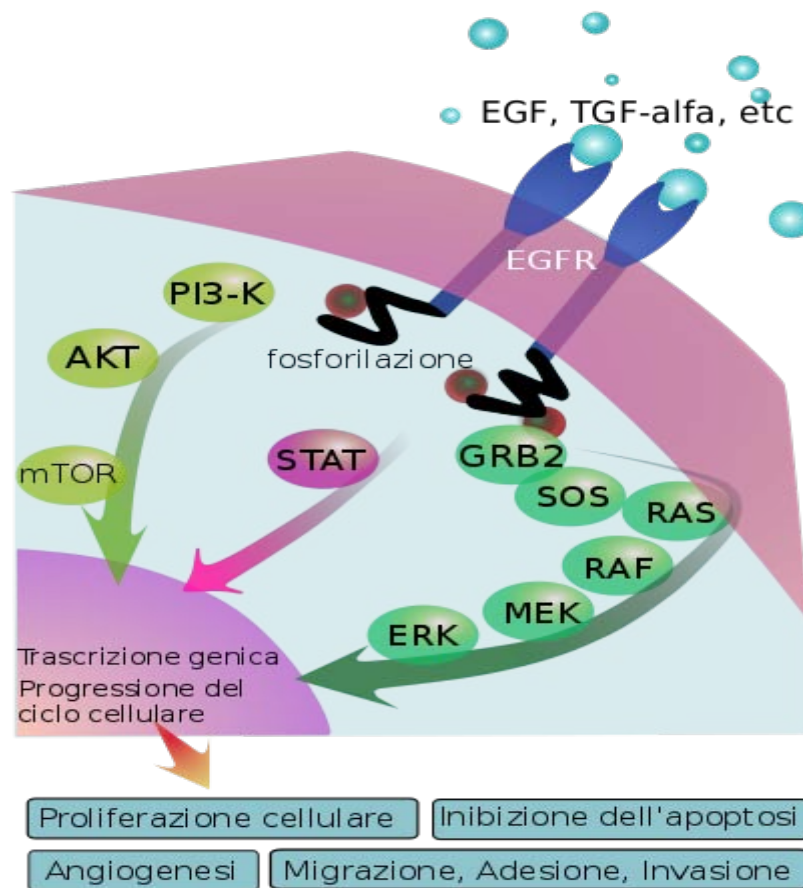


Figura 8. Pathway di EGFR

EGFR è iperspresso in circa il 70% dei carcinomi del pancreas e le mutazioni nei geni implicati nella cascata del segnale di EGFR, in particolare di KRAS, sono estremamente frequenti (43; 44; 45).

La presenza di mutazioni di KRAS conferisce una prognosi peggiore in pazienti con carcinoma del pancreas sia in stadio precoce che avanzato (46; 47). Il ruolo prognostico dell'espressione di EGFR e di altri fattori è invece poco chiaro (48; 49).

In considerazione della dimostrata efficacia di terapie anti-EGFR in associazione alla chemioterapia (33), maggiori informazioni sul ruolo prognostico di EGFR e su eventuali fattori predittivi per l'attività e l'efficacia di queste terapia sono fortemente attesi per

migliorare l'utilizzo di terapie costose che usate senza selezionare i pazienti non comportano importanti benefici. Infatti, in considerazione del limitato beneficio dimostrato l'Agenzia Italiana per il Farmaco (AIFA) non ha riconosciuto la rimborsabilità per erlotinib nell'indicazione di trattamento nel carcinoma pancreatico suggerendo la ricerca di fattori per una selezione dei pazienti da trattare.

Esempi di fattori predittivi che guidano il trattamento con farmaci anti-EGFR li abbiamo oggi in altre patologie come i carcinoma polmonari non a piccole cellule e i carcinomi del colon; in queste due neoplasie l'identificazione rispettivamente di mutazioni specifiche attivanti di EGFR o di mutazioni di KRAS ha mostrato un chiaro ruolo predittivo di efficacia nel primo caso e di resistenza nel secondo ai farmaci anti-EGFR (50; 51).

Anche nei carcinomi del pancreas è stato fatto un tentativo di identificare fattori molecolari predittivi di efficacia di erlotinib nell'ambito dello studio randomizzato che ha confrontato un trattamento con erlotinib o placebo in associazione a gemcitabina (33); purtroppo, ad oggi non sono stati identificati fattori rilevanti ed è stato escluso un possibile ruolo delle mutazioni di KRAS e del numero di copie del gene di EGFR in questa patologia (52).

1.2.2 Polimorfismi di geni chiave per i farmaci chemioterapici

La farmacogenetica è una disciplina nata con la finalità di identificare le differenze genetiche interindividuali responsabili dell'ampia variabilità esistente nella risposta ai farmaci (53). La variabilità genetica ha infatti un'importanza fondamentale nella pratica clinica, poiché potrebbe essere alla base di due principali problemi della terapia farmacologica: il mancato verificarsi dell'effetto farmacologico in alcuni pazienti e la comparsa di gravi e inattesi fenomeni di tossicità in altri (54). Ad esempio, nel primo caso, quando si assiste all'inefficacia di un trattamento, si può ipotizzare un'alterazione funzionale dell'enzima deputato all'attivazione del farmaco, mentre nel caso di reazioni avverse imprevedibili potrebbe invece trattarsi di alterazioni a carico del gene per l'enzima che dovrebbe inattivare il farmaco, con gravi conseguenze soprattutto per farmaci con un indice terapeutico ristretto, come è il caso della maggioranza dei chemioterapici antitumorali.

Uno dei principali campi di applicazione della farmacogenetica è quello della terapia delle patologie oncologiche. I chemioterapici antitumorali sono infatti tradizionalmente oggetto di studi farmacogenetici per molteplici ragioni: in primo luogo, come già accennato, tali farmaci hanno un basso indice terapeutico e quindi piccole differenze nella concentrazione degli stessi possono comportare notevoli differenze negli effetti biologici voluti e collaterali; inoltre molti sono profarmaci, attivati da sistemi enzimatici polimorfi; infine, anche gli enzimi coinvolti

nella detossificazione di queste sostanze sono contraddistinti da un grado, talvolta spiccato, di variabilità funzionale.

Nell'ambito degli studi farmacogenetici un campo notevole è occupato dalla valutazione di polimorfismi del singolo nucleotide.

Si parla di polimorfismo genico quando esistono, nella popolazione normale, geni mutati o variati con una frequenza superiore all'1% (55). Sebbene il genoma degli individui sia identico per il 99,9% dei casi, la differenza dello 0,1% è capace di dar luogo a circa 3 milioni di polimorfismi, il più comune dei quali è associato alla mutazione di un singolo nucleotide. I polimorfismi del singolo nucleotide (SNPs) consistono in variazioni della sequenza del DNA che coinvolgono una sola base nucleotidica (A, T, C o G) e possono essere presenti sia in regioni codificanti che non-codificanti del genoma (figura 9).

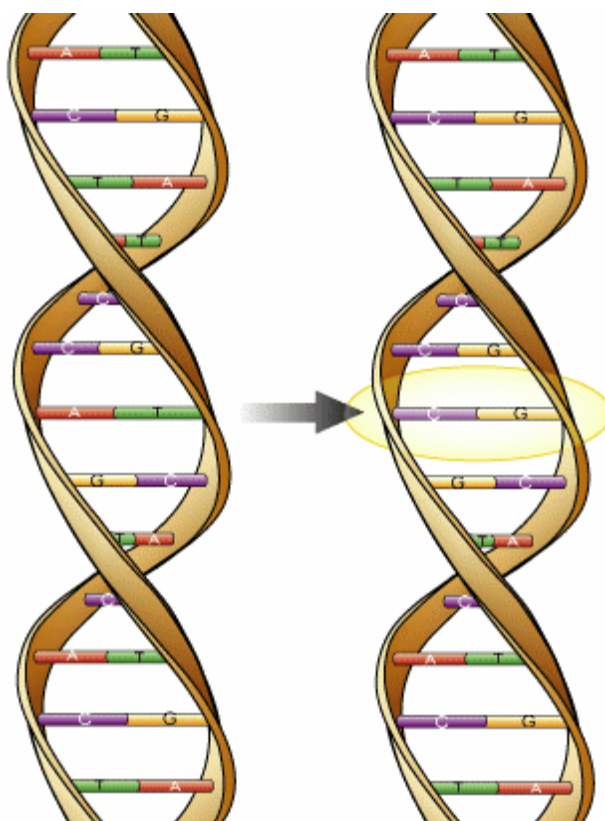


Figura 9. Esempio di Polimorfismo del Singolo Nucleotide (SNP)

Si ritiene che tali mutazioni siano stabili nel corso dell'evoluzione; non si osservano infatti variazioni apprezzabili tra generazioni diverse, caratteristica che rende più semplici gli studi di popolazione. Alcuni SNPs non sembrano dare effetti, altri invece influenzano l'espressione e la funzione delle proteine risultando in fenotipi che predispongono l'individuo a sviluppare determinate patologie o ne condizionano la risposta al trattamento farmacologico; sono noti,

infatti, polimorfismi per geni che codificano per i meccanismi di trasporto, per i bersagli molecolari e per gli enzimi che metabolizzano i farmaci.

La necessità di migliorare l'efficacia e la tollerabilità dei trattamenti farmacologici, attraverso un'appropriata selezione dei pazienti da sottoporre alla terapia conferisce all'analisi degli SNPs un notevole valore nell'ambito della ricerca biomedica, in particolare in oncologia.

Nell'ambito del trattamento del carcinoma pancreatico, notevole interesse è rivolto verso la valutazione di polimorfismi di selezionati geni coinvolti nel meccanismo d'azione della gemcitabina e dei derivati del platino.

I complessi del platino reagiscono con il DNA, formando legami crociati intercatena e intracatena. L'azoto in posizione 7 della guanina è molto reattivo e il platino forma legami crociati tra guanine adiacenti sullo stesso filamento di DNA; si formano rapidamente anche legami crociati adenina-guanina. La formazione dei legami crociati intercatena è un processo più lento e meno significativo. I complessi del DNA con i derivati del platino inibiscono la replicazione e la trascrizione del DNA e portano a rotture ed ad errori di codifica.

Gli addotti del platino possono essere riparati dal sistema di riparazione del DNA denominato NER (Nucleotide Excision Repair), che è un sistema efficace per la correzione di un'ampia varietà di lesioni che provocano una distorsione della doppia elica del DNA e che sono causate sia da agenti fisici che chimici. In particolare, il NER è richiesto per la riparazione dei frequenti danni determinati dalle radiazioni UV e le mutazioni nei geni umani che codificano per le proteine di tale sistema sono associate ad almeno tre diverse malattie genetiche: lo Xeroderma pigmentoso, la sindrome di Cockayne e la Tricotiodistrofia, che hanno a comune una estrema sensibilità dei pazienti alla luce solare. Il sistema NER comprende proteine con attività di riconoscimento del danno, taglio, sintesi e legame; sono stati identificati oltre 30 polipeptidi che partecipano a questo sistema, fra cui le proteine ERCC1 (Excision Repair Cross Complementing group 1), XRCC1 (X-ray Repair Cross Complementing group-1) e XPD (Xeroderma Pigmentosum group D) hanno un ruolo fondamentale.

Diversi studi hanno identificato SNPs a carico di questi geni, capaci di modificare l'espressione o la funzione della proteina prodotta e quindi di modificare gli effetti dei derivati del platino nel trattamento dei tumori (56; 57).

In pazienti con carcinomi del pancreas alcuni studi hanno valutato polimorfismi di geni implicati nei meccanismi di riparazione del DNA indicando come polimorfismi di alcuni geni (LIG3, LIG4, ATM) siano associati ad un aumentato rischio di sviluppo di carcinoma pancreatico (58), altri polimorfismi (EXO1, MLH1, MSH2, MSH3, MSH6, PMS2, PMS2L3, RECQL, TP73, TREX1, RecQ1, RAD54L, XRCC2, XRCC3) abbiano un ruolo prognostico

nella malattia avanzata (59; 60), altri abbiano un ruolo prognostico/predittivo in pazienti con malattia in stadio iniziale trattati con chemio-radioterapia e chirurgia resettiva successiva (61). Per quanto riguarda i geni di interesse nel nostro studio, l'espressione di ERCC1 ha dimostrato un ruolo prognostico negativo su sopravvivenza libera da progressione (disease-free survival, DFS) e sopravvivenza globale (overall survival, OS) in pazienti operati per carcinoma pancreatico (62) e il suo polimorfismo sul codone 118 (C118T) è stato associato a diversa DFS e OS in 67 pazienti asiatici trattati con cisplatino e S-1, una fluoropirimidina (63).

Non vi sono invece al momento in letteratura dati sul possibile ruolo prognostico e predittivo di polimorfismi a carico di XPD e XRCC1 in pazienti con carcinomi del pancreas; tuttavia, in altre patologie il loro ruolo in pazienti trattati con derivati del platino appare dimostrato (64; 65).

La gemcitabina fa parte della classe degli analoghi nucleosidici, chemioterapici antitumorali il cui meccanismo d'azione consiste principalmente nell'alterare la sintesi degli acidi nucleici mediante meccanismi d'inibizione competitiva e d'incorporazione di falsi substrati. Il meccanismo d'azione della gemcitabina consiste principalmente nell'inibizione della sintesi del DNA (figura 10). Essendo un profarmaco, per esercitare la sua funzione antitumorale, dopo aver oltrepassato la membrana cellulare mediante il sistema di trasporto dei nucleosidi, deve essere fosforilato prima in 2',2'-difluoro-2'-deossicitidina monofosfato (dFdCMP) e, successivamente nella 2',2'-difluoro-2'-deossicitidina difosfato (dFdCDP) e nella 2',2'-difluoro-2'-deossicitidina trifosfato (dFdCTP). La prima fosforilazione, essenziale per l'attività della gemcitabina, avviene ad opera della deossicitidina chinasi (dCK) (deossicitidina 5'-fosfotrasferasi), enzima implicato nella fosforilazione di numerosi deossinucleotidi purinici e pirimidinici, la cui attività è regolata da un meccanismo a feedback negativo da parte della deossicitidina trifosfato (dCTP).

Il principale metabolita citotossico della gemcitabina è la dFdCTP, che compete direttamente per l'incorporazione del DNA. La dFdCTP inserita nella catena del DNA determina, dopo l'aggiunta di un altro deossinucleotide, una modificazione conformazionale con la costituzione di un blocco sterico che inibisce la DNA polimerasi. Questa modalità di inibizione della polimerasi, denominata "terminazione mascherata della sintesi del DNA" per la presenza della dFdCTP in posizione non-terminale, ostacola il riconoscimento e la riparazione del danno al DNA da parte della esonucleasi.

Inoltre la dFdCDP agisce inibendo la ribonucleotide riduttasi, enzima necessario per la produzione dei deossinucleotidi come dCTP, costituito da 2 subunità M1 (RRM1) e M2.

Si verifica quindi l'arresto nella sintesi della catena del DNA e il blocco del ciclo riproduttivo e conseguentemente la morte della cellula a causa dell'impossibilità della riparazione. Allo stesso modo la dFdCTP è incorporata nell'RNA e ne inibisce la sintesi.

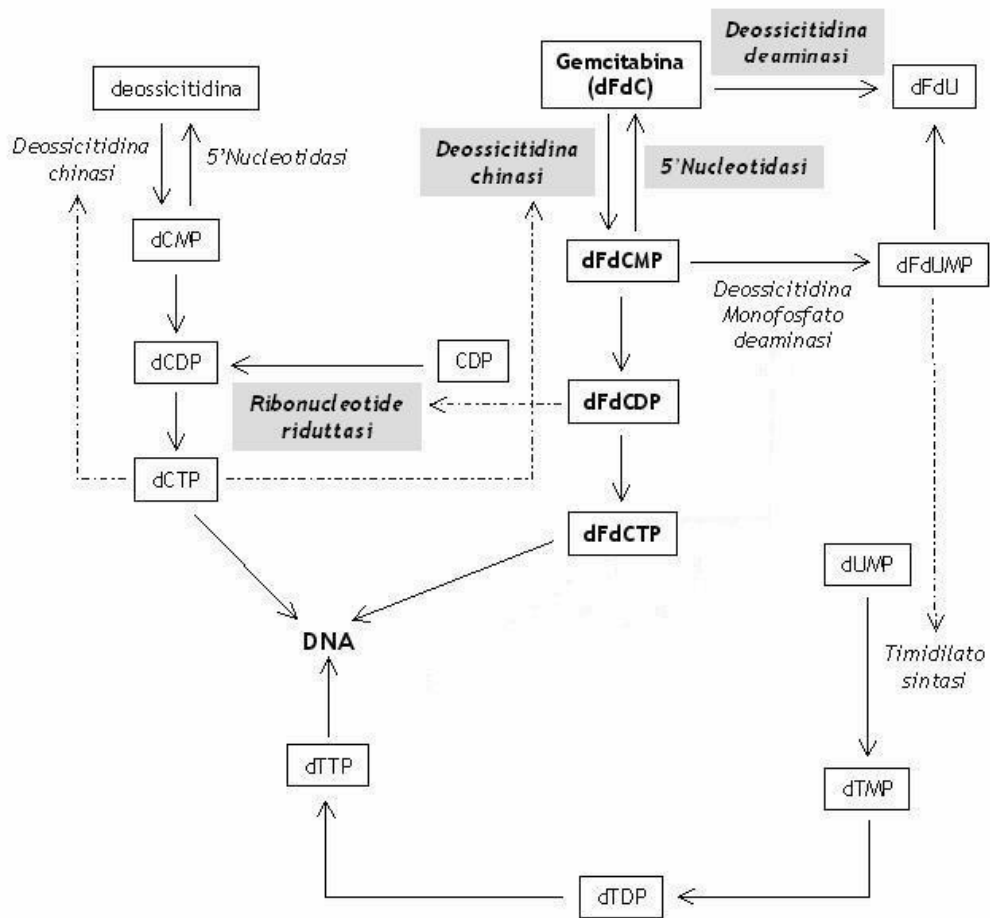


Figura 10. Meccanismo d'azione della gemcitabina.

I bersagli molecolari dell'azione della gemcitabina sono, come si evince, intracellulari, per cui la permeazione del farmaco attraverso la membrana plasmatica rappresenta un passaggio obbligatorio per la realizzazione del suo effetto citotossico. Tale passaggio sfrutta la presenza, sulla membrana citoplasmatica, di specifiche proteine di trasporto che permettono il superamento della barriera lipidica ai nucleosidi endogeni, che sono idrofilici come gli analoghi utilizzati in terapia. Queste proteine sono denominate trasportatori nucleosidici e si dividono in due famiglie a seconda del tipo di trasporto da esse mediato: i trasportatori nucleosidici equilibrativi (hENT) permettono un passaggio bidirezionale guidato dal gradiente di concentrazione (diffusione facilitata), mentre per mezzo dei trasportatori nucleosidici concentrativi (hCNT) si realizza un processo unidirezionale che sfrutta il gradiente

elettrochimico del sodio per introdurre all'interno della cellule i nucleosidi contro il loro gradiente di concentrazione (trasporto attivo secondario).

La distribuzione tissutale e l'espressione da parte delle cellule tumorali di questi trasportatori non è ancora pienamente definita, ma è noto che gli hENT sono presenti nella maggior parte dei differenti tipi cellulari, mentre sembra che gli hCNT siano espressi solo da tessuti specializzati quali epitelio intestinale, epatico, renale, plessi corioidei e da alcune linee cellulari tumorali. In un recente studio eseguito in pazienti con carcinoma pancreatico trattati con gemcitabina, i livelli di espressione di hENT1 sono risultati correlare in modo significativo con i parametri di efficacia del farmaco, a conferma dell'importanza del trasportatore nel metabolismo della gemcitabina (66).

Il primo studio che ha identificato e validato polimorfismi del singolo nucleotide in geni coinvolti nel metabolismo della gemcitabina è stato quello pubblicato nel 2004 da Fukunaga (67). Tra i vari polimorfismi, 5 sono stati individuati a livello dei geni codificanti per i trasportatori nucleosidici.

Anche il ruolo degli enzimi responsabili dell'attivazione e degradazione della gemcitabina è da tempo oggetto di numerosi studi perché è possibile ipotizzarne un'importante influenza sulla sensibilità delle cellule neoplastiche a tale terapia (68; 69). Esistono numerosi studi che dimostrano l'importanza della dCK nell'azione della gemcitabina e degli altri analoghi nucleosidici attivati da tale enzima (70; 71; 72) e confermano il ruolo della dCK nell'attivazione della gemcitabina e nella conseguente efficacia di questo farmaco. Nello studio di Fukunaga sopra citato (67) sono stati analizzati 2 SNPs di dCK, che tuttavia risultano silenziosi, non determinando sostituzioni aminoacidiche, e che non sembrano causare modifiche dell'espressione e dell'attività di questo enzima.

Per quanto riguarda il ruolo di enzimi coinvolti invece nella degradazione della gemcitabina, l'interesse maggiore è rivolto nei confronti della citidina deaminasi (CDA).

L'enzima CDA è stato oggetto di recenti studi sui polimorfismi e su come questi possano influenzare l'attività farmacologica della gemcitabina. Ancora Fukunaga e colleghi (67) hanno studiato tre SNPs di questo enzima, e quello che è sembrato rivestire un ruolo più importante è stato quello G208A, per cui l'alanina viene sostituita da una treonina. Per mezzo di un'analisi predittiva che permette di visualizzare la struttura tridimensionale della proteina dopo la sostituzione aminoacidica, è stato dimostrato che tale alterazione comporta un cambiamento conformazionale vicino al sito attivo della proteina andando ad influenzarne l'attività enzimatica. L'importanza dei polimorfismi di CDA per l'attività degli analoghi nucleosidici è stata studiata anche in 52 pazienti affetti da leucemia o linfoma da Yue (73). In

questo studio sono stati analizzati tre polimorfismi dell'enzima CDA: il già citato G208A, il polimorfismo T 435C ed infine A79C, che presentano una frequenza allelica rispettivamente pari a 4,3%, 70,1% e 21,1%. Lo SNP sul codone 435 non codifica per una sostituzione amminoacidica, mentre il polimorfismo in posizione 79 del gene di CDA determina una sostituzione da lisina a glutammina a livello dell'aminoacido in posizione 27 (Lys27Gln). I soggetti con la mutazione del codone 208 sono risultati potenzialmente più sensibili all'analogo nucleosidico ara-C. Questo polimorfismo però presenta una difficoltà pratica, in quanto la frequenza allelica dei genotipi non è eterogenea e l'allele wild-type ha una frequenza molto più elevata. Il polimorfismo in posizione 79 ha invece una frequenza allelica omogeneamente distribuita, presente sia nelle popolazioni europee che africane. Il codone, a livello del quale avviene la sostituzione amminoacidica, è localizzato nel dominio N-terminale e potrebbe essere coinvolto nel binding pocket loops che coopera con i ligandi di zinco (74); la riduzione della deaminazione dell'ara-C a causa della sostituzione amminoacidica è stata dimostrata in vitro da Kirch (75), evidenziando l'importanza di questa attività enzimatica. Tuttavia, nello studio di Yue non è stata dimostrata alcuna differenza significativa tra le popolazioni con i differenti genotipi e l'attività della citidina deaminasi. Recentemente in vitro è stata invece nuovamente evidenziata una correlazione tra le diverse varianti genotipiche e l'attività della citidina deaminasi (76).

Recentemente un gruppo di ricercatori giapponesi ha analizzato 14 polimorfismi del gene di CDA in 256 pazienti con tumori polmonari, pancreatici o mesoteliomi trattati con gemcitabina; lo studio, recentemente pubblicato sul Journal of Clinical Oncology (77), evidenzia differenze nella cinetica della gemcitabina e nella tossicità registrata con questo farmaco in correlazione al polimorfismo G208A, mentre non riconosce un ruolo importante per lo SNP A79C. I risultati di questo studio confermano il ruolo dei polimorfismi studiati, sebbene la differenze tra i pazienti arruolati per tipo di patologia tumorale e trattamento chemioterapico ricevuto (con sola gemcitabina oppure con derivati del platino, fluorouracile, ecc...) e l'esclusiva etnia giapponese della popolazione non consentono conclusioni cliniche definitive.

Anche l'enzima RRM1 è stato studiato come possibile fattore predittivo di efficacia di un trattamento con gemcitabina e la sua espressione e funzione è stata correlata ad alcuni SNPs (78; 79).

Recentemente il gruppo del MD Anderson Cancer Center di Houston, Texas, ha studiato diversi polimorfismi di geni che rientrano nel metabolismo e meccanismo d'azione di gemcitabina, focalizzandosi sui trasportatori hENT e hCNT1, 2 e 3 e sugli enzimi CDA, dCK,

RRM1 e deossicitidilato deaminasi (DCTD), su un gruppo di circa 150 pazienti trattati con chemio-radioterapia con gemcitabina preoperatoria e successivo intervento chirurgico (80; 81). Alcuni polimorfismi di CDA, hENT e RRM1 sono risultati associati con una maggiore tossicità dal trattamento, una più alta probabilità di risposta alla terapia, una più lunga sopravvivenza libera da progressione con un effetto anche sulla sopravvivenza globale quando si analizzavano alcuni genotipi includendo più polimorfismi.

Nonostante i numerosi dati a disposizione che indicano un possibile ruolo per i polimorfismi genici, non abbiamo al momento dati significativi sul loro significato in pazienti con carcinoma pancreatico avanzato trattato con sola chemioterapia.

1.2.3 Micro-RNA

I micro-RNAs (miRNAs) sono piccole molecole di RNA non codificanti altamente conservate durante l'evoluzione che sono recentemente emersi come una classe di molecole regolatrici dell'espressione genica attraverso modulazione dell'attività post-trascrizionale di molecole RNA messaggero (mRNA) bersaglio reprimendo la traslazione o distruggendo direttamente l'mRNA (82).

I miRNAs interagiscono con multipli mRNAs e sono quindi coinvolti nella regolazione di multiple "pathways" di segnale all'interno della cellula.

Diversi studi hanno dimostrato che l'espressione dei miRNAs è alterata in diverse neoplasie solide ed ematologiche potendo risultare aumentata o ridotta (83; 84; 85).

Il possibile ruolo dei miRNAs nel controllo della proliferazione e differenziazione cellulare e dell'apoptosi, la presenza di molti geni per i miRNAs a livello di siti di traslocazioni o delezioni del DNA tipiche in malattie tumorali e la diversa espressione di miRNAs tra tessuto tumorale e tessuti sani confermano che queste molecole possono funzionare come oncogeni o oncosoppressori (86; 87; 88).

Inoltre dati recenti suggeriscono che selezionati miRNAs possono correlare con la prognosi di alcune neoplasie (89; 90; 91) e influenzare la risposta delle cellule tumorali ai trattamenti chemioterapici (92; 93; 94).

Gli studi di profili di espressione hanno identificato un grande numero di miRNAs espressi in modo anomalo nei carcinomi del pancreas tra cui anche molti miRNAs già descritti in altre neoplasie gastrointestinali (come miR-122, miR-155, miR-21, miR-221 and miR-222) (95; 96; 97; 98; 99; 100; 101).

Gli studi disponibili indicano come miR-21 sia tra i principali miRNAs alterati nei tumori del pancreas e la sua espressione aumentata è stata correlata con una peggiore prognosi sia in

carcinomi esocrini duttali che in tumori neuroendocrini senza però avere al momento dati disponibili sul possibile ruolo nell'interazione con le terapie mediche specifiche per la malattia (102; 103; 104).

I geni bersaglio di mir-21 sono risultati programmed cell death 4 (PDCD4), tropomyosin 1 (TPM1) e phosphatase tensin homologue (PTEN); quest'ultimo inibisce la crescita cellulare agendo sulla "pathway" PI3K/Akt/mTOR che è alterata in molte neoplasie pancreatiche.

La riduzione dell'espressione di PTEN da parte di mir-21 può portare a un'aumentata attivazione di PI3K/Akt/mTOR che potrebbe risultare un interessante bersaglio molecolare in pazienti con tumori del pancreas e iperspressione di mir-21.

Altri miRNAs la cui espressione è risultata alterata ed è stata correlata con la prognosi in pazienti con carcinomi del pancreas sono miR-105, miR-127, miR-155, miR-187, miR-203, miR-210, miR-219, miR-222, miR-452, miR-518a-2, miR-30a-3p e miR-196a (105; 106); anche in questo caso non vi sono dati significativi di correlazione però tra l'espressione di questi miRNAs e l'effetto del trattamento chemioterapico.

1.3 Razionale dello studio

I tumori del pancreas rappresentano tumori a prognosi infausta e, sebbene globalmente relativamente rari, sono la quarta causa di morte per neoplasia nei paesi occidentali (3).

I trattamenti medici oggi disponibili in questa malattia, nello specifico i farmaci chemioterapici, hanno dimostrato di poter migliorare la prognosi dei pazienti sia in fase avanzata sia dopo l'intervento chirurgico (6).

I chemioterapici che si sono dimostrati attivi nel carcinoma del pancreas sono prevalentemente la gemcitabina, i derivati del platino e le fluoropirimidine (6).

Tuttavia i risultati anche della migliore chemioterapia non sono eccellenti, ottenendo una risposta tumorale in meno della metà dei pazienti, una sopravvivenza mediana in pazienti con malattia avanzata inferiore ai 12 mesi e una sopravvivenza a 5 anni di pazienti radicalmente resecati intorno al 20%.

In considerazione di questi risultati, della disponibilità di più agenti attivi e dei possibili effetti tossici dei trattamenti, la selezione dei pazienti attraverso lo studio di fattori individuali o a livello tumorale con ruolo prognostico e predittivo di possibile efficacia del trattamento appare un campo di notevole interesse.

In questo ambito, le aree di maggiore studio e più promettenti sono rappresentate da:

1) studio di EGFR e della "pathway" ad esso associata

- 2) studio di polimorfismi di geni candidati
- 3) studio dei micro-RNAs.

2. Metodi

2.1 Disegno dello studio e obiettivi

L'obiettivo delle nostre ricerche è stato quello di identificare fattori prognostici e predittivi di efficacia della chemioterapia in pazienti con carcinoma del pancreas.

Nello specifico gli obiettivi principali dello studio sono stati:

1) correlazione dello stato di espressione di EGFR con la sopravvivenza globale e libera da ripresa di malattia in pazienti operati per carcinoma del pancreas e trattati con chemioterapia adiuvante con gemcitabina

2) correlazione di polimorfismi di geni candidati implicati nel meccanismo d'azione e nel metabolismo di derivati del platino e gemcitabina con gli effetti della chemioterapia in pazienti con carcinoma del pancreas avanzato trattati con chemioterapia; i parametri presi in considerazione in questi pazienti sono stati:

- la sopravvivenza globale dei pazienti
- l'intervallo libero da progressione di malattia
- la percentuale di risposte obiettive
- la tossicità riportata.

3) correlazione di espressione di miRNAs con l'outcome di pazienti operati per carcinoma del pancreas e trattati con chemioterapia adiuvante o di pazienti con malattia metastatica trattati con gemcitabina in monoterapia. Anche in questi caso l'espressione di miRNAs è stata correlata nello specifico con:

- la sopravvivenza globale dei pazienti
- l'intervallo libero da progressione o recidiva di malattia
- la percentuale di risposte obiettive.

Per poter valutare i fattori in studio abbiamo condotto uno studio di coorte retrospettivo su due coorti di pazienti affetti da carcinoma del pancreas, una di pazienti resecati e trattati con chemioterapia adiuvante, l'altra di pazienti con malattia avanzata trattati con chemioterapia esclusiva.

I confronti tra le informazioni cliniche e i dati biologici sono stati eseguiti mediante i test χ^2 di Pearson e il test di Wilcoxon.

La sopravvivenza globale (OS) è stata calcolata come l'intervallo di tempo tra l'intervento chirurgico per i pazienti resecati o l'inizio della chemioterapia per quelli avanzati e il decesso

avvenuto per qualsiasi causa. La sopravvivenza libera da recidiva di malattia (DFS) è stata calcolata come il tempo intercorso tra la data dell'intervento chirurgico e la data di recidiva di malattia o morte in assenza di recidiva. La sopravvivenza libera da progressione di malattia (PFS) è stata calcolata come l'intervallo di tempo trascorso tra l'inizio della chemioterapia e la prima documentazione di progressione di malattia o la morte del paziente in caso di assenza di progressione documentata.

Le curve di OS, DFS e PFS sono state costruite secondo il modello di Kaplan-Meier e le differenze studiate sono state analizzate usando il log-rank test.

Qualora necessario le variabili prognostiche identificate nell'analisi multivariata sono state incluse in analisi multivariate condotte secondo il modello del rischio proporzionale di Cox.

Le analisi statistiche sono state effettuate mediante software SPSS e GraphPad.

2.2 Pazienti selezionati e trattamenti

Sono state incluse nello studio due coorti di pazienti affetti da carcinoma del pancreas trattati presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana:

1) un primo gruppo di 100 pazienti affetti da adenocarcinoma pancreatico sottoposto a resezione chirurgica per la malattia e successivamente a trattamento chemioterapico adiuvante con gemcitabina e seguiti in follow up presso le strutture del Polo Oncologico dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana. I criteri di selezione per questi pazienti sono stati:

- diagnosi istologica di adenocarcinoma del pancreas
- stadio di malattia I-II
- malattia sottoposta a resezione chirurgica
- disponibilità del materiale istologico e consenso del paziente a poterlo analizzare
- performance status 0-2
- età compresa tra i 18 e i 75 anni
- trattamento con chemioterapia adiuvante con gemcitabina
- adeguata funzionalità midollare, epatica e renale
- assenza di comorbidità di rilievo che potessero compromettere la fattibilità del trattamento o modificare la prognosi
- disponibilità dei dati di follow up sull'eventuale progressione e decesso.

Questo gruppo di pazienti è stato incluso in toto nell'analisi di espressione di EGFR e un gruppo di questi pazienti anche nell'analisi di espressione dei miRNAs.

2) un altro gruppo di pazienti affetti da carcinoma del pancreas avanzato trattati con chemioterapia esclusiva; all'interno di questo gruppo abbiamo identificato due sottogruppi di pazienti, uno trattato con monochemioterapia con gemcitabina (65 pazienti) tutti trattati e seguiti presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana e uno trattato con polichemioterapie contenenti anche derivati del platino e fluoro pirimidine (122 pazienti) trattati a Pisa o presso le U.O. di Oncologia Medica dell'Ospedale San Raffaele di Milano e di Carrara. I criteri di selezione dei pazienti in questo gruppo sono stati:

- diagnosi istologica di adenocarcinoma del pancreas
- stadio di malattia III giudicato non suscettibile di terapie locali o IV
- disponibilità del materiale istologico e consenso del paziente a poterlo analizzare per i pazienti trattati con gemcitabina in monochemioterapia
- consenso del paziente a sottoporsi a prelievo di sangue periferico e alle analisi genetiche su tale materiale (per tutti i pazienti inclusi)
- performance status 0-2
- età compresa tra i 18 e i 75 anni
- trattamento con chemioterapia con gemcitabina o con combinazioni contenenti anche derivati del platino e fluoro pirimidine
- adeguata funzionalità midollare, epatica e renale
- assenza di comorbidità di rilievo che potessero compromettere la fattibilità del trattamento o modificare la prognosi
- disponibilità dei dati di follow up su risposte, tossicità e sull'eventuale progressione e decesso.

Questo gruppo di pazienti è stato incluso nelle analisi dei polimorfismi genici; alcuni pazienti trattati con sola gemcitabina sono stati anche analizzati come gruppo a se stante per le analisi dei miRNAs.

I trattamenti oncologici sono stati ricevuti secondo le linee guida specifiche del centro e i pazienti sono stati trattati e seguiti secondo la migliore pratica clinica corrente. In particolare, i pazienti resecati hanno ricevuto sempre una chemioterapia adiuvante con:

- Gemcitabina 1000 mg/mq ev in infusione endovenosa di 30 minuti ripetuta ai giorni 1, 8 e 15 ogni 28 per 6 cicli.

I pazienti con malattia avanzata hanno ricevuto chemioterapia con sola gemcitabina come i pazienti resecati (65 pazienti) oppure polichemioterapie con regimi contenenti anche derivati del platino e/o fluoropirimidine (in particolare la combinazione di Gemcitabina e Oxaliplatino

GEMOX, la combinazione di gemcitabina, cisplatino, epirubicina e fluoropirimidine PEFG/PEXG, la combinazione di gemcitabina e capecitabina CapeGem) (23; 31; 38).

Eventuali riduzioni di dose o rinvii sono stati applicati secondo le normali linee guida del centro.

I pazienti con malattia avanzata venivano rivalutati mediante esame TAC ogni 2-3 mesi di terapia; il trattamento chemioterapico veniva proseguito per un periodo di massimo 6 mesi.

La risposta obiettiva è stata registrata secondo i criteri RECIST e la tossicità secondo i criteri NCI.

Tutti i pazienti venivano sottoposti ad adeguato follow up dopo la fine del trattamento con esami e visite di rivalutazione effettuate ogni 3 mesi. Per i pazienti resecati, dopo 2 anni dall'intervento chirurgico, le visite di controllo venivano effettuate ogni 6 mesi fino ad almeno 5 anni dalla data di intervento.

I dati clinici dei pazienti sono stati registrati dalle cartelle cliniche in appositi database ed anonimizzati prima di essere crociati con i rispettivi materiali biologici mediante un codice alfanumerico non riconducibile poi ai dati dei pazienti.

Sono stati inoltre prelevati e conservati adeguatamente campioni ematici di sangue venoso periferico dei pazienti metastatici per le analisi genetiche individuali; il prelievo ematico è stato eseguito durante una delle sedute di chemioterapia utilizzando l'accesso venoso già necessario per la terapia stessa.

Sono stati inoltre richiesti campioni di materiale tumorale paraffinato già ottenuto a scopo diagnostico o dall'intervento chirurgico e conservato presso le U.O. di Anatomia Patologica per le analisi di espressione o di mutazioni a livello tumorale.

2.3 Tecnologie utilizzate

Le analisi dei polimorfismi genici sono state eseguite presso i laboratori della VU University Medical Center di Amsterdam, Olanda.

Ai pazienti inclusi nel protocollo in base ai criteri sopra riportati è stato effettuato un singolo prelievo ematico venoso periferico da 5 ml. Il prelievo è stato preferibilmente eseguito prima che il paziente cominciasse la terapia antitumorale da un accesso venoso posizionato per l'esecuzione della terapia stessa. I campioni di sangue, così ottenuti, sono stati conservati a -20° C per un periodo di tempo massimo di 10 giorni prima di procedere all'estrazione del DNA. Al momento dell'estrazione i campioni sono stati mantenuti a temperatura ambiente fino a completo scongelamento.

L'estrazione del DNA è stata eseguita mediante il QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, CA, USA); il DNA ottenuto è stato conservato a -20° C. La procedura per la raccolta, trasferimento e trattamento del campione sono quelle già descritte in letteratura (107).

Per valutare la purezza e la quantità di DNA ottenuto, un volume di 1µl del campione è stato diluito in 500 µl di acqua distillata autoclavata e ne è stata misurata l'assorbanza mediante lo spettrofotometro UVIKON (Kontron Instruments). Le letture dell'assorbanza sono state effettuate alla lunghezza d'onda di 260 nm, lunghezza alla quale assorbono gli acidi nucleici, tenendo conto del fatto che un valore di assorbanza di 1 con un cammino di 1 cm corrisponde a 50 µg/ml di DNA a doppia elica ed a 40 µg/ml di DNA a singola elica. Misurando, inoltre, l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 280 nm (picco d'assorbanza delle proteine, principale contaminante degli estratti) ed effettuando il rapporto tra le rispettive assorbanze a 260 e 280 nm si può ottenere una stima della purezza del DNA; in genere è stato considerato soddisfacente un indice di purezza compreso tra 1.6 e 1.9.

La valutazione dei polimorfismi del singolo nucleotide (SNPs) degli enzimi coinvolti nel meccanismo d'azione del platino e della gemcitabina studiati (ERCC1 C118T, XPD Asp312Asn, XPD Lys751Gln, XRCC1 Arg399Gln, CDA A79C, RRM1 A2464G, RRM1 A2542G) è stata effettuata mediante un'analisi di PCR quantitativa utilizzando lo strumento ABI PRISM 7900HT sequence detection system (Applied Biosystems).

Le coppie di primers e le sonde utilizzate per la genotipizzazione dei polimorfismi dei geni oggetto di studio (XPD, ERCC1, XRCC1, RRM1 e CDA) sono state disegnate sulla base delle sequenze geniche rese disponibili da GeneBank, utilizzando l'apposito software File Builder. Le metodiche utilizzate per la valutazione dei polimorfismi sono quelle già descritte in precedenti lavori del gruppo (108).

I campioni tumorali sono stati ottenuti da interventi chirurgici di duodenocefalopancreasectomia, splenopancreasectomia sinistra, pancreasectomia totale o biopsie dalla lesione pancreaticca o di lesioni metastatiche eseguite presso la Chirurgia Generale 1° Universitaria e la Chirurgia Generale e Trapianti nell'Uremico e nel Diabetico dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana.

Subito dopo il prelievo del materiale, i campioni tissutali sono stati congelati a fresco e conservati in azoto liquido.

Successivamente sono state ottenute delle sezioni di tessuto fresco di 5 µm, fissate in etanolo al 75%, colorate con ematossilina/eosina e disidratate in etanolo al 100% e xylene. Le cellule tumorali sono state dissecate mediante microdissezione laser usando lo strumento Leica LMD7000, come precedentemente descritto (109). L'utilizzo della microdissezione laser ha

consentito di poter ottenere un materiale tumorale molto puro e di limitare le contaminazioni da materiale non neoplastico, ad origine dai dotti pancreatici normali o dal tessuto fibrosclerotico che è molto abbondante nelle lesioni tumorali del pancreas.

I carcinomi del pancreas sono stati classificati e stadiati secondo le raccomandazione della World Health Organization (WHO) (110).

EGFR è stato analizzato a livello citoplasmatico e di membrana mediante analisi immunohistochimica con anticorpo specifico (EGFR pharmDx Kit), secondo le metodologie già descritte e il risultato è stato ottenuto dall'analisi globale dell'intensità dell'espressione e della percentuale di cellule positive (111).

La gestione dei campioni tumorali, la loro diagnosi e classificazione e le analisi di immunohistochimica di EGFR sono state effettuate presso i laboratori dell'Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana.

Una quota del materiale tumorale è stata inviata ai laboratori di Amsterdam per le analisi di espressione di miRNAs. In un primo tempo l'RNA è stato estratto dai tessuti e trascritto e il cDNA risultante è stato amplificato mediante Taqman MicroRNA assays per miR-21 e il controllo RNU43. Le analisi di PCR sono state eseguite nello strumento 7500HT sequence detection system (Applied Biosystems), in accordo con le istruzioni del produttore. La quantificazione dell'espressione è stata eseguita mediante il metodo della ΔC_t , come precedentemente descritto (66).

In un secondo tempo il profilo di espressione di miRNAs è stato valutato con la tecnologia dei microarray. Profili di espressione ad alta risoluzione dei miRNAs sono stati ottenuti con il Toray 3D Gene miRNA chip valutando 1200 tipi di miRNAs umani. I vetrini di microarray che hanno superato i controlli di qualità per l'RNA sono stati scannerizzati usando il ProScanArray.

Tutte le analisi biomolecolari sono state ripetute tre volte e valutate con campioni di controllo; controlli di qualità sono stati eseguiti in tutte le fasi di analisi.

3. Risultati

3.1 Analisi di espressione di EGFR

La valutazione immunohistochimica di EGFR è stata eseguita su 100 campioni tumorali micro dissecati di pazienti operati per carcinoma duttale del pancreas trattati con chemioterapia adiuvante con Gemcitabina.

L'espressione di EGFR è risultata presente nell'84% dei campioni a livello nucleare e nell'82% a livello citoplasmatico. Il punteggio di valutazione dell'espressione di EGFR tenuto conto della percentuale di cellule positive e dell'intensità di espressione risultava tra 0 e 10 con un valore mediano di 7.

Il valore di espressione di EGFR (alto o basso rispetto al valore mediano) non è risultato correlato alla prognosi dei pazienti (figura 11 e 12).

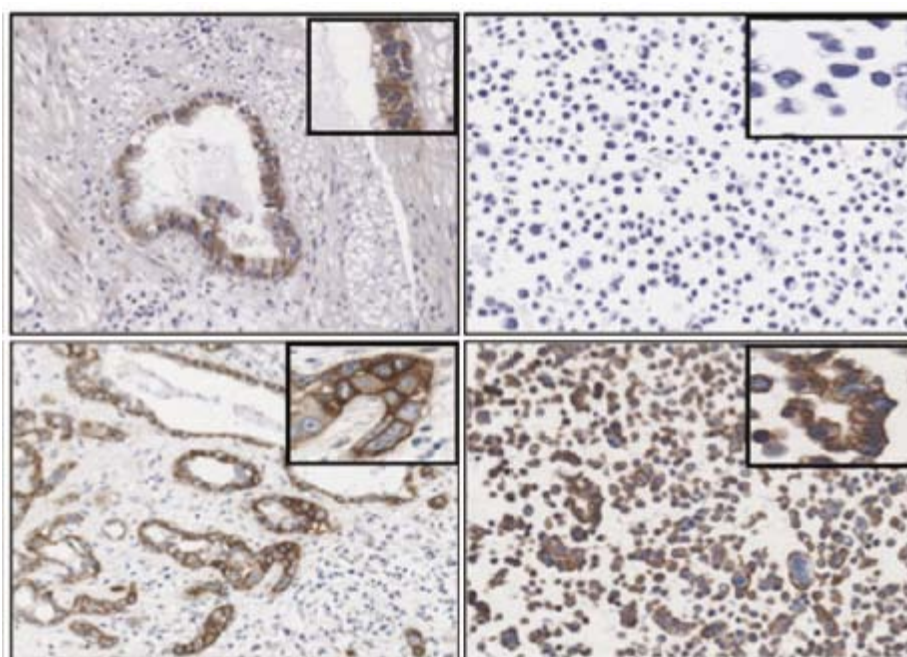


Figura 11. Esempi di immunohistochimica per EGFR (pannelli a sinistra) e controlli positivi e negativi (pannelli a destra)

Tuttavia, un'elevata espressione di EGFR è risultata associata a un minore grado di differenziazione cellulare ($p=0.036$); la presenza di un tumore G3 è risultata essere un fattore prognostico indipendente di peggiore DFS (mediana 16.6 mesi, 95% CI 11.4–21.8, verso 7.3 mesi, 95% CI 5.5–9.2; $p=0.007$) e OS (mediana 24.8 mesi, 95% CI 15.8–33.7, verso 11.1 mesi, 95% CI 0.2–22.1; $p=0.018$) in questa serie, ed è stato confermato anche nell'analisi

multivariata che ha incluso anche lo stato linfonodale (HR 2.0, 95% CI 1.1–3.8, p=0.036) (figure 13 e 14).

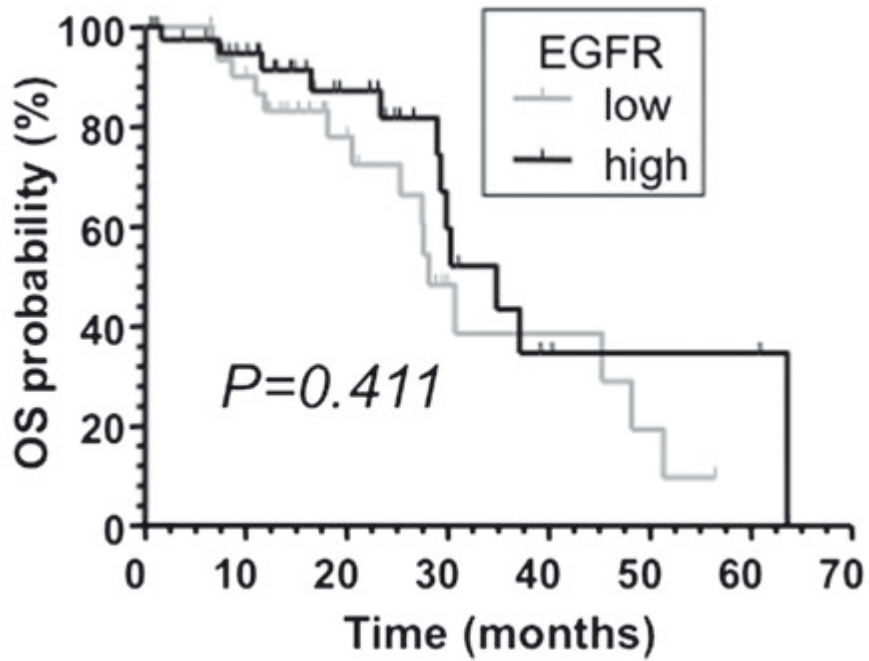


Figura 12. Curve di sopravvivenza dei pazienti in base all'espressione di EGFR

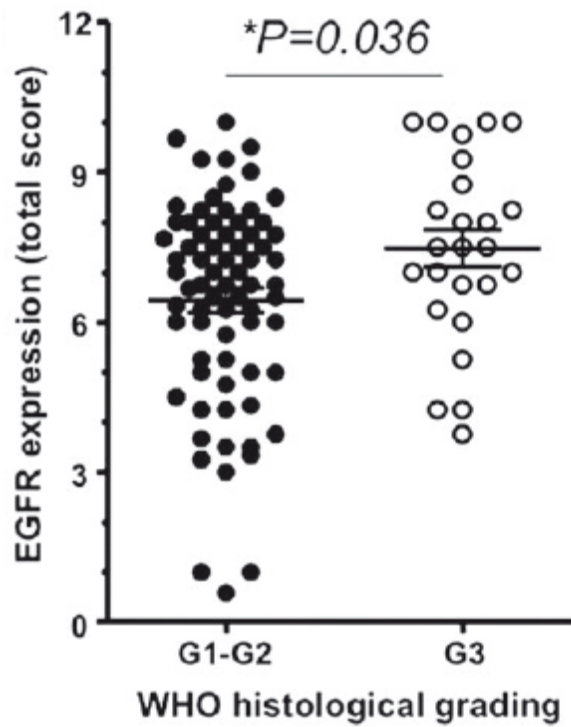


Figura 13. Espressione di EGFR in base al grading tumorale

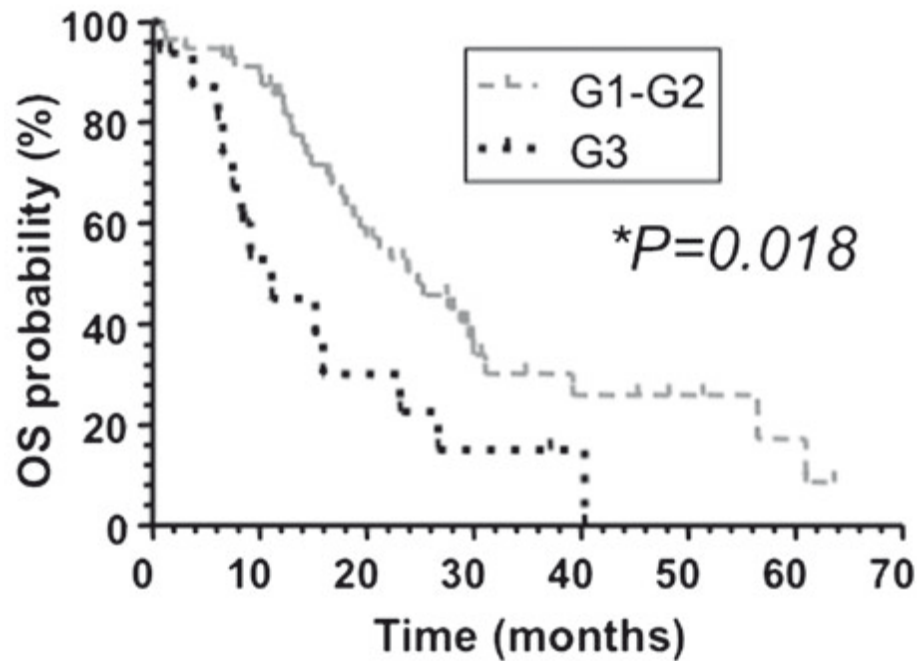


Figura 14. Curve di sopravvivenza dei pazienti in base al grading tumorale

3.2 Analisi di espressione dei microRNA

Per le analisi di espressione dei miRNAs sono stati utilizzati i campioni tumorali di 31 pazienti affetti da carcinoma del pancreas metastatico trattati con monochemioterapia con gemcitabina (setting avanzato) e di 50 pazienti con carcinoma del pancreas resecato radicalmente trattati invece con gemcitabina in fase adiuvante (setting adiuvante). Gli studi di microarray sono stati effettuati solo nei pazienti operati

L'espressione di miR-21 è risultata circa 1000 volte superiore nei campioni tumorali rispetto a campioni di epitelio duttale pancreatico normale microdissecato (figura 15). Inoltre, i campioni tumorali non micro dissecati presentavano un'espressione di miR-21 inferiore rispetto ai campioni purificati mediante micro dissezione (figura 16).

L'espressione di miR-21 è risultata associata al grado di differenziazione risultando maggiore in tumori scarsamente differenziati ($p=0.01$); non sono state osservate altre associazioni tra l'espressione di miR-21 e i fattori clinico-patologici di malattia.

L'elevata espressione di miR-21 è risultata associata con una prognosi peggiore rispetto ai pazienti con bassa espressione sia nel setting adiuvante che metastatico.

In particolare, tra i pazienti con malattia avanzata il gruppo con elevata espressione di miR-21 ha presentato minore sopravvivenza globale (mediana: 6.7 mesi, 95% CI 5.5–7.9 verso 11.2 mesi, 95% CI, 4.5–17.8; HR 3.1, 95% CI, 1.4–7.1; $P = 0.01$) e minore sopravvivenza libera da

progressione di malattia (PFS mediana 4.2 mesi verso 7.8 mesi in pazienti con bassa espressione; HR 2.4, 95% CI, 1.1–5.3; P = 0.03) (figura 17).

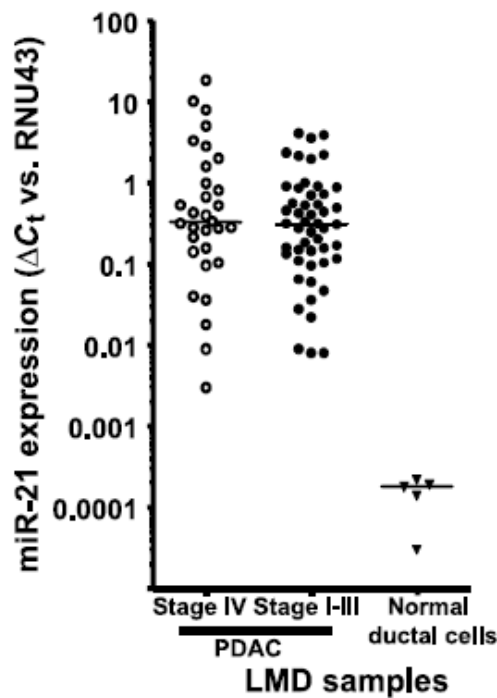


Figura 15. Espressione di miR-21 nell'epitelio duttale pancreatico normale e dei carcinomi duttali del pancreas

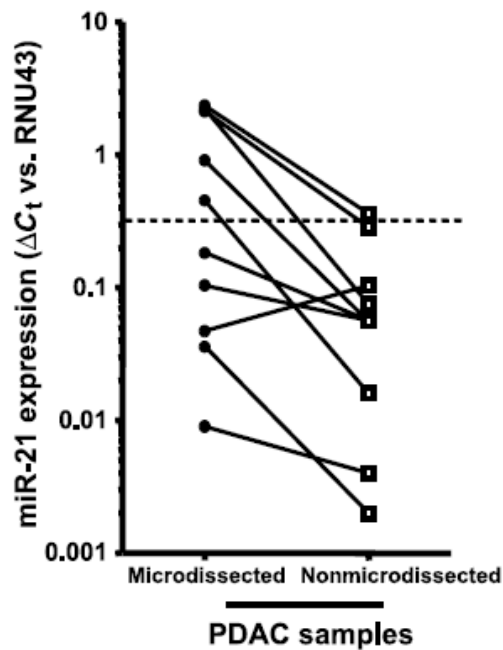


Figura 16. Espressione di miR-21 in campioni di adenocarcinoma duttale del pancreas microdissecato e non microdissecato

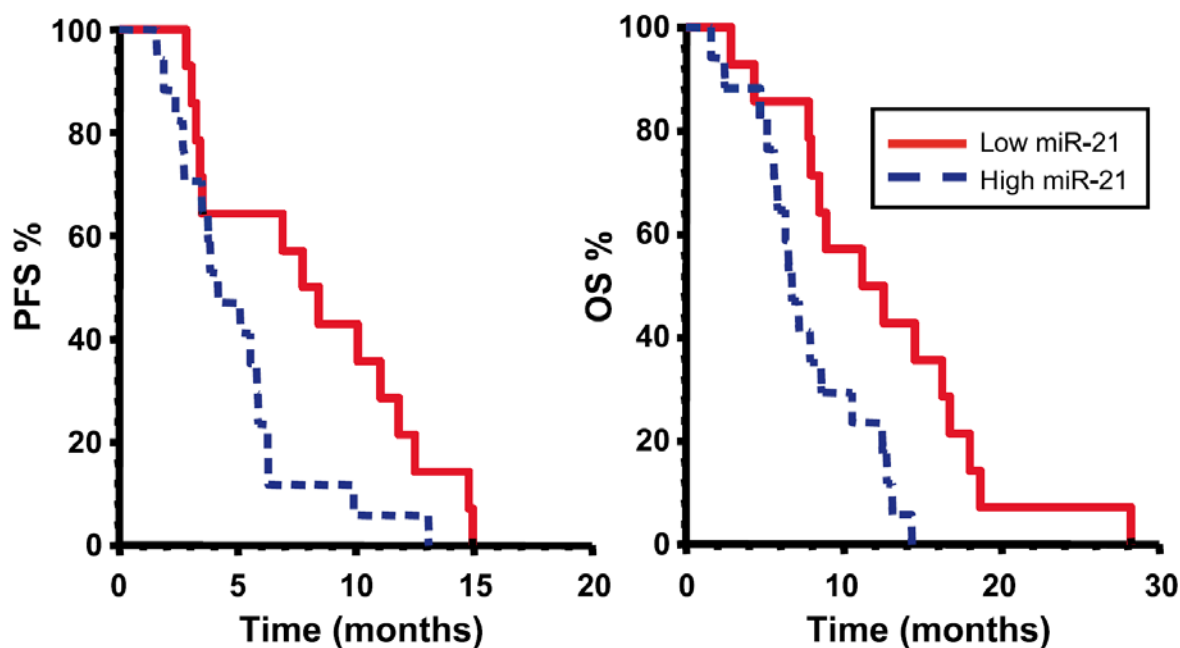


Figura 17. Curve di sopravvivenza libera da progressione (PFS) e globale (OS) in pazienti con carcinoma pancreatico avanzato trattato con gemcitabina in base all'espressione di miR-21.

Analoghi risultati sono stati ottenuti tra i pazienti sottoposti a resezione chirurgica con effetto dell'espressione di miR-21 sulla sopravvivenza globale con un'OS mediana 13.2 mesi (95% CI, 8.3–18.0) per i pazienti con espressione di miR-21 sopra i valori mediани verso 23.7 mesi per i pazienti con bassa espressione (95% CI 12.3–35.0; HR 3.1; 95% CI 1.4–7.3; $p = 0.008$).

Simili dati sono ottenuti per la DFS (HR = 4.4, 95% CI 1.8–10.7; $p = 0.001$).

L'analisi multivariata dei dati ha confermato il ruolo dell'espressione di miR-21 come fattore prognostico/predittivo indipendente (HR 3.1; 95% CI 1.2–5.3, $p = 0.003$).

Sono stati inoltre valutati in modelli sperimentali in vitro (7 colture cellulari primarie e 7 linee cellulari di carcinoma pancreatico) i possibili meccanismi legati a vie di controllo dell'apoptosi e dell'angiogenesi e studiate possibilità di superamento di questa resistenza mediante specifico blocco farmacologico di altre vie di trasduzione dei segnali a livello intracellulare. Questi risultati hanno permesso di ipotizzare possibili interazioni farmacologiche positive della gemcitabina con farmaci che agiscono su p-Akt, PTEN e mTOR ed aprono la strada a studi clinici di combinazione nel carcinoma del pancreas.

Dall'analisi di profilo di espressione di miRNA con microarray, l'espressione di miR-211 è emersa come il principale discriminante prognostico di sopravvivenza globale nei pazienti resecati. I pazienti con bassa espressione di miR-211 rispetto ai valori mediани della

popolazione hanno presentato sopravvivenze mediane nettamente inferiori (14.8 mesi, 95%CI 13.1-16.5, verso 25.7 mesi, 95%CI 16.2-35.1, log-rank $p=0.004$). L'analisi multivariata ha confermato il ruolo dell'espressione di miR-211 come fattore indipendente dopo aggiustamento per i principali fattori prognostici noti (HR 2.3, $P=0.03$).

3.3 Analisi di polimorfismi genici

L'analisi dei polimorfismi genici è stata effettuata su 122 pazienti con carcinoma pancreatico avanzato trattati con regimi contenenti derivati del platino e fluoropirimidine in associazione alla gemcitabina e 65 pazienti trattati con sola gemcitabina.

Tutti i polimorfismi studiati sono risultati seguire l'equilibrio di Hardy-Weinberg e le loro frequenze alleliche sono risultate paragonabili a quelle precedentemente riportate in popolazioni simili.

Non sono state osservate differenze significative tra i genotipi e le caratteristiche clinico-patologiche e non sono state dimostrate associazioni significative tra diversi genotipi.

Tra i pazienti trattati con chemioterapia di combinazione, contenente derivati del platino, all'analisi univariata, i polimorfismi dei geni di riparazione del DNA sono risultati associati a diversa sopravvivenza. In particolare, è stata osservata una sopravvivenza globale significativamente maggiore (mediana 15.1 mesi; 95% CI: 10.6–19.5) in pazienti con genotipo XPD Asp312Asp rispetto al genotipo XPD Asn312Asn (OS mediana 11.6 mesi, 95% CI: 9.3–13.9) e alla forma eterozigote (11.2 mesi, 95% CI: 9.5–13.0, $p = 0.041$).

La differenza si mantiene anche confrontato i due genotipi raggruppati XPD Asn312Asn + Asp312Asn verso XPD Asp312Asp (11.2 mesi; 95% CI: 9.9–12.6 verso 15.1 mesi; 95% CI: 10.6–19.5; $p = 0.008$) (figura 18).

In maniera analoga, il genotipo XPD Gln751Gln ha avuto una peggiore prognosi in termini di sopravvivenza mediana (10.3 mesi; 95% CI: 4.0–16.5) rispetto al genotipo XPD Lys751Lys (15.1 mesi; 95% CI: 10.6–19.5) e XPD Lys751Gln (11.9 mesi; 95% CI: 10.2–13.6, $p = 0.004$; figura 18). La differenza è risultata significativa anche analizzando il genotipo XPD Lys751Lys + Lys751Gln (OS mediana 13.3 mesi, 95% CI: 10.9–15.7) verso XPD Gln751Gln ($p = 0.003$).

Risultati significativi per la sopravvivenza si sono ottenuti anche con i genotipi ERCC1 con le varianti C118C e C118T con una sopravvivenza mediana inferiore rispetto a T118T (11.8 mesi, 95%CI: 10.4–13.4 verso 13.3 mesi, 95% CI: 9.7–17.0; $p = 0.044$) e per i genotipi di XRCC1 con i pazienti portatori di genotipo Arg399Arg con sopravvivenza lievemente

superiore alle altre varianti XRCC1 Arg399Gln + Gln399Gln (13.3 mesi, 95% CI: 9.8–16.8 verso 11.8 mesi 95% CI: 9.0–13.4; $p = 0.036$).

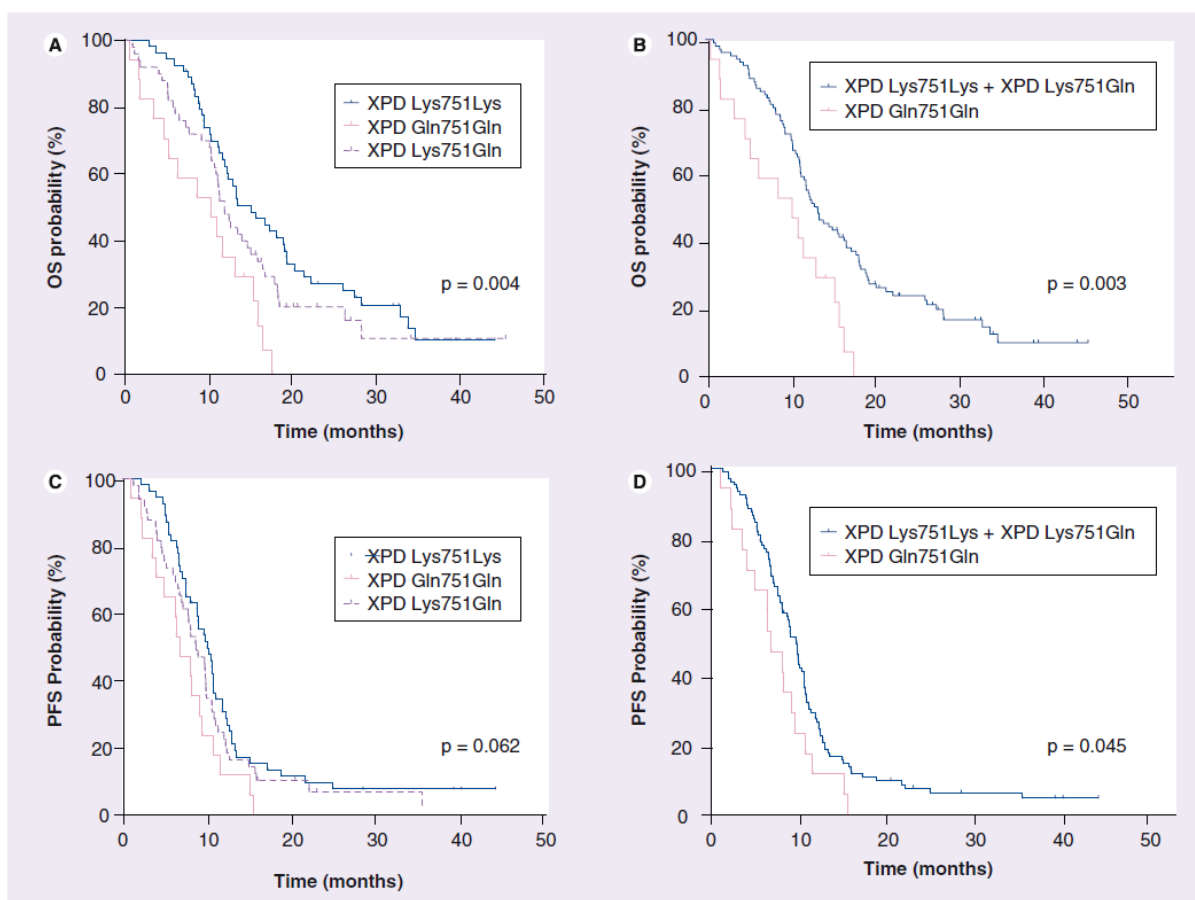


Figura 18. Curve di sopravvivenza libera da progressione (PFS) e globale (OS) in pazienti con carcinoma pancreatico avanzato trattato con combinazioni contenenti derivati del platino in base ai polimorfismi di XPD

All'analisi multivariata i polimorfismi XPD Gln751Gln e XRCC1 Arg399Gln + Gln399Gln si sono confermati fattori predittivi di sopravvivenza inferiore con un rischio di morte aumentato di circa 2 volte (HR 1.9, 95% CI: 1.3–2.9; $p = 0.003$ e HR 2.0, 95% CI: 1.1–3.7; $p = 0.030$, rispettivamente).

Poiché XPD, ERCC1 e XRCC1 sono tutti coinvolti nei meccanismi di riparazione del DNA è stata valutata l'associazione di più polimorfismi di questi geni; i genotipi considerati a rischio sono stati ERCC1 C118C +C118T, XPD Asn312Asn + Asp312Asn, XPD Gln751Gln e XRCC1 Arg399Gln-Gln399Gln. I pazienti portatori di più di 2 di queste varianti hanno presentato una sopravvivenza nettamente inferiore con un HR di 2.7 (95% CI: 1.8–4.2; $p < 0.001$) (figura 19).

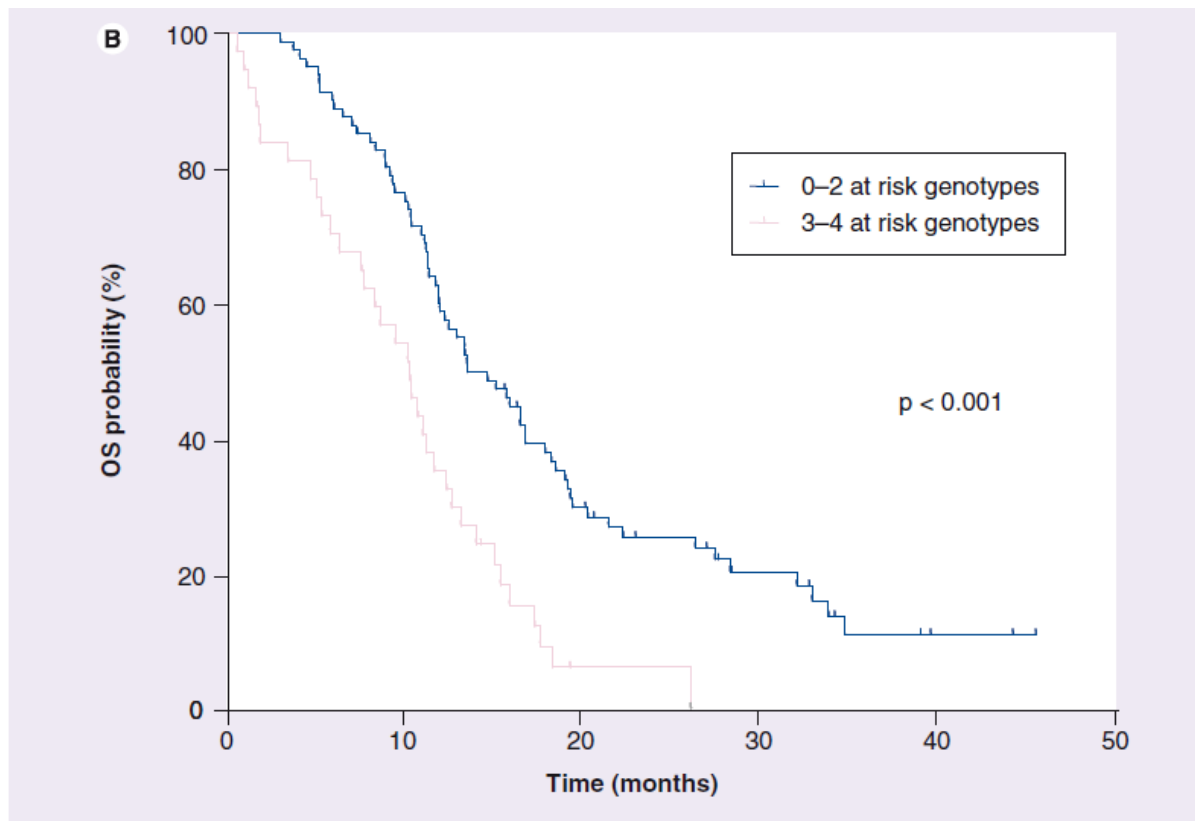


Figura 19. Curve di sopravvivenza globale (OS) in pazienti con carcinoma pancreatico avanzato trattato con derivati del platino in base alla presenza di genotipi a rischio nei geni di riparazione del DNA studiati

Il genotipo XPD Gln751Gln è stato associato anche a aumentato rischio di progressione di malattia (HR: 2.1, 95% CI: 1.2–3.5; $p = 0.008$).

Non sono state osservate significative differenze tra i polimorfismi studiati e la tossicità del trattamento chemioterapico.

Non sono state riscontrate differenze significative per i polimorfismi di CDA e RRM1 studiati nella popolazione di pazienti trattati con la polichemioterapia.

I risultati ottenuti con i polimorfismi dei geni di riparazione del DNA si sono confermati predittivi di efficacia del trattamento con derivati del platino; infatti, nel gruppo di controllo di pazienti trattati con sola gemcitabina non si sono osservate differenze significative in termini di sopravvivenza in base ai genotipi presenti.

4. Discussione, conclusioni e sviluppi futuri

Il carcinoma del pancreas rappresenta ancora oggi un problema medico non risolto; la malattia infatti purtroppo continua ad avere una prognosi infausta sia dopo resezione chirurgica che in caso di malattia avanzata.

Certamente negli ultimi anni la chemioterapia ha dimostrato di poter migliorare lievemente questa prognosi ma attualmente pur avendo più classi di farmaci attivi non disponiamo di adeguati strumenti di selezione dei pazienti da dover sottoporre a trattamento e per la scelta del tipo di trattamento e questo si manifesta con un beneficio degli effetti del trattamento medico che viene ottenuto solo da una minoranza dei pazienti trattati.

Per questi motivi lo studio di fattori prognostici e di fattori predittivi di efficacia della chemioterapia rappresenta un punto cruciale in questa malattia e ha stimolato molta ricerca negli ultimi anni.

In quest'ottica l'analisi dei microRNA rappresenta certamente un campo innovativo con implicazioni importanti perché permette valutando la funzione dei miRNA selezionati di poter anche ipotizzare meccanismi di superamento della resistenza ai farmaci.

Il nostro studio è stato il primo a dimostrare un ruolo predittivo dell'espressione di miR-21 sull'efficacia di gemcitabina in pazienti con adenocarcinoma duttale del pancreas. I risultati del nostro studio sono coerenti nel dimostrarne un effetto analogo sia nel setting di pazienti metastatici che in fase adiuvante.

In entrambi i setting oggi potremmo disporre di terapie alternative (es. le fluoropirimidine nel trattamento adiuvante hanno la stessa efficacia globale di gemcitabina ma diverso profilo di tossicità) che potrebbero sostituire la gemcitabina in pazienti resistenti.

Sebbene molti miRNA siano stati descritti (oltre 16000) e sia noto che ogni cellula ne esprima più di 500, solo alcuni sembrano avere un ruolo funzionale importante e tra questi miR-21 (89). A conferma di questo abbiamo comunque iniziato a lavorare su piattaforme di microarray che ci permetteranno di valutare 1200 miRNA e che ci hanno confermato il ruolo di miR-21 suggerendoci però anche lo studio di altre molecole.

Molti studi hanno già valutato altri miRNA come fattore prognostico nel tumore del pancreas; il punto di forza del nostro studio sta nell'averlo fatto in un gruppo omogeneo di pazienti per caratteristiche patologiche e per trattamento, nell'aver valutato le differenze di espressione con le cellule duttali pancreatiche non tumorali, nell'aver potuto caratterizzare funzionalmente su linee cellulari di tumore del pancreas gli effetti dell'espressione di miR-21 ipotizzando eventuali possibili bersagli per una terapia di associazione con gemcitabina che

possa permettere di superarne la resistenza, confermando questa possibilità sulle linee cellulari e aprendo la strada a studi clinici che sono già partiti.

Un altro importante pregio delle nostre ricerche è stato rappresentato dall'utilizzo di tessuti microdissecati con tecnologia laser; questa tecnologia consente di selezionare in modo molto preciso singole e gruppi di cellule tumorali isolandole dal contesto di tessuto fibro-sclerotico in cui esse sono normalmente immerse nel carcinoma del pancreas. La microdissezione laser consente di ottenere materiale tumorale più puro ed essendo l'espressione genica e dei miRNA differente tra le cellule tumorali e quelle sane questo migliora in maniera importante la performance degli studi farmacogenetici (109).

Per quanto riguarda le analisi di EGFR, lo studio di Moore (33) ha suggerito partendo da un dato clinico come questo recettore possa essere importante nei carcinomi del pancreas metastatico sebbene non sia stato possibile identificare fattori predittivi di attività ed efficacia di farmaci anti-EGFR nel carcinoma del pancreas.

La nostra idea è stata quella di valutare anche il ruolo dell'espressione di EGFR nella malattia in stadio iniziale e quindi in pazienti resecati, dimostrando come questo non rappresenti un fattore prognostico. La mancata correlazione dell'espressione di EGFR con la sopravvivenza nei pazienti resecati non stupisce in quanto la differenza in tumori avanzati potrebbe dipendere da molti fattori in particolare di modulazione dell'espressione o fosforilazione di EGFR o di altre molecole nelle pathways correlate differente nella malattia metastatica rispetto alle fasi iniziali di malattia.

I principali limiti del nostro studio sono una numerosità del campione non elevata e la metodologia retrospettiva; riguarda il numero di pazienti, sebbene il tumore del pancreas rappresenti una patologia ad elevata letalità, è utile ricordare che la sua frequenza non è molto elevata, con circa 8000 nuovi casi all'anno in Italia e circa 500 nella Regione Toscana. Pertanto la possibilità di aver raccolto dati di 100 pazienti operati e di quasi 200 pazienti metastatici trattati omogeneamente e selezionati per comuni criteri di inclusione è certamente da considerare un risultato positivo, sebbene in futuro sarà necessario aumentare la casistica e confermare questi dati anche in altre casistiche di controllo.

Certamente l'identificazione e lo studio iniziale di fattori predittivi e prognostici non può che partire da analisi retrospettive; nonostante i limiti di queste analisi, nel nostro studio abbiamo cercato di scegliere dei criteri di inclusione dei pazienti omogenei per limitare i biases della selezione a posteriore dei casi. Ovviamente la dimostrazione di un forte fattore prognostico dovrà essere confermata in studi prospettici disegnati e potenziati adeguatamente ma la relativa rarità della patologia richiederà molti sforzi al riguardo per cui prima di passare ad

una fase di studi clinici prospettici è necessario avere molti dati dagli studi di laboratorio e da studi clinici retrospettivi condotti in modo corretto.

Altro limite degli studi di espressione proteica come nel caso di EGFR o di microRNA è la necessità di tessuto tumorale che a volte nei carcinomi del pancreas in fase avanzata potrebbe non essere disponibile in quanto la diagnosi di malattia può avvenire sull'esame citologico di poche cellule agoaspirate magari da sedi metastatiche. Per cercare di superare questo problema si sta lavorando molto anche a marcatori predittivi da poter studiare a livello ematico nel sangue circolante dei pazienti, certamente di più facile accesso.

Nel futuro probabilmente anche lo studio dei miRNA sarà possibile a livello ematico mediante studio di esosomi derivati dal tumore circolanti come anche sarà possibile estrarre e analizzare cellule tumorali circolanti, ma nel frattempo un altro filone di ricerca è stato quello di analizzare polimorfismi genici individuali che possano essere implicati in un diverso metabolismo dei chemioterapici o in una differente possibilità di esplicare i loro effetti tossici. In questo ambito il nostro ed altri gruppi avevano già evidenziato come varianti geniche individuali possano influenzare l'efficacia della chemioterapia con gemcitabina (76; 77; 65).

Recenti segnalazioni avevano inoltre indicato come polimorfismi nei geni implicati nei meccanismi di riparazione del DNA risultino importanti nel carcinoma pancreatico (59; 58).

Il nostro studio ha valutato polimorfismi funzionali in alcuni dei principali geni di riparazione del DNA confermandone il ruolo predittivo in pazienti con tumore del pancreas.

I punti di forza del nostro studio sono stati:

- 1) la possibilità di avere due bracci di pazienti uno trattato con derivati del platino per l'attività dei quali gli enzimi di riparazione del DNA hanno un ruolo fondamentale, e un altro trattato con sola gemcitabina; i risultati dello studio confermano come l'effetto prognostico dei polimorfismi studiati si veda solo nei pazienti trattati con derivati del platino;
- 2) l'analisi di combinazioni dei vari polimorfismi studiati; infatti, gli studi hanno identificato molti polimorfismi probabilmente implicati nella resistenza ai derivati del platino; la nostra analisi conferma come vi sia un piccolo effetto di ciascun polimorfismo ma come l'effetto si amplifica analizzando tutti i polimorfismi insieme.

Poiché nel carcinoma pancreatico avanzato l'aggiunta del derivato del platino ad un trattamento con gemcitabina sembra portare solo un beneficio modesto, la disponibilità di parametri predittivi di efficacia di questi farmaci potrebbe permettere di selezionare i pazienti da trattare per massimizzare il beneficio e soprattutto limitare invece gli importanti effetti collaterali che sono associati con la terapia a pazienti che non ne beneficerebbero.

I limiti principali del nostro studio di polimorfismi sono stati la mancata associazione con i risultati in termini di tossicità e risposte obiettive, dovuto probabilmente alla metodologia retrospettiva già descritta che non ha consentito di recuperare in modo preciso questo dato per tutti i pazienti. Infatti, precedenti studi che avevano valutato polimorfismi in questo ambito confermavano l'associazione tra l'effetto predittivo in sopravvivenza e quello sull'attività e la tossicità dei chemioterapici (108).

Al termine del percorso del dottorato di ricerca, ci poniamo l'obiettivo di proseguire nello studio dei fattori predittivi in questa difficile malattia e di esportare quanto fatto anche allo studio delle neoplasie delle vie biliari e delle neoplasie mucinose del pancreas in particolare dei carcinomi mucinosi papillari insorti su neoplasia papillare mucinosa intraduttale. Per quest'ultima entità abbiamo iniziato un progetto di caratterizzazione genetica e di studio in confronto dell'espressione dei miRNA con le neoplasie duttali.

Il passo successivo sarà quello di selezionare i biomarcatori più rilevanti da dover confermare e validare in senso prospettico. Per questo obiettivo abbiamo una possibilità importante; infatti, stiamo pianificando uno studio di fase III che confronti due trattamenti adiuvanti (Gemcitabina vs FOLFIRINOX) in pazienti con carcinoma del pancreas operato. Questo studio potrebbe rappresentare un'ottima piattaforma in cui validare prospetticamente i risultati ottenuti nelle analisi retrospettive condotte sull'espressione genica e di micro-RNA e sui polimorfismi genici.

5. Collaborazioni scientifiche

Le ricerche effettuate sono state eseguite all'interno del Polo Oncologico dell' Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana e dell' Area Vasta Nord-Ovest dell' Istituto Toscano Tumori, in collaborazione con le U.O. di Chirurgia Generale 1° Universitaria e di Chirurgia Generale e Trapianti nell'Uremico e nel Diabetico dell' Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, i laboratori dell' Anatomia Patologica e della Farmacologia dell' Università di Pisa e con il Dipartimento di Oncologia Medica del VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands. Hanno collaborato inoltre per le analisi dei polimorfismi genici le U.O. di Oncologia Medica dell' Istituto Scientifico San Raffaele di Milano e dell' Ospedale Civile di Carrara.

6. Bibliografia

1. *Global cancer statistics*. **Jemal A, Bray F, Center MM, et al.** 2011, *CA Clin Cancer J Clin*, Vol. 61, p. 69-90.
2. *I tumori in Italia, Rapporto 2006: Tumore del pancreas*. **Tumori, Associazione Italiana Registri.** 2006, *E&P*, Vol. Suppl. 2, p. 46-47.
3. *Cancer statistics, 2010*. **Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E.** 2010, *CA CANCER J CLIN*, Vol. 60, p. 277–300.
4. *Clinical Cancer Advances 2009: Major Research Advances in Cancer Treatment, Prevention, and Screening—A Report From the American Society of Clinical Oncology*. **Petrelli NJ, Winer EP, Brahmer J, et al.** 2009, *J Clin Oncol*, Vol. 27, p. 6052-6069.
5. *Pancreatic cancer*. **Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL.** 2004, *Lancet*, Vol. 363, p. 1049-1052.
6. —. **Vincent A, Herman J, Schulick R.** 2011, *Lancet*, Vol. 378, p. 607-620.
7. *Pancreatic cancer. Adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection*. **Kalser MH, Ellenberg SS.** 1985, *Arch Surg*, Vol. 120, p. 899-903.
8. *Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and periampullary region: Phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group.* . **Klinkenbijl JH, Jeekel J, Sahmoud T, et al.** 1999, *Ann Surg*, Vol. 230, p. 776-782.
9. *On statistical reanalysis, the EORTC trial is a positive trial for adjuvant chemoradiation in pancreatic cancer*. **Garofalo MC, Regine WF, Tan MT.** 2006, *Ann Surg* , Vol. 244, p. 332-333.
10. *Adjuvant combination chemotherapy (AMF) following radical resection of carcinoma of the pancreas and papilla of vater—Results of a controlled, prospective, randomized multicenter study*. **Bakkevold KE, Amesjo B, Dahl O, et al.** 1993, *Eur J Cancer*, Vol. 29A, p. 698-703.
11. *A Phase III Multicenter Prospective Randomized Controlled Trial in Patients with Resected Pancreaticobiliary Carcinoma*. **Takada T, Amano H, Yasuda H, et al.** 2002, *Cancer*, Vol. 95, p. 1685-1695.
12. *Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: A randomised controlled trial.* . **Neoptolemos JP, Dunn JA, Stocken DD, et al.** 2001, *Lancet*, Vol. 358, p. 1576-1585.

13. *A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer.* **Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, et al.** 2004, *N Engl J Med*, Vol. 350, p. 1200-1210.
14. *Meta-analysis of randomised adjuvant therapy trials for pancreatic cancer.* **Stocken DD, Buchler MW, Dervenis C, et al.** 2005, *Br J Canc*, Vol. 92, p. 1372 – 1381.
15. *Adjuvant Chemotherapy With Gemcitabine vs Observation in Patients Undergoing Curative-Intent Resection of Pancreatic Cancer. A Randomized Controlled Trial.* **Oettle H, Post S, Neuhaus P, et al.** 2007, *JAMA*, Vol. 297, p. 267-277.
16. *Adjuvant Chemotherapy With Fluorouracil Plus Folinic Acid vs Gemcitabine Following Pancreatic Cancer Resection. A Randomized Controlled Trial.* **Neoptolemos JP, Stocken DD, Bassi C, et al.** 2010, *JAMA*, Vol. 304, p. 1073-1081.
17. *Fluorouracil vs gemcitabine chemotherapy before and after fluorouracil-based chemoradiation following resection of pancreatic adenocarcinoma: a randomized controlled trial.* **Regine WF, Winter KA, Abrams RA, et al.** 2008, *JAMA*, Vol. 299, p. 1019-1026.
18. *Chemoradiotherapy in the Management of Locally Advanced Pancreatic Carcinoma: A Qualitative Systematic Review.* **Huguet F, Girard N, Séblain-El Guerche C, et al.** 2009, *J Clin Oncol*, Vol. 27, p. 2269-2277.
19. *Chemotherapy in pancreatic cancer: results of a controlled, prospective, randomised, multicentre trial.* **Mallinson CN, Rake MO, Cocking JB, et al.** 1980, *Br Med J*, Vol. 281, p. 1589-91.
20. *Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial.* **Burriss HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, et al.** 1997, *J Clin Oncol*, Vol. 15, p. 2403-2413.
21. *Randomized phase II comparison of dose-intense gemcitabine: thirty-minute infusion and fixed dose rate infusion in patients with pancreatic adenocarcinoma.* **Tempero M, Plunkett W, Ruiz Van Haperen V, et al.** 2003, *J Clin Oncol*, Vol. 21, p. 3402-3408.
22. *Phase III, randomized study of gemcitabine and oxaliplatin versus gemcitabine (fixed-dose rate infusion) compared with gemcitabine (30-minute infusion) in patients with pancreatic carcinoma E6201: a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group.* **Poplin E, Feng Y, Berlin J, et al.** 2009, *J Clin Oncol*, Vol. 27, p. 3778-3785.
23. *Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial.* **Louvet C, Labianca R, Hammel P, et al.** 2005, *J Clin Oncol*, Vol. 23, p. 3509-3516.

24. *Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer.* **Heinemann V, Quietzsch D, Gieseler F, et al.** 2006, *J Clin Oncol*, Vol. 24, p. 3946-3952.
25. *Gemcitabine alone or with cisplatin for the treatment of patients with locally advanced and/or metastatic pancreatic carcinoma: A prospective, randomized phase III study of the Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale.* **Colucci G, Giuliani F, Gebbia V, et al.** 2002, *Cancer*, Vol. 94, p. 902-910.
26. *Gemcitabine in combination with cisplatin (GP) versus gemcitabine (G) alone in the treatment of locally advanced or metastatic pancreatic cancer: Final results of a multicenter randomized phase II study.* **Viret F, Ychou M, Lepille D, et al.** 2004, *J Clin Oncol*, Vol. 22 (14S), p. abstract 4118.
27. *Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with single-agent gemcitabine as first-line treatment of patients with advanced pancreatic cancer: the GIP-I study.* **Colucci G, Labianca R, Di Costanzo F, et al.** 2010, *J Clin Oncol*, Vol. 28, p. 1645-1651.
28. *A phase III study of gemcitabine in combination with fluorouracil versus gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic carcinoma: Eastern Cooperative Oncology Group trial E2297.* **Berlin J, Catalano P, Thomas J, et al.** 2002, *J Clin Oncol*, Vol. 20, p. 3270-3275.
29. *Gemcitabine with or without continuous infusion 5-FU in advanced pancreatic cancer: a randomised phase II trial of the Italian oncology group for clinical research (GOIRC).* **Di Costanzo F, Carlini P, Doni L, et al.** 2005, *Br J Cancer*, Vol. 93, p. 185-189.
30. *Biweekly high-dose gemcitabine alone or in combination with capecitabine in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma: a randomized phase II trial.* **Scheithauer W, Schull B, Ulrich-Pur H, et al.** 2003, *Ann Oncol*, Vol. 14, p. 97-104.
31. *Gemcitabine plus capecitabine compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer: a randomized, multicenter, phase III trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research and the Central European Cooperative Oncology Group.* **Herrmann R, Bodoky G, Ruhstaller T, et al.** 2007, *J Clin Oncol*, Vol. 25, p. 2212-2217.
32. *Meta-analysis of randomized trials: evaluation of benefit from gemcitabine-based combination chemotherapy applied in advanced pancreatic cancer.* **Heinemann V, Boeck S, Hinke A, et al.** 2008, *BMC Cancer*, Vol. 8, p. 82.
33. *Erlotinib Plus Gemcitabine Compared With Gemcitabine Alone in Patients With Advanced Pancreatic Cancer: A Phase III Trial of the National Cancer Institute of Canada*

Clinical Trials Group. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, et al. 2007, *J Clin Oncol*, Vol. 25, p. 1960-1966.

34. *A double-blind placebo-controlled, randomised study comparing gemcitabine and marimastat with gemcitabine and placebo as first line therapy in patients with advanced pancreatic cancer. Bramhall SR, Schulz J, Nemunaitis J, et al.* 2002, *Br J Cancer*, Vol. 87, p. 161-167.

35. *Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer. Van Cutsem E, van de Velde H, Karasek P, et al.* 2004, *J Clin Oncol*, Vol. 22, p. 1430-1438.

36. *Phase III study comparing gemcitabine plus cetuximab versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: Southwest Oncology Group-directed intergroup trial S0205. Philip PA, Benedetti J, Corless CL, et al.* 2010, *J Clin Oncol*, Vol. 28, p. 3605-3610.

37. *Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). Kindler HL, Niedzwiecki D, Hollis D, et al.* 2010, *J Clin Oncol*, Vol. 28, p. 3617-3622.

38. *Gemcitabine versus cisplatin, epirubicin, fluorouracil, and gemcitabine in advanced pancreatic cancer: a randomised controlled multicentre phase III trial. Reni M, Cordio S, Milandri C, et al.* 2005, *Lancet Oncol*, Vol. 6, p. 369–376.

39. *FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, et al.* 2011, *N Engl J Med*, Vol. 364, p. 1817-1825.

40. *The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. Scaltriti M, Baselga J.* 2006, *Clin Cancer Res*, Vol. 12, p. 5268-5272.

41. *An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, et al.* 2003, *Mol Cell*, Vol. 12, p. 541-552.

42. *Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. Herbst RS, Shin DM.* 2002, *Cancer*, Vol. 94, p. 1593-1611.

43. *Epidermal growth factor receptor expression in pancreatic carcinoma using tissue microarray technique. Bloomston M, Bhardwaj A, Ellison EC, Frankel WL.* 2006, *Dig Surg*, Vol. 23, p. 74-79.

44. *Mutational profiling of kinases in human tumours of pancreatic origin identifies candidate cancer genes in ductal and ampulla of Vater carcinomas. Corbo V, Ritelli R, Barbi S, et al.* 2010, *Plos One*, Vol. 5, p. e12653.

45. *KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas.* **Smit VT, Boot AJ, Smits AM, et al.** 1988, *Nucleic Acids Res*, Vol. 16, p. 7773-7782.
46. *Impact of KRAS Mutations on Clinical Outcomes in Pancreatic Cancer Patients Treated with First-line Gemcitabine-Based Chemotherapy.* **Kim ST, Lim do H, Jang KT, et al.** 2011, *Mol Cancer Ther*, Vol. 10, p. 1993-1999.
47. *Impact of epidermal growth factor receptor (EGFR) kinase mutations, EGFR gene amplifications, and KRAS mutations on survival of pancreatic adenocarcinoma.* **Lee J, Jang KT, Ki CS, et al.** 2007, *Cancer*, Vol. 109, p. 1561-1569.
48. *Meta-analysis of immunohistochemical prognostic markers in resected pancreatic cancer.* **Smith RA, Tang J, Tudur-Smith C, et al.** 2011, *Br J Cancer*, Vol. 104, p. 1440-1451.
49. *Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review.* **Garcea G, Neal CP, Pattenden CJ, et al.** 2005, *Eur J Cancer*, Vol. 41, p. 2213-2236.
50. *EGF-receptor targeting with monoclonal antibodies in colorectal carcinomas: rationale for a pharmacogenomic approach.* **Loupakis F, Vasile E, Santini D, et al.** 2008, *Pharmacogenomics*, Vol. 9, p. 55-69.
51. *Biomarkers of clinical benefit for anti-epidermal growth factor receptor agents in patients with non-small-cell lung cancer.* **Pallis AG, Fennell DA, Szutowicz E, et al.** 2011, *Br J Cancer*, Vol. 105, p. 1-8.
52. *Molecular predictors of outcome in a phase 3 study of gemcitabine and erlotinib therapy in patients with advanced pancreatic cancer: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study PA.3.* **da Cunha Santos G, Dhani N, Tu D, et al.** 2010, *Cancer*, Vol. 116, p. 5599-5607.
53. *Advances in Pharmacogenetics and Pharmacogenomics.* **E., Vessel.** 2000, *J Clin Pharmacol*, Vol. 40, p. 930-938.
54. *Farmacie e genoma.* **R., Barale.** 2001, *Società Italiana di Genetica Umana*, Vol. 2, p. 15-16.
55. *Genotype or phenotype: the definition of a pharmacogenetic.* **UA., Meyer.** 1991, *Pharmacogenetics*, Vol. 1, p. 66-67.
56. *Single nucleotide polymorphisms of the DNA repair gene XPD/ERCC2 alter mRNA expression.* **Wolfe KJ, Wickliffe JK, Hill CE, et al.** 2007, *Pharmacogenet Genomics.*, Vol. 17, p. 897-905.
57. *Alterations in expression and structure of the DNA repair gene XRCC1.* **Yoo H, Li L, Sacks PG, et al.** 1992, *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 92, p. 900-910.

58. *DNA repair gene polymorphisms and risk of pancreatic cancer.* **Li D, Suzuki H, Liu B, Morris J, et al.** 2009, Clin Cancer Res, Vol. 15, p. 790-796.
59. *DNA mismatch repair gene polymorphisms affect survival in pancreatic cancer.* **Dong X, Li Y, Hess KR, Abbruzzese JL, Li D.** 2011, Oncologist, Vol. 16, p. 61-70.
60. *Significant effect of homologous recombination DNA repair gene polymorphisms on pancreatic cancer survival.* **Li D, Liu H, Jiao L, Chang DZ, et al.** 2006, Cancer Res, Vol. 66, p. 3323-3330.
61. *Single-nucleotide polymorphisms of DNA damage response genes are associated with overall survival in patients with pancreatic cancer.* **Okazaki T, Jiao L, Chang P, et al.** 2008, Clin Cancer Res, Vol. 14, p. 2032-2038.
62. *Differential expression of ERCC1 in pancreas adenocarcinoma: high tumor expression is associated with earlier recurrence and shortened survival after resection.* **Maithel SK, Coban I, Kneuert PJ, et al.** 2011, Ann Surg Oncol, Vol. 18, p. 2699-7205.
63. *ERCC1 codon 118 polymorphism is a useful prognostic marker in patients with pancreatic cancer treated with platinum-based chemotherapy.* **Kamikozuru H, Kuramochi H, Hayashi K, et al.** 2008, Int J Oncol, Vol. 32, p. 1091-1096.
64. *XPD and XRCC1 genetic polymorphisms are prognostic factors in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with platinum chemotherapy.* **Gurubhagavatula S, Liu G, Park S, et al.** 2004, J Clin Oncol, Vol. 22, p. 2594-2601.
65. *Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients.* **Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E, et al.** 2008, Clin Cancer Res, Vol. 14, p. 1797-1803.
66. *Transcription analysis of human equilibrative nucleoside transporter-1 predicts survival in pancreas cancer patients treated with gemcitabine.* **Giovannetti E, Del Tacca M, Mey V, et al.** 2006, Cancer Res, Vol. 66, p. 3928-3935.
67. *Identification and analysis of single-nucleotide polymorphisms in the gemcitabine pharmacologic pathway.* **Fukunaga AK, Marsh S, Murry DJ, et al.** 2004, Pharmacogenomics J, Vol. 4, p. 307-314.
68. *New targets for pyrimidine antimetabolites for the treatment of solid tumors: Deoxycytidine kinase.* **Ruiz van Haperen VW, Peters EGJ.** 1994, Pharm World SCI, Vol. 16, p. 104-112.
69. *Role of deoxycytidine kinase (dCK), thymidine kinase 2 (TK2), and deoxycytidine deaminase (dCDA) in the antitumor activity of gemcitabine (dFdC).* **Kroep JR, van Moorsel CJ, Veerman G, et al.** 1998, Adv Exp Med Biol, Vol. 431, p. 657-660.

70. *Retroviral transfer of deoxycytidine kinase into tumor cell lines enhances nucleoside toxicity.* **Hapke DM, Stegmann AP, Mitchell BS.** 1996, *Cancer Res*, Vol. 53, p. 2343-2347.
71. *Decreased resistance to gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine) of cytosine arabinoside-resistant myeloblastic murine and rat leukemia cell lines: role of altered activity and substrate specificity of deoxycytidine kinase.* **Bergman AM, Pinedo HM, Jongsma AP, et al.** 1999, *Biochem Pharmacol*, Vol. 57, p. 397-406.
72. *Collateral sensitivity to gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine) and cytosine arabinoside of daunorubicin- and VM-26-resistant variants of human small cell lung cancer cell lines.* **Bergman AM, Munch-Petersen B, Jensen PB, et al.** 2001, *Biochem Pharmacol*, Vol. 61, p. 1401-1408.
73. *A functional single-nucleotide polymorphism in the human cytidine deaminase gene contributing to ara-C sensitivity.* **Yue L, Saikawa Y, Ota K, et al.** 2003, *Pharmacogenetics*, Vol. 13, p. 29-38.
74. *Cytidine deaminase. The 2.3 Å crystal structure of an enzyme: transition-state analog complex.* **Betts L, Xiang S, Short SA, et al.** 1994, *J Mol Biol*, Vol. 235, p. 635-656.
75. *Recombinant gene products of two natural variants of the human cytidine deaminase gene confer different deamination rates of cytarabine in vitro.* **Kirch HC, Schröder J, Hoppe H, et al.** 1998, *Exp Hematol*, Vol. 26, p. 421-425.
76. *Gemcitabine pharmacogenomics: cytidine deaminase and deoxycytidylate deaminase gene resequencing and functional genomics.* **Gilbert JA, Salavaggione OE, Ji Y, et al.** 2006, *Clin Cancer Res*, Vol. 15, p. 1794-1803.
77. *Pharmacokinetics of gemcitabine in Japanese cancer patients: the impact of a cytidine deaminase polymorphism.* **Sugiyama E, Kaniwa N, Kim SR, et al.** 2007, *J Clin Oncol*, Vol. 25, p. 32-43.
78. *RRM1 single nucleotide polymorphism -37C-->A correlates with progression-free survival in NSCLC patients after gemcitabine-based chemotherapy.* **Dong S, Guo AL, Chen ZH, et al.** 2010, *J Hemat Oncol*, Vol. 13, p. 3-10.
79. *Randomized phase III trial of gemcitabine-based chemotherapy with in situ RRM1 and ERCC1 protein levels for response prediction in non-small-cell lung cancer.* **Reynolds C, Obasaju C, Schell MJ, et al.** 2009, *J Clin Oncol*, Vol. 27, p. 5808-5815.
80. *Single nucleotide polymorphisms of gemcitabine metabolic genes and pancreatic cancer survival and drug toxicity.* **Okazaki T, Javle M, Tanaka M, et al.** 2010, *Clin Cancer Res*, Vol. 16, p. 320-329.

81. *Gemcitabine metabolic and transporter gene polymorphisms are associated with drug toxicity and efficacy in patients with locally advanced pancreatic cancer.* **Tanaka M, Javle M, Dong X, et al.** 2010, *Cancer*, Vol. 116, p. 5325-5335.
82. *MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism and Function.* **DP., Bartel.** 2004, *Cell*, Vol. 116, p. 281-297 .
83. *Oncomirs: microRNAs with a role in cancer.* **Esquela-Kerscher A, Slack FJ.** 2006, *Nat Rev Cancer*, Vol. 6, p. 259-269.
84. *Reduced Accumulation of Specific MicroRNAs in Colorectal Neoplasia.* **Michael MZ, O'Connor SM, van Holst Pellekaan NG, et al.** 2003, *Molecular Cancer Research*, Vol. 1, p. 882-891.
85. *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets.* **Volinia S, Calin GA, Liu C, et al.** 2006, *PNAS*, Vol. 103, p. 2257-2261.
86. *Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia.* **Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al.** 2002, *PNAS*, Vol. 99, p. 15524-15529.
87. *Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis.* **Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP.** 2005, *Nucleic Acids Research*, Vol. 33, p. 1290-1297.
88. *A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes.* **Kent OA, Mendell JT.** 2006, *Oncogene*, Vol. 25, p. 6188-6196.
89. *microRNA expression profiles classify human cancers.* **Lu J, Getz G, Miska EA, et al.** 2005, *Nature*, Vol. 435, p. 834-838.
90. *miRNA profiling for diagnosis and prognosis of human cancer.* **Jay C, Nemunaitis J, Chen P, et al.** 2007, *DNA Cell Biol*, Vol. 26, p. 293-300.
91. *Association of a microRNA/TP53 feedback circuitry with pathogenesis and outcome of B-cell chronic lymphocytic leukemia.* **Fabbri M, Bottoni A, Shimizu M, et al.** 2011, *JAMA*, Vol. 30, p. 59-67.
92. *MicroRNAs modulate the chemosensitivity of tumor cells.* **Blower PE, Chung J, Verducci JS, et al.** 2007, *Mol Cancer Ther*, Vol. 7, p. 1-9.
93. *The impact of microRNAs and alternative splicing in pharmacogenomics.* **Passetti F, Ferreira CG, Costa FF.** 2009, *Pharmacogenomics J*, Vol. 9, p. 1-13.
94. *MicroRNAs in ovarian cancer biology and therapy resistance.* **van Jaarsveld MT, Helleman J, Berns EM, Wiemer EA.** 2010, *Int J Biochem Cell Biol*, Vol. 42, p. 1282-1290.

95. *Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells.* **Jin L, Hope KJ, Zhai Q, et al.** 2006, *Nat Med*, Vol. 12, p. 1167-1174.
96. *Gemcitabine sensitivity can be induced in pancreatic cancer cells through modulation of miR-200 and miR-21 expression by curcumin or its analogue CDF.* **Ali S, Ahmad A, Banerjee S, et al.** 2010, *Cancer Res*, Vol. 70, p. 3606-3617.
97. *MicroRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma: new diagnostic and therapeutic clues.* **Seux M, Iovanna J, Dagorn JC, Dusetti NJ.** 2009, *Pancreatology*, Vol. 9, p. 66-72.
98. *MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis.* **Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, et al.** 2007, *JAMA*, Vol. 297, p. 1901-1908.
99. *Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer.* **Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, et al.** 2007, *Int J Cancer*, Vol. 120, p. 1046-1054.
100. *MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma.* **Szafranska AE, Davison TS, John J, et al.** 2007, *Oncogene*, Vol. 26, p. 4442-4452.
101. *Profiling of 95 microRNAs in pancreatic cancer cell lines and surgical specimens by real-time PCR analysis.* **Zhang Y, Li M, Wang H, et al.** 2009, *World J Surg*, Vol. 33, p. 698-709.
102. *MicroRNAs: novel diagnostic and therapeutic tools for pancreatic ductal adenocarcinoma?* **Mardin WA, Mees ST.** 2009, *Ann Surg Oncol*, Vol. 16, p. 3183-3189.
103. *MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior.* **Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, et al.** 2006, *J Clin Oncol*, Vol. 24, p. 4677-4684.
104. *MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival.* **Dillhoff M, Liu J, Frankel W, Croce C, Bloomston M.** 2008, *J Gastrointest Surg*, Vol. 12, p. 2171-2176.
105. *Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival.* **Greither T, Grochola LF, Udelnow A, et al.** 2010, *Int J Cancer*, Vol. 126, p. 73-80.
106. *MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease.* **Wang J, Chen J, Chang P, et al.** 2009, *Cancer Prev Res (Phila)*, Vol. 2, p. 807-813.

107. *Association of polymorphisms in AKT1 and EGFR with clinical outcome and toxicity in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib.* **Giovannetti E, Zucali PA, Peters GJ et al.** 2010, *Mol Cancer Ther*, Vol. 9, p. 581-593.
108. *Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients.* **Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E, et al.** 2008, *Clin Cancer Res*, Vol. 14, p. 1797-1803.
109. *Laser microdissection and primary cell cultures improve pharmacogenetic analysis in pancreatic adenocarcinoma.* **Funel N, Giovannetti E, Del Chiaro M, et al.** 2008, *Lab Invest*, Vol. 88, p. 773-784.
110. *The correlation between cytoplasmic overexpression of epidermal growth factor receptor and tumor aggressiveness: poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma.* **Ueda S, Ogata S, Tsuda H et al.** 2004, *Pancreas*, Vol. 29, p. 1-8.
111. *Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system.* **Goldstein NS, Armin M.** 2001, *Cancer*, Vol. 92, p. 1331–1346.
112. *Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer.* **Cunningham D, Chau I, Stocken DD, et al.** 2009, *J Clin Oncol*, Vol. 27, p. 5513-5518.
113. *A phase III trial of pemetrexed plus gemcitabine versus gemcitabine in patients with unresectable or metastatic pancreatic cancer.* **Oettle H, Richards D, Ramanathan RK, et al.** 2005, *Ann Oncol*, Vol. 13, p. 1639-1645.
114. *Irinotecan plus gemcitabine results in no survival advantage compared with gemcitabine monotherapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer despite increased tumor response rate.* **Rocha Lima CM, Green MR, Rotche R, et al.** 2004, *J Clin Oncol*, Vol. 22, p. 3776-3883.

7. Articoli pubblicati con i risultati delle ricerche e allegati

I risultati delle ricerche eseguiti in questo progetto hanno portato alle seguenti pubblicazioni (allegate in appendice in fondo alla tesi):

- 1) MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity. Giovannetti E, Funel N, Peters GJ, Del Chiaro M, Erozenski LA, Vasile E, Leon LG, Pollina LE, Groen A, Falcone A, Danesi R, Campani D, Verheul HM, Boggi U. *Cancer Res.* 70(11): 4528-4538, 2010 (impact factor 2010 = 8.234)
- 2) Correlation of basal EGFR expression with pancreatic cancer grading but not with clinical outcome after gemcitabine-based treatment. N. Funel, E. Vasile, M. Del Chiaro, U. Boggi, A. Falcone, D. Campani, A. Scarpa, E. Giovannetti. *Ann Oncol* 22(2): 482-484, 2011 (impact factor 2010 = 6.452)
- 3) Association between DNA-repair polymorphisms and survival in pancreatic cancer patients treated with combination chemotherapy. E. Giovannetti, P. Pacetti, M. Reni, L. G. Leon, A. Mambrini, E. Vasile, M. Ghidini, N. Funel, M. Lucchesi, S. Cereda, G. J. Peters, M. Cantore. *Pharmacogenomics* 2011 (Epub ahead of print) (impact factor 2010 = 3.876)

Inoltre i risultati sono stati oggetto di numerose presentazioni orali a congressi internazionali negli ultimi anni.

I dati di espressione di microRNA mediante tecnica di microarray sono stati sottomessi al prossimo congresso dell'American Association for Cancer Research (AACR) e saranno oggetto a breve di una successiva pubblicazione.

Correlation of basal EGFR expression with pancreatic cancer grading but not with clinical outcome after gemcitabine-based treatment

Philip et al. [1] recently published the results of a phase III study in 745 patients with locally advanced/metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) treated either with gemcitabine and the anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) cetuximab or with gemcitabine alone. This trial was based on evidence from earlier studies that suggested the combination had sufficient activity to warrant further testing but failed to meet its primary end point of improving overall survival (OS). However, the combination of gemcitabine with the epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) erlotinib translated into a significant improvement of OS [2]. Although increase in tumor control rates and association between rash and outcome seen in the gemcitabine + erlotinib study suggested that therapeutic benefit is confined to a subset of patients, in both trials analysis of EGFR expression failed to reveal a correlation with outcome. No correlation with OS was also observed in patients treated with single-agent gemcitabine [1].

However, previous studies showed a correlation of EGFR expression with grading and prognosis in PDAC patients who underwent only surgical treatment [3]. Therefore, we carried out an immunohistochemical analysis of EGFR in 100 Caucasian patients who underwent PDAC resection and were treated with gemcitabine in order to evaluate the correlation with (i) histological grading and (ii) outcome. Furthermore, we evaluated by uni-/multivariate analysis the role of stage (I–II/III–IV), lymph node/neural infiltration (yes/no) and resection margin (R0/R1).

EGFR staining was detectable at membrane and cytoplasmic level (Figure 1A) in 84% and 82% of the patients, respectively. The values of EGFR expression, as evaluated by a total score from the analysis of both the number of positive cells and the staining intensity [4], ranged

between 0 and 10 (median = 7) (Figure 1B and C). EGFR expression was significantly higher in grade 3 PDAC ($P = 0.036$, 'Mann–Whitney test'). The histological differentiation resulted as a prognostic factor, with median OS of 24.8 [95% confidence interval (CI) 15.8–33.7] versus 11.1 months (95% CI 0.2–22.1) in patients with grade 1/2 and grade 3 tumors, respectively ($P = 0.018$, 'log-rank test') (Figure 1D). Similarly, patients with grade 1/2 and grade 3 PDAC had median Progression Free Survival (PFS) of 16.6 (95% CI 11.4–21.8) and 7.3 (95% CI 5.5–9.2) months, respectively ($P = 0.007$). Among other possible prognostic factors, only lymph node-positive status was correlated with significantly shorter OS and PFS ($P = 0.016$ and 0.006 , respectively). In the Cox proportional hazards model, both grade 3 and lymph node-positive status resulted independent predictive parameters of death (Hazard Ratio (HR) = 2.0, 95% CI 1.1–3.8, $P = 0.036$ and HR = 3.1, 95% CI 1.1–8.6, $P = 0.033$, respectively) and progression risk (HR = 2.2, 95% CI 1.2–4.0, $P = 0.012$ and HR = 3.3, 95% CI 1.3–8.3, $P = 0.012$, respectively).

In contrast, no correlation was observed between EGFR expression and both PFS and OS (Figure 1E), as well as with stage, lymph node/neural infiltration and resection margin. The lack of correlation between EGFR expression and outcome in these patients might be caused by several factors, including modulation of EGFR expression/phosphorylation or related pathways in the relapse/metastatic tumors, which might then differ from resected specimens. Previous studies showed that resistance to cetuximab–gemcitabine in PDAC xenografts was caused by persistent mitogen-activated protein kinase activation and impaired EGFR internalization, associated with constitutive ErBb3 signaling [5].

In conclusion, EGFR expression is correlated with PDAC grading, but it lacks predictive value with respect to outcome in gemcitabine-treated patients both in the palliative and in the adjuvant setting ([1], present study). Future trials should provide the platforms for additional necessary translational research to identify other biomarkers/targets that can improve gemcitabine activity in PDAC.

N. Funel¹†, E. Vasile²†, M. Del Chiaro¹, U. Boggi¹, A. Falcone^{2,3}, D. Campani⁴, A. Scarpa⁵ & E. Giovannetti^{3,6*}

¹Division of General Surgery and Transplants, Pisa Hospital, Pisa, ²Unit Medical Oncology-2, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, ³University of Pisa, Pisa, ⁴Department of Surgery, University of Pisa, Pisa, ⁵Department of Pathology, University of Verona, Verona, Italy, ⁶Department of Medical Oncology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands (*E-mail: elisa.giovannetti@gmail.com)

† These authors equally contributed to the study.

acknowledgements

EG would like to thank The Netherlands Organisation for Scientific Research Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek for the VENI grant.

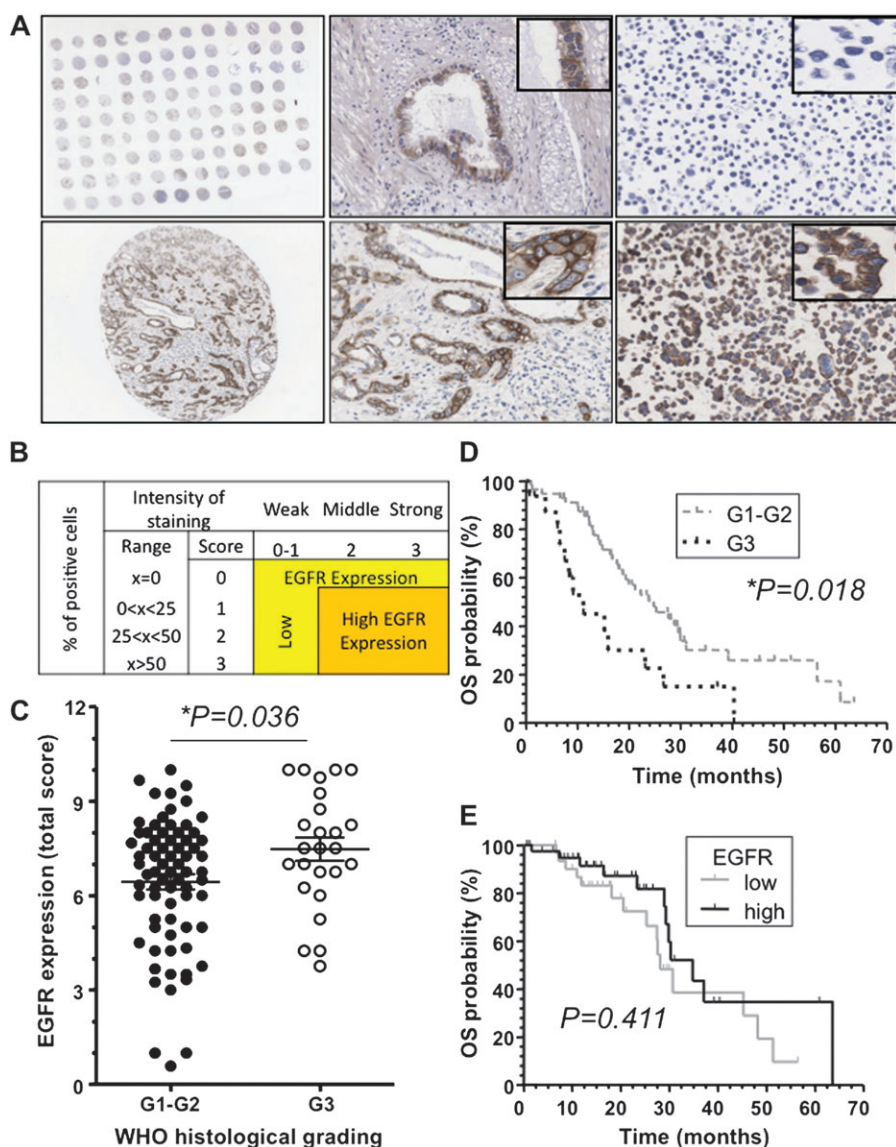


Figure 1. (A) Examples of EGFR staining from TMA sections obtained from paraffin-embedded tumor material (from four different tumor areas for each patient), incubated with the mAb from the EGFR pharmDx™ Kit, according to manufacturer's instruction; left panels: TMA slide ($\times 1$ magnification) and a single spot of PDAC sample ($\times 4$); center panels: complete EGFR staining of cytoplasm and membrane ($\times 20$); right panels: negative and positive control of EGFR staining ($\times 20$). (B) EGFR staining results were evaluated using a four-tier system including the analysis of both the number of positive cells and the staining intensity. All slides were reviewed by three pathologists who also evaluated the amount of tissue loss, background staining and overall interpretability before the formal EGFR reactivity evaluation. (C) World Health Organization histological grading and EGFR expression levels (evaluated as described previously [3]) in 100 radically resected PDAC patients, enrolled from 2004 to 2008, at one center, Pisa University Hospital, to guarantee reliability of sampling, histological grading and immunohistochemistry analysis, as well as evaluation of clinical outcome. (D) Kaplan–Meier curves in gemcitabine-treated patients with grade 1/2 and grade 3 tumors and (E) curves in gemcitabine-treated patients with EGFR expression above ('high', OS = 22.2, 95% CI 13.1–31.4) and below ('low', OS = 28.8, 95% CI 13.7–43.9) the median total score. Clinical data were available for 78 patients, with median OS of 22.3 months (95% CI 16.0–28.5), event rate of 73% and median follow-up of surviving patients of 27.4 months (range 1.6–63.6). EGFR, epidermal growth factor receptor; TMA, tissue microarray; PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; CI, confidence interval; OS, overall survival.

funding

Netherlands Organisation for Scientific Research (NWO) to E.G.

disclosure

The authors declare no conflict of interest.

references

- Philip PA, Benedetti J, Corless CL et al. Phase III study comparing gemcitabine plus cetuximab versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: Southwest Oncology Group-directed intergroup trial S0205. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3605–3610.
- Moore MJ, Goldstein D, Hamm J et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of

- the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1960–1966.
3. Ueda S, Ogata S, Tsuda H et al. The correlation between cytoplasmic overexpression of epidermal growth factor receptor and tumor aggressiveness: poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 2004; 29: e1–e8.
 4. Goldstein NS, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* 2001; 92: 1331–1346.
 5. Arnoletti JP, Buchsbaum DJ, Huang ZQ et al. Mechanisms of resistance to Erbitux (anti-epidermal growth factor receptor) combination therapy in pancreatic adenocarcinoma cells. *J Gastrointest Surg* 2004; 8: 960–969.

doi:10.1093/annonc/mdq686

Published online 31 December 2010



Cancer Research

MicroRNA-21 in Pancreatic Cancer: Correlation with Clinical Outcome and Pharmacologic Aspects Underlying Its Role in the Modulation of Gemcitabine Activity

Elisa Giovannetti, Niccola Funel, Godefridus J. Peters, et al.

Cancer Res 2010;70:4528-4538. Published OnlineFirst May 11, 2010.

Updated Version	Access the most recent version of this article at: doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4467
Supplementary Material	Access the most recent supplemental material at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2010/05/10/0008-5472.CAN-09-4467.DC1.html
Correction	A correction to this article has been published. It is appended to this PDF and can also be accessed at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/11/4785.full.pdf

Cited Articles	This article cites 50 articles, 22 of which you can access for free at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/11/4528.full.html#ref-list-1
Citing Articles	This article has been cited by 3 HighWire-hosted articles. Access the articles at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/11/4528.full.html#related-urls

E-mail alerts	Sign up to receive free email-alerts related to this article or journal.
Reprints and Subscriptions	To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at pubs@aacr.org .
Permissions	To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at permissions@aacr.org .

MicroRNA-21 in Pancreatic Cancer: Correlation with Clinical Outcome and Pharmacologic Aspects Underlying Its Role in the Modulation of Gemcitabine Activity

Elisa Giovannetti^{1,2}, Niccola Funel³, Godefridus J. Peters¹, Marco Del Chiaro³, Leyla A. Erozenci¹, Enrico Vasile⁴, Leticia G. Leon¹, Luca E. Pollina³, Annemieke Groen¹, Alfredo Falcone⁴, Romano Danesi², Daniela Campani³, Henk M. Verheul¹, and Ugo Boggi³

Abstract

MicroRNA-21 (miR-21) was reported to be overexpressed and contributes to invasion and gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). The aim of this study was to evaluate whether miR-21 expression was associated with the overall survival (OS) of PDAC patients treated with gemcitabine and to provide mechanistic insights for new therapeutic targets. miR-21 expression was evaluated in cells (including 7 PDAC cell lines, 7 primary cultures, fibroblasts, and a normal pancreatic ductal cell line) and tissues (neoplastic specimens from 81 PDAC patients and normal ductal samples) isolated by laser microdissection. The role of miR-21 on the pharmacologic effects of gemcitabine was studied with a specific miR-21 precursor (pre-miR-21). Patients with high miR-21 expression had a significantly shorter OS both in the metastatic and in the adjuvant setting. Multivariate analysis confirmed the prognostic significance of miR-21. miR-21 expression in primary cultures correlated with expression in their respective tissues and with gemcitabine resistance. Pre-miR-21 transfection significantly decreased antiproliferative effects and apoptosis induction by gemcitabine, whereas matrix metalloproteinase (MMP)-2/MMP-9 and vascular endothelial growth factor expression were upregulated. Addition of inhibitors of phosphoinositide 3-kinase and mammalian target of rapamycin resulted in decrease of phospho-Akt and prevented pre-miR-21-induced resistance to the proapoptotic effects of gemcitabine. miR-21 expression correlated with outcome in PDAC patients treated with gemcitabine. Modulation of apoptosis, Akt phosphorylation, and expression of genes involved in invasive behavior may contribute to the role of miR-21 in gemcitabine chemoresistance and to the rational development of new targeted combinations. *Cancer Res*; 70(11); 4528–38. ©2010 AACR.

Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the fourth leading cause of cancer-related death, with only 3% of patients alive 5 years after diagnosis (1). The main reasons for this grim prognosis include early metastatic spread, high local recurrence rate, and multifactorial resistance to treatments (2).

In 85% of patients, PDAC is detected at advanced stages, characterized by infiltration of proximal lymph nodes and

vascular structures, as well as metastasis to liver/peritoneum. The first-line agent gemcitabine produced some clinical benefit in the advanced setting but yields a limited disease control, with <15% of patients progression-free at 6 months from diagnosis (2, 3). Although several attempts have been made to increase the survival using combinations of chemotherapy and targeted therapy, only a marginal success was achieved with gemcitabine combined with capecitabine or erlotinib, and with a four-drug regimen (4–6). According to the results of CONKO-001 and ESPAC-3 trials (7, 8), gemcitabine also increased the disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) in the adjuvant setting. However, the most effective adjuvant chemotherapy remains unclear, and the 5-year survival in patients undergoing resection still hovers between 10% and 20% (1).

Therefore, the identification of predictive factors for gemcitabine activity seems to be critical for maximizing therapeutic efficacy and minimizing useless treatment in PDAC. Pharmacogenetic studies showed correlations of polymorphisms or expression of DNA repair enzymes and nucleoside transporters with outcome in gemcitabine-treated patients (9, 10). However, prognosis of patients harboring favorable genotypes or expression levels for these candidate biomarkers

Authors' Affiliations: ¹VU University Medical Center, Amsterdam, the Netherlands and ²Department of Internal Medicine, Pisa University; ³Division of General Surgery and Transplants, Pisa Hospital; and ⁴Unit Medical Oncology-2, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa, Italy

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

E. Giovannetti and N. Funel contributed equally to this work.

Corresponding Author: Godefridus J. Peters, Department of Medical Oncology, VU University Medical Center, De Boelelaan 1117, 1081HV Amsterdam, the Netherlands. Phone: 31-20-4442633; Fax: 31-20-4443844; E-mail: gj.peters@vumc.nl.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4467

©2010 American Association for Cancer Research.

is still poor and novel prognostic and therapeutic approaches are warranted.

Global genomic analysis showed that PDAC resulted from aberrations of genes that function through a relatively small number of core signaling pathways (11). In addition to yielding insights into pathogenesis, such studies suggest that the best hope for the development of agents targeting nodal points in the altered pathways lies in the study of mechanisms involved in gene expression regulation.

Recently, microRNAs (miRNA) have emerged as a critical class of negative regulators of gene expression through modulation of posttranscriptional activity of multiple target mRNAs by repression of translation or direct cleavage (12). The role of miRNAs in control of proliferation, differentiation, and apoptosis; the location of several miRNA genes at sites of translocation breakpoints or deletions; and their aberrant expression in many tumors indicated that they can function as tumor suppressors and oncogenes (13). Furthermore, selected miRNAs may influence response to chemotherapy (14–16).

Expression profiling identified several miRNAs aberrantly expressed in PDAC, including four miRNAs differentially expressed in other tumors: miR-155, miR-21, miR-221 and miR-222 (17). These results were corroborated by other studies, showing that miR-21 was among the top miRNAs with increased expression in PDAC (18–20).

miR-21 has been associated with ovarian cancer carcinogenesis (21), and a pivotal role in cancer is suggested by its widespread deregulation in various solid tumors, such as glioblastoma, cholangiocarcinoma, papillary thyroid, breast, esophageal, gastric, hepatocellular, colon, prostate, lung, head and neck, and cervical cancer, as well as in hematologic malignancies (22). The oncogenic properties of miR-21 are further supported by functional studies showing that inhibition of miR-21 expression reduced proliferation of several cancer cells, including breast, hepatocellular, and PDAC cells (23–25), and generated a proapoptotic response in different cell lines, including glioblastoma, cholangiocarcinoma, and PDAC cells (22, 26, 27). In contrast, transfection with miR-21 precursors stimulated invasion, extravasation, and metastasis in *in vivo* models of glioma, colorectal, and breast cancer (28–30), as well as in cellular models of PDAC (25).

These data suggested that elevated levels of miR-21 might be associated with tumor progression, and because miR-21 is one of the most abundant and easily detectable miRNAs (31), several studies evaluated its role as a prognostic biomarker. The expression of miR-21 has been correlated with clinical stage, lymph node, and distant metastasis as well as with poor prognosis in glioma, colon, breast, and tongue squamous cell cancers (24, 28, 32–34). High miR-21 expression was associated with more aggressive pancreatic endocrine tumors, characterized by increased Ki67 proliferation index and liver metastasis (35). Furthermore, miR-21 expression was significantly lower in the eight PDAC that clustered with the benign pancreas specimens in the study performed by Bloomston and colleagues (18). *In situ* hybridization showed that miR-21 overexpression was strictly localized to PDAC cells and predictive of shorter survival in node-negative patients, but this subset of patients was small and no data

were available on treatment (36). In contrast, no correlation between miR-21 and clinicopathologic findings was observed using PCR on bulk tissues from 25 PDAC patients, without information on chemotherapy (25). Therefore, further studies on a larger number of better-characterized PDAC patients, using techniques to minimize contamination by surrounding stroma, such as laser microdissection (LMD), are warranted.

Recent studies also reported significant correlations between miR-21 expression and resistance to anticancer agents (15, 23, 37). In particular, inhibition of miR-21 increased sensitivity to gemcitabine in cholangiocarcinoma and PDAC cells (25–27). However, miR-21 did not affect gemcitabine-induced apoptosis in colon cancer cells (38), whereas other miRNAs, such as miR-200 and let-7, were involved in the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant PDAC cells (39).

The aim of the present study was to characterize miR-21 expression in a wide repository of PDAC tissues and cells, associated with clinical outcome and gemcitabine activity. We observed a significant correlation between outcome and miR-21 expression in laser-microdissected tumors from gemcitabine-treated patients, both in the metastatic and in the adjuvant setting, as well as a correlation with chemosensitivity in PDAC cells. Further, we characterized several factors, including modulation of apoptosis, Akt phosphorylation, and expression of PTEN and genes involved in invasive behavior, which may contribute to miR-21 role in gemcitabine chemoresistance and provide mechanistic insights for the rational development of new targeted combinations against PDAC.

Materials and Methods

Clinical study

Patients. From December 2001 to October 2004, a total of 81 patients affected by metastatic ($n = 31$) or nonmetastatic ($n = 50$) PDAC (median age, 63; range, 32–83) and treated with gemcitabine were enrolled in a retrospective study on determinants of gemcitabine activity (10). Treatment details are in Supplementary Materials and Methods.

Tissues. RNA was extracted from biopsies and primary tumors, resected before chemotherapy, using the LMD7000 instrument (Leica Microsystems), as described previously (40). LMD was also used to obtain cells of epithelium ducts from 5 normal pancreatic tissues, obtained from the “Organ Donor Program,” whereas in 10 cases RNA was extracted from the whole tumor without microdissection. All specimens were obtained according to a protocol approved by the Local Ethics Committee.

Reverse transcription and quantitative PCR analysis of miR-21. RNA (10–100 ng) was reverse transcribed and the resulting cDNA was amplified using the specific Taqman MicroRNA assays (Applied Biosystems) for miR-21 and RNU43 (assay ID, 000397 and 001095, respectively). The PCRs were performed in the 7500HT sequence detection system (Applied Biosystems), in accordance with the manufacturer’s instructions. Specimens were amplified in triplicate with appropriate nontemplate controls. Amplification data were

normalized to RNU43 expression. Quantification of relative expression [reported as arbitrary units (a.u.)] was performed using the ΔC_t method. Quantitative PCR data showed a variability coefficient of C_t always lower than 2% of mean values.

In vitro studies

Cells and cytotoxicity studies. Seven PDAC cell lines, the human pancreatic duct epithelial-like cell line hTERT-HPNE, and skin fibroblasts Hs27 were obtained from the American Type Culture Collection, whereas seven primary PDAC cultures (LPc006, LPc028, LPc033, LPc067, LPc111, LPc167, and PP437) were isolated from patients at Pisa Hospital (40). The cell growth-inhibitory effect of 72-hour gemcitabine exposure was studied as described previously (10).

Quantitative PCR analysis of miR-21. RNA was extracted according to the Trizol-chloroform protocol, and the miR-21 basal expression as well as its modulation after gemcitabine treatment using IC_{50} concentrations were assessed by quantitative PCR, as described above. Data were normalized to RNU43,

and quantification of miR-21 expression compared with untreated controls was assessed using the $\Delta\Delta C_t$ method (10).

miR-21 transfection. The effect of miR-21 on chemosensitivity and apoptosis was evaluated by transfecting the PDAC cells with pre-miR-21 precursors (pre-miR-21) or antisense oligonucleotides (anti-miR-21) purchased from Ambion (assay ID, PM10206 and AM10206, respectively) at 30 nmol/L final concentration. Cells were plated at 200,000 per well in 3 mL RPMI 1640 with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics. After 24 hours, cells were exposed to 9 μ L Oligofectamine (Invitrogen) in serum-free medium and mixed for 10 minutes, followed by addition of 3 μ L miR-21 precursor/inhibitor. Cells were also incubated with miRNA-negative controls and FAM-labeled pre-miR/anti-miR (Ambion). After 24 hours, the medium was replaced with RPMI 1640 with 10% FBS, without antibiotics. To evaluate the effects on cell growth, cells were allowed to grow for additional 48 or 72 hours in drug-free medium or treated with gemcitabine, as described previously (10, 40). To evaluate apoptosis induction

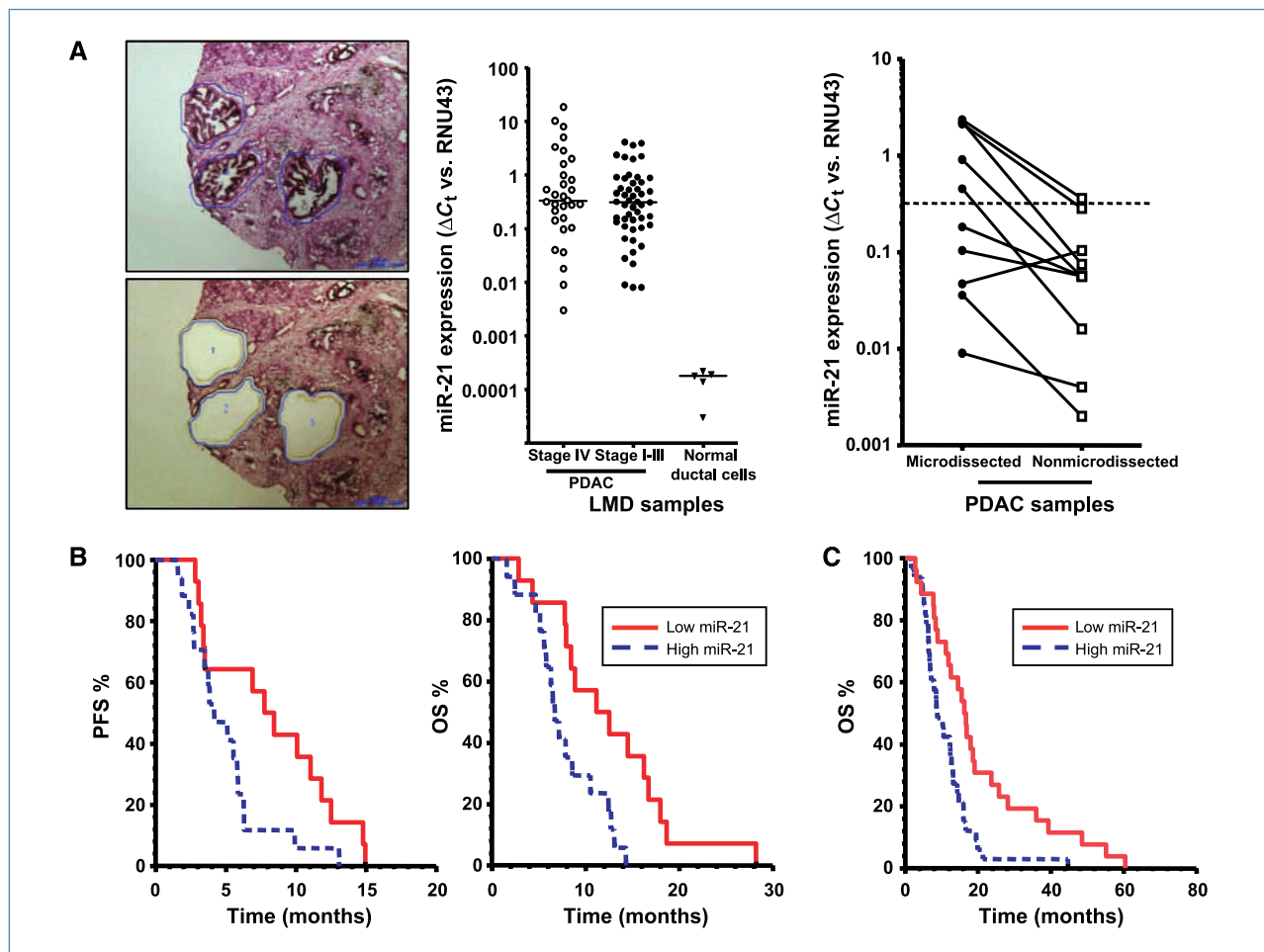


Figure 1. A, left, example of extracted tumor epithelium and stroma before and after LMD. H&E staining of 5- μ m frozen sections. Original magnification, $\times 10$. Middle, miR-21 expression in the cohort of 81 patients (31 in metastatic and 50 in stage I-III) and 5 normal pancreatic ductal tissues. Right, comparison between miR-21 expression in microdissected and nonmicrodissected samples from 10 PDAC. B, Kaplan-Meier curves of PFS (left) and OS (right) according to miR-21 in the PDAC patients in the metastatic setting. C, OS curve including both treatment settings.

and modulation of cell signaling and invasion, cells were allowed to grow for additional 48 hours in drug-free medium or treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ gemcitabine, 10 $\mu\text{mol/L}$ LY294002, and 200 nmol/L rapamycin, alone and in combinations (26), as described in Supplementary Materials and Methods. Additional control wells were used for RNA extraction, as described above, whereas the transfection efficiency with FAM-labeled pre-miR/anti-miR controls was evaluated with fluorescence microscopy.

Statistics. All experiments were performed in triplicate and repeated thrice. Data were expressed as mean \pm SE and analyzed by Student's *t* test or ANOVA followed by the Tukey's multiple comparison. Comparison of clinical information and miR-21 expression was made using Pearson χ^2 test and Wilcoxon test. The relationship between miR-21 expression and outcome was evaluated by stratifying the patients with respect to the median expression value.

OS was calculated from the date of pathologic diagnosis (i.e., the date of surgery/biopsy) to the date of death, DFS was defined as the time from the date of diagnosis to the date of first relapse or death in radically resected patients, and progression-free survival (PFS) was defined as the time from the date of diagnosis to the date of progression or death in metastatic patients. OS, PFS, and DFS curves were constructed using Kaplan-Meier method, and differences were analyzed using log-rank test. The significant prognostic variables of OS in univariate analysis were included in multivariate analyses using Cox's proportional hazards model. Data were analyzed using SPSS v.17 statistical software (SPSS, Inc.). Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Clinical study

miR-21 expression in pancreatic specimens. LMD was performed on 81 samples from PDAC patients, including 7 tumor specimens from which primary cultures were derived. LMD was also performed on five specimens from normal ducts. For each sample, the precision of the focus of the laser beam allowed to pick up 5,000 cells, with high degree of accuracy and extremely low risk of contamination (Fig. 1A, video). miR-21 was detectable in all samples, and Fig. 1A shows its large variability across the tissues, with median value of 0.315 a.u. (range, 0.003–18.336). Remarkably, miR-21 expression profile differed significantly between grade 1/2 ($n = 33$) and grade 3 ($n = 35$) tumors ($P = 0.01$, Wilcoxon rank sum test). In contrast, no difference was detected in miR-21 expression levels according to stage or other clinicopathologic parameters (Table 1).

The mean miR-21 expression of normal pancreatic duct samples was \sim 1,000-fold lower than the levels in microdissected tumors (Fig. 1A). Furthermore, the nonmicrodissected tumor tissues had a significantly lower expression of miR-21 than their respective microdissected samples ($P = 0.014$; Fig. 1A).

miR-21 overexpression correlated with worse outcome in PDAC patients treated with gemcitabine. Clinical data were available from 31 patients in the metastatic and 28 in the adjuvant setting, followed-up until December 31, 2009,

Table 1. Association of miR-21 expression with clinicopathologic covariates

Characteristic	Low miR-21 (%)	High miR-21 (%)	P (Wilcoxon)
No. patients			
Age (median years)			
≤ 63	18 (46.2)	21 (53.8)	0.64
> 63	22 (52.4)	20 (47.6)	
Sex			
Male	20 (46.2)	23 (53.5)	0.96
Female	20 (52.6)	18 (47.4)	
Clinical stage			
I–II	16 (48.5)	17 (51.5)	0.39
III–IV	23 (50.0)	23 (50.)	
Lymph node			
Negative	4 (57.1)	3 (42.9)	0.47
Positive	18 (48.6)	19 (51.4)	
Vascular infiltration			
No	14 (66.7)	17 (70.8)	0.68
Yes	7 (33.3)	7 (29.2)	
Neural infiltration			
No	17 (81.0)	15 (62.5)	0.91
Yes	4 (19.0)	9 (37.5)	
PanIN			
No	7 (33.3)	10 (43.5)	0.17
Yes	14 (66.7)	13 (56.5)	
Grading			
1–2	21 (63.6)	12 (36.4)	0.01
3	9 (25.7)	26 (74.3)	
Setting			
Metastatic	14 (45.2)	17 (54.8)	0.82
Adjuvant	12 (42.9)	16 (57.1)	

NOTE: Data on age and sex were available from 81 patients, on stage from 79 patients, on grading from 68 patients, on vascular and neural infiltration from 45 patients, and on lymph node infiltration and pancreatic intraepithelial neoplasia from 44 patients.

Abbreviation: PanIN, pancreatic intraepithelial neoplasia.

with follow-up ranging from 1.6 to 60.5 months (median, 17.3 mo). Response data are in Supplementary Table S1.

Table 2 summarizes the clinicopathologic characteristics and their relation with outcome in metastatic patients. The median PFS and OS were 5.5 and 8.4 months, respectively. The high miR-21 expression group had a poorer prognosis than the low expression group. Patients with miR-21 expression above median had a significantly shorter median OS [6.7; 95% confidence interval (95% CI), 5.5–7.9 mo] compared with patients with miR-21 expression lower than median [11.2; 95% CI, 4.5–17.8 mo; hazard ratio (HR), 3.1; 95% CI, 1.4–7.1; $P = 0.01$]. Similar results were obtained with the PFS curves of patients with miR-21 expression above median, with a median of 4.2, compared with 7.8 months in patients with the lowest miR-21 expression (HR, 2.4; 95% CI, 1.1–5.3;

$P = 0.03$). The OS and PFS Kaplan-Meier curves are shown in Fig. 1B.

Table 3 summarizes the clinicopathologic characteristics and their accordance with OS in radically resected patients. The median OS was 16.0 months (95% CI, 14.3–17.7). No association was observed between OS and the studied characteristics, except miR-21. Patients with miR-21 expression above median had a median OS of 13.2 months (95% CI, 8.3–18.0), whereas the remaining patients had a median OS of 23.7 months (95% CI, 12.3–35.0; HR, 3.1; 95% CI, 1.4–7.3, $P = 0.008$). Similar data were reported for DFS [8.8 mo (95% CI, 4.7–18.0) versus 23.6 mo (95% CI, 12.3–35.0)], for miR-21 above and below the median, with HR = 4.4 (95% CI, 1.8–10.7; $P = 0.001$).

Univariate analysis of patients in the adjuvant and in the metastatic setting ($n = 59$) showed that the treatment setting was a significant prognostic factor of OS, whereas stage showed a trend toward significant association, and age, gender, and infiltration were not correlated with outcome (Table 3). However, a significant difference in survival curves was still found according to miR-21 expression levels, with OS of 8.8 (95% CI, 5.8–11.8) versus 16.2 (95% CI, 13.3–19.2) months (HR, 2.3; 95% CI, 1.3–4.1; $P = 0.007$; Fig. 1C). Multivariate analysis indicated that the adjuvant setting of therapy and the high miR-21 expression were independent predictors of PDAC prognosis (HR, 0.3; 95% CI, 0.1–0.6, with $P < 0.001$ for adjuvant setting, and HR, 3.1; 95% CI, 1.2–5.3, with $P = 0.003$ for miR-21 expression above median, respectively).

In vitro studies

Gemcitabine cytotoxicity. A dose-dependent inhibition of cell growth was observed after gemcitabine treatment in all PDAC cells (Fig. 2A), with IC_{50} s ranging from 5.5 ± 0.7 nmol/L (LPc028) to 38.1 ± 3.0 nmol/L (PL45).

miR-21 is expressed in all PDAC cells and significantly increased after gemcitabine treatment. The expression of miR-21 was detectable in all PDAC cell lines/cultures as well as in hTERT-HPNE cells and Hs27 fibroblasts. However, this expression differed among cells, ranging from 4.5 a.u. in PL45 to 0.1 a.u. in Hs27 cells (Fig. 2A). miR-21 expression levels in primary cultures were correlated to the expression detected in their respective tissues (Supplementary Fig. S1).

Although the small sample size of cells used in this study precluded the assessment of the predictive value of miR-21 expression data as validated determinants of chemosensitivity, the Spearman test showed a trend toward significant correlation ($P = 0.08$) between the miR-21 expression and gemcitabine IC_{50} s (Fig. 2B). Furthermore, cells with miR-21 expression below the median had significantly lower IC_{50} s than cells with miR-21 expression above the median (Fig. 2C).

To evaluate whether gemcitabine affects miR-21 expression *in vitro*, we measured the levels of miR-21 in 13 PDAC cells/cultures after 72-hour exposure to gemcitabine at IC_{50} . This treatment resulted in a significant increase of miR-21 expression, ranging from 2.1- to 19.1-fold, in comparison with basal expression (Fig. 2D).

miR-21 inhibits gemcitabine antiproliferative effects and apoptosis induction in PDAC cells. To explore the role of miR-21 on antiproliferative effects and apoptosis induction after gemcitabine, relatively sensitive (LPc028 and LPc067) and resistant (LPc111 and LPc006) cells were transfected with miR-21-specific inhibitor and precursor. Transfection efficiency was evaluated by analysis of fluorescent microscope images of cells transfected with specific FAM-labeled pre-miR/anti-miR. These tests showed at least 60% efficiency for both transfection conditions in each cell type, with >70% cell viability. Furthermore, we studied miR-21 expression by quantitative PCR in three of the four transfected cultures,

Table 2. Clinical outcome according to clinical characteristics and miR-21 expression in the patients in the metastatic setting

Characteristic	Patients, n (%) [*]	Response/evaluable patients, n (%) [*]	P	PFS, mo (95% CI)	P	OS, mo (95% CI)	P
No. patients	31	3/31 (9.7)		5.5 (3.4–7.7)		8.4 (7.1–9.7)	
Baseline characteristics							
Age (y)							
≤63	18 (58.1)	2/18 (11.1)	0.99	4.2 (2.9–8.4)	0.67	7.9 (7.5–8.3)	0.22
>63	13 (41.9)	1/13 (7.7)		5.8 (2.9–8.7)		11.2 (3.2–19.1)	
Sex							
Male	22 (71.0)	1/22 (4.5)	0.19	5.1 (2.9–7.4)	0.53	7.9 (5.8–9.9)	0.96
Female	9 (29.0)	2/9 (22.2)		9.9 (4.3–10.7)		12.4 (1.1–23.8)	
miR-21 expression							
≤Median	14 (45.2)	2/14 (14.3)	0.58	7.8 (5.0–10.5)	0.03	11.2 (4.5–17.8)	0.01
>Median	17 (54.8)	1/17 (5.9)		4.2 (2.3–6.0)		6.7 (5.5–7.9)	

NOTE: Response, OS, and PFS data were available from all the 31 patients. No individuals were alive at last contact (event rate, 100%).

^{*}Percentage was calculated with respect to n of the correspondent characteristic.

Table 3. Survival according to clinical characteristics and miR-21 expression

Characteristic	Adjuvant setting			Adjuvant + palliative setting		
	<i>n</i>	OS, mo (95% CI)	<i>P</i>	<i>n</i>	OS, mo (95% CI)	<i>P</i>
No. patients	28	16.0 (14.3–17.7)		59	12.4 (9.7–15.2)	
Age (median years)						
≤63	12	16.7 (9.8–23.5)	0.66	34	12.3 (8.6–15.9)	0.97
>63	16	13.2 (3.5–22.9)		25	12.5 (8.5–16.5)	
Sex						
Male	13	16.0 (13.5–18.5)	0.59	35	10.5 (6.0–15.0)	0.19
Female	15	16.7 (9.3–24.0)		24	13.1 (10.6–15.5)	
Clinical stage						
I–II	19	15.5 (10.3–20.8)	0.77	19	15.5 (10.3–20.8)	0.05
III–IV	8	19.0 (14.5–23.5)		39	10.5 (5.8–15.3)	
Lymph node						
Negative	2	6.4	0.71	2	6.4	0.71
Positive	25	16.7 (14.5–18.8)		25	16.7 (14.5–18.8)	
Vascular infiltration						
No	19	16.0 (12.0–20.0)	0.93	19	16.0 (12.0–20.0)	0.93
Yes	9	19.0 (12.2–25.8)		9	19.0 (12.2–25.8)	
Neural infiltration						
No	22	16.7 (12.7–20.6)	0.70	22	16.7 (12.7–20.6)	0.70
Yes	6	13.2 (2.2–24.2)		6	13.2 (2.2–24.2)	
PanIN						
No	9	16.7 (14.7–18.6)	0.71	9	16.7 (14.7–18.6)	0.71
Yes	19	16.0 (13.0–19.0)		19	16.0 (13.0–19.0)	
Grading						
1–2	12	19.5 (11.9–27.1)	0.13	18	16.7 (14.0–19.4)	0.12
3	15	14.7 (10.1–19.4)		18	12.3 (9.7–14.9)	
Setting						
Metastatic	—	—	—	31	8.4 (7.2–9.7)	<0.001
Adjuvant	—	—	—	28	16.0 (14.3–17.7)	
miR-21 expression						
≤Median	12	23.7 (12.3–35.0)	0.008	26	16.2 (13.3–19.2)	0.003
>Median	16	13.2 (8.3–18.0)		33	8.8 (5.8–11.8)	

NOTE: Data on age, sex, treatment, and miR-21 were available from all; on stage from 27 of 28 patients in the adjuvant and from all in the metastatic setting; on grading from 27 of 28 patients in the adjuvant and from 9 of 31 patients in the metastatic setting; on lymph node infiltration from 27 of 28 patients in the adjuvant setting; and on vascular/neural infiltration and pancreatic intraepithelial neoplasia from the 28 patients in the adjuvant setting.

showing a 3-, 2-, and 1.8-fold increase of miR-21 expression in LPc067, LPc111, and LPc028 cells, respectively (Supplementary Fig. S2). The increased expression of miR-21 was associated with ~15% increased proliferation and reduced apoptosis in cells transfected with pre-miR-21, suggesting that aberrant expression of this miRNA enhanced cell growth.

Transfection with pre-miR-21 resulted in significant reduction of gemcitabine antiproliferative effects, with increase of 72-hour exposure to gemcitabine at IC₅₀s from 1.3 ± 0.3 nmol/L (LPc028), 7.2 ± 0.6 nmol/L (LPc006), 5.5 ± 0.9 nmol/L (LPc067), and 16.6 ± 2.0 nmol/L (LPc111) to 15.6 ± 2.2, 44.5 ± 3.1, 37.6 ± 4.2, and 85.1 ± 11.4 nmol/L, respectively (Fig. 3A).

The effects on apoptosis induction by gemcitabine were studied on LPc028 and LPc067 cells, which were relatively

sensitive to gemcitabine antiproliferative effects but characterized by miR-21 expression above and below the median, respectively. The different assays allowed the evaluation of early apoptosis, late apoptosis, and global cell death, showing similar results (Supplementary Fig. S3). Both cultures showed decreased gemcitabine-induced apoptosis when transfected with pre-miR-21. In LPc067 cells, early apoptosis was reduced from 38% to 23%, whereas late apoptosis was reduced from 8% to 5%, as detected by Annexin V assay. In contrast, LPc067 cells transfected with anti-miR-21 had increased cell death, and analysis of typical apoptotic morphology showed ~10% increased apoptotic index in gemcitabine-treated cells. Similarly, only 12% of LPc028 underwent apoptosis after gemcitabine treatment in cells transfected with pre-miR-21, whereas a higher percentage (28%) was found after gemcitabine

exposure in cells treated with miRNA control (Fig. 3B). Gemcitabine exposure in cells transfected with anti-miR-21 significantly increased apoptotic index up to 39%.

To further investigate the effects of miR-21 on pathways involved in inhibition of apoptosis, cells were transfected with pre-miR-21 and treated with gemcitabine and agents targeting Akt/protein kinase B/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, such as LY294002 and rapamycin. The apoptotic index after LY294002 or rapamycin treatment was

<8% in both cell cultures. These values were reduced around 3% to 5% in cells transfected with pre-miR-21. The combination of gemcitabine with rapamycin slightly increased the apoptotic index in both cell cultures, whereas the combination of gemcitabine with LY294002 resulted in an additive effect on apoptosis induction (+6%) only in LPc067 cells. These combinations were not able to reverse the antiapoptotic effect of pre-miR-21 transfection. However, the combination of all the three drugs (i.e., gemcitabine + LY294002 + rapamycin)

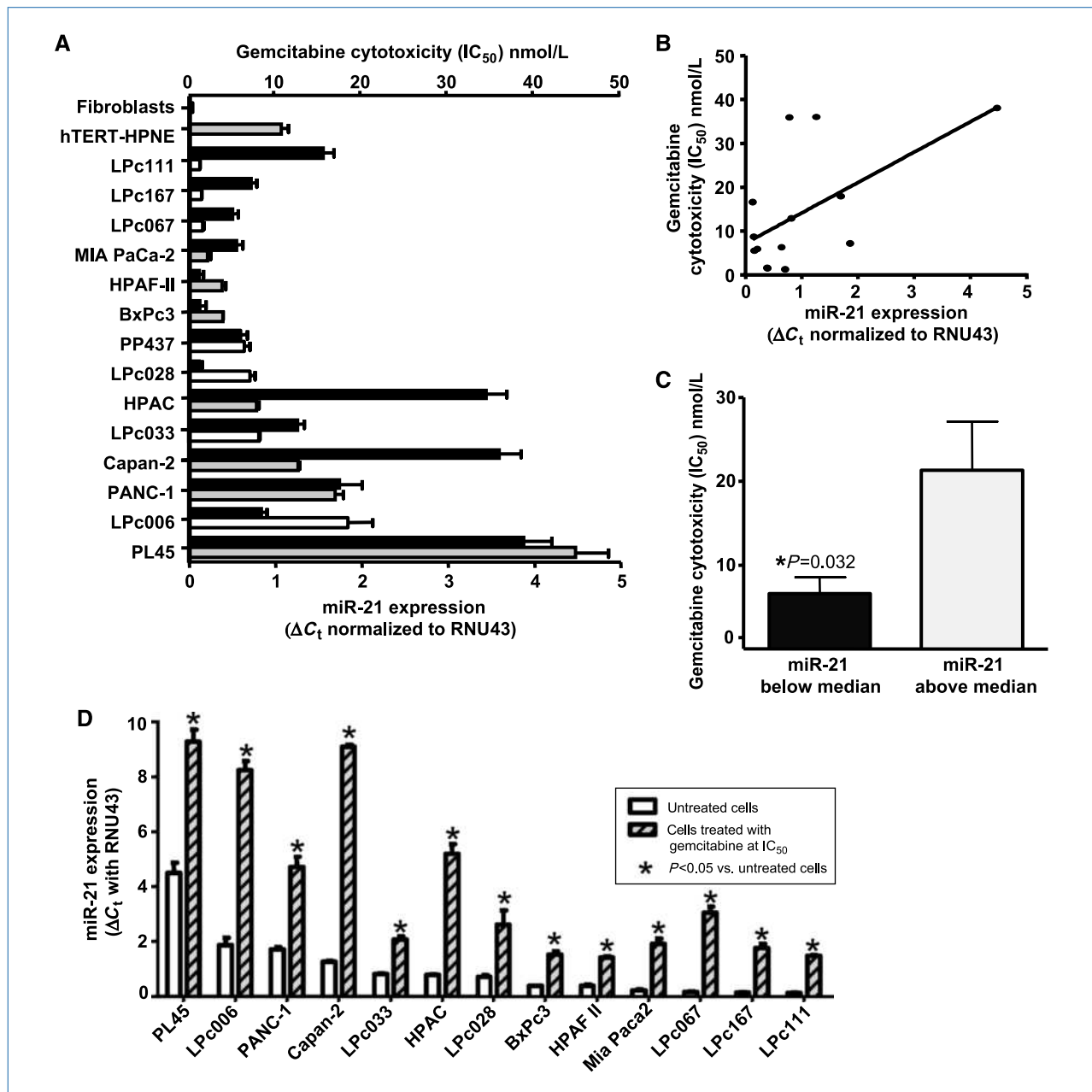


Figure 2. A, gemcitabine IC₅₀s (black columns) and expression values of miR-21 in PDAC cell lines (gray columns), primary cultures (white columns), hTERT-HPNE cells, and Hs27 fibroblasts. B, correlation between miR-21 expression and gemcitabine cytotoxic activity. C, analysis of median IC₅₀ in cells with miR-21 expression above and below the median. D, significant modulation of miR-21 expression in PDAC cells treated with gemcitabine at IC₅₀. Columns, mean from three independent experiments; bars, SE.

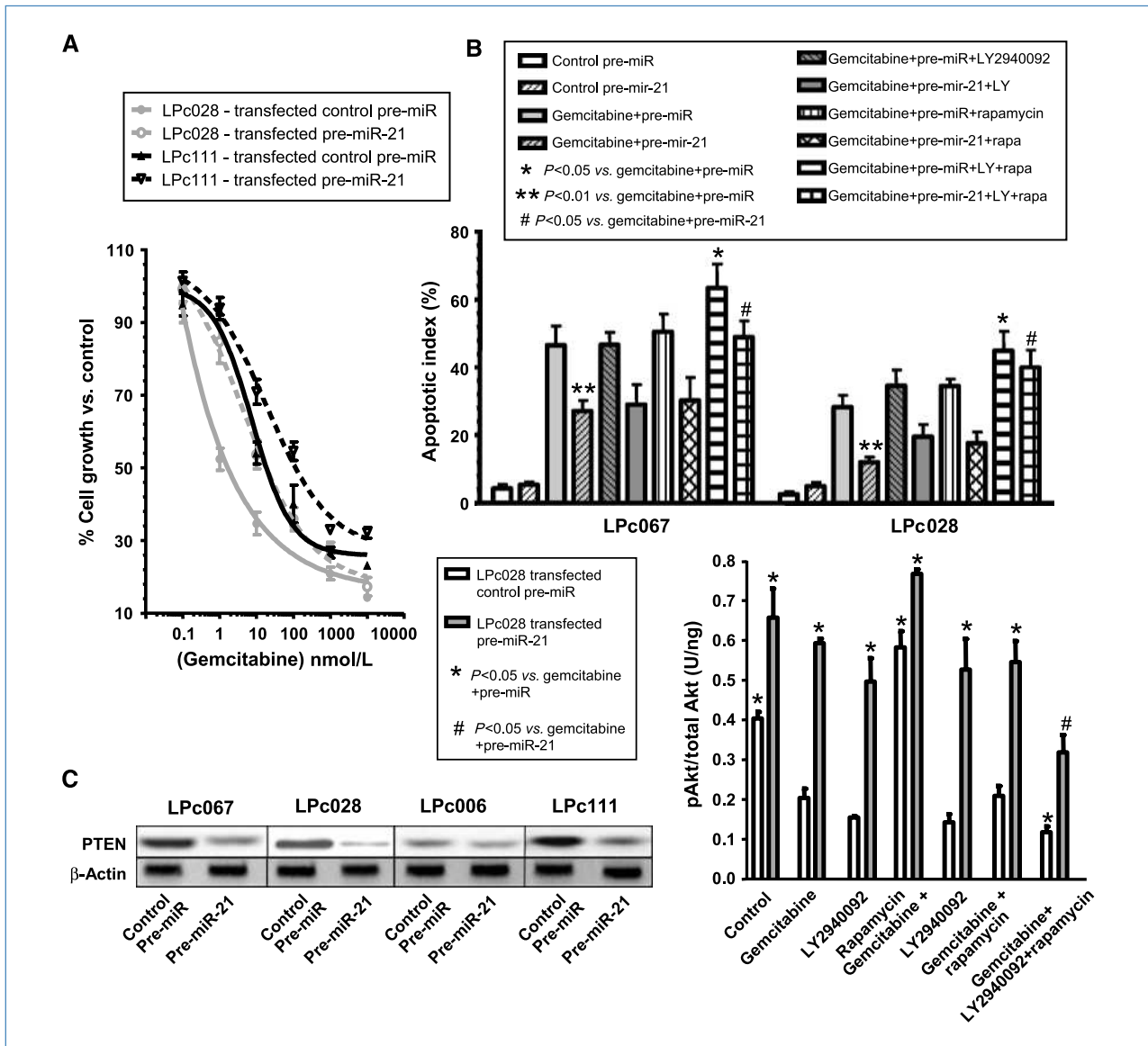


Figure 3. A, representative curves of growth-inhibitory effects of 72-h gemcitabine exposure in cells transfected with pre-miR-21. B, apoptosis after pre-miR-21 transfection and exposure to gemcitabine, LY294002, rapamycin, and their combinations. C, representative blots of Western blotting analyses of modulation of PTEN expression (left) and modulation of Akt phosphorylation by pre-miR-21 transfection, gemcitabine, LY294002, rapamycin, and their combinations (right). Columns, mean; bars, SE.

significantly increased the apoptotic index with respect to gemcitabine alone and reversed the antiapoptotic effect observed in the cells transfected with pre-miR-21. The apoptotic index in LPc067 cells transfected with pre-miR-21 and treated with gemcitabine + LY294002 + rapamycin was 49% ($P < 0.05$ versus 28% of LPc067 cells transfected with pre-miR-21 treated with gemcitabine). Similar results were observed in the LPc028 cells (Fig. 3B).

miR-21 affects PTEN and Akt expression. Previous studies showed that (a) miR-21 regulates expression of PTEN and phosphorylation of its downstream kinase Akt (24, 26, 33) and (b) the reduction of phospho-Akt (pAkt) correlated with the enhancement of gemcitabine-induced apoptosis and

antitumor activity *in vitro* and *in vivo*, suggesting that Akt pathway plays a significant role in mediating drug resistance in PDAC cells (41). Therefore, we investigated the PTEN expression and Akt phosphorylation status before and after pre-miR-21 transfection and drug treatment.

Pre-miR-21 transfection reduced PTEN expression in all the cell cultures (Fig. 3C), whereas tumors with high miR-21 expression had lower PTEN expression (Supplementary Fig. S4).

Akt phosphorylation was evaluated in two cell cultures, including LPc028, described previously, and LPc006 (relatively resistant to gemcitabine and with high miR-21 expression). Transfection with pre-miR-21 resulted in an increase of pAkt/Akt ratio, ranging from +24% to +63% in LPc006 and

LPc028 cells, respectively. In contrast, transfection with anti-miR-21 significantly reduced pAkt/Akt ratio, from 0.198 to 0.092 U/ng in LPc006 and from 0.403 to 0.142 U/ng in LPc028 cells.

Gemcitabine exposure slightly reduced pAkt/Akt ratio in LPc006 but significantly affected this ratio in LPc028 cells. Similarly, LY294002 significantly impaired the activation status of Akt in both cell cultures. In contrast, in LPc006 cells, rapamycin hardly affected Akt phosphorylation at serine residue pS473 nor total Akt levels but increased pAkt/Akt ratio in LPc028 cells. In the LPc006 cells, the lowest levels of pAkt/Akt compared with control were observed after exposure to the combination of gemcitabine and LY294002. However, pAkt/Akt ratio was potently (>50%) downregulated by the combination of rapamycin with gemcitabine and LY294002 in both LPc006 and LPc028 cells (Fig. 3C).

Furthermore, the combination of gemcitabine and LY294002 after pre-miR-21 transfection resulted in 18% decrease of pAkt/Akt ratio with respect to untreated pre-miR-21-transfected cells, but a more pronounced inhibition was detected after the combination of all three drugs (-32%) in LPc006-transfected cells. Similar results were found after the combination of gemcitabine, rapamycin, and LY294002 in LPc028 cells, with pAkt/Akt ratio reduced to 0.318 U/ng.

miR-21 enhanced metalloproteinase expression and vascular endothelial growth factor expression/secretion. Because miR-21 has been reported to have proinvasion and proangiogenic effects, we evaluated the expression of possible markers of these activities.

As marker for invasion, we investigated mRNA expression of matrix metalloproteinase-2 (*MMP-2*) and *MMP-9* in LPc067 cells transfected with miR-21, showing a 5.6- to 5.9-fold increase ($P < 0.05$). As marker for angiogenesis, we evaluated both vascular endothelial growth factor (*VEGF*) mRNA expression levels and VEGF secretion into the medium, showing an increase after miR-21 transfection of +20% and +104% (LPc028) and +36% and +58% (LPc067), respectively (Supplementary Fig. S5).

Discussion

This study evaluated the effect of miR-21 on the outcome of PDAC and, to our knowledge, is the first to show its association with PFS and OS in advanced PDAC patients treated with gemcitabine. Furthermore, we observed a significant association between miR-21 expression and DFS/OS in patients who underwent radical resection and were treated with gemcitabine in the adjuvant setting.

Recent trials supported the use of chemotherapy in radically resected patients, but the most effective regimen (gemcitabine or 5-fluorouracil/leucovorin) remains unclear (7, 8). Similarly a phase 3 trial showed that a cisplatin-epirubicin-5-fluorouracil-gemcitabine regimen obtained a 1-year survival rate of 38.5%, which was significantly better than single-agent gemcitabine (6). However, there are still no guidelines for selecting treatment for PDAC both in the adjuvant and in the metastatic setting.

Several molecular predictors of response and toxicity to chemotherapy in PDAC are being investigated, including germ-line markers such as polymorphisms (9), tumor-related molecular markers such as mutations, and aberrations in mRNA/protein expression (11, 42). Over the last few years, miRNA emerged as a prominent class of gene regulators, and their aberrant expression was linked to different tumors, including PDAC (13, 17 18). Several studies suggested their use for diagnostic purpose, showing that expression pattern of 217 miRNAs classified poorly differentiated tumors better than data from 16,000 mRNA (43). However, a miRNA can regulate multiple coding genes related to tumor growth and is also likely to more effectively reflect the status and outcome of a disease.

More than 500 miRNAs are expressed in human cells, but high-throughput screenings identified a limited number of key miRNAs. Since its identification as the miRNA most strongly upregulated in glioblastoma, miR-21 has attracted the attention of researchers in various fields (22). *In situ* hybridization showed strong miR-21 expression only in PDAC cells but not in the surrounding stroma (36). Interestingly, in the present study, we observed a significant lower expression of miR-21 in 10 tumor samples, which were not obtained by LMD, than in their corresponding laser-microdissected specimens. This suggests that LMD succeeded in eliminating the stroma, which can mask the true expression of miR-21. The study of Dillhoff and colleagues (36) also reported that miR-21 overexpression was predictive of shorter survival in node-negative but not in all the patients. However, this subset of patients was small ($n = 17$), and they had a significantly longer OS than patients with positive lymph nodes. Previous studies reported controversial data about the prognostic role of lymph node and staging, and most PDAC patients have American Joint Committee on Cancer stage >2A at diagnosis (44), as in our population.

Several studies showed that more advanced/malignant tumors expressed higher levels of miR-21 (32-35). However, in gastric carcinomas, in which miR-21 can serve as a diagnostic marker, its levels did not seem to have prognostic value (45), whereas reports in patients with diffuse large B-cell lymphoma suggested that high levels of miR-21 in tumor and serum were associated with better prognosis (46).

These controversial data suggested that the prognostic role of miR-21 is possibly tumor specific as well as treatment related. Indeed, miR-21 expression was correlated with resistance to several anticancer agents in different models (15, 23, 26, 37). In particular, inhibition of miR-21 increased sensitivity and apoptosis induction by gemcitabine in PDAC but not in colon cancer cells (25, 38).

The present study revealed that PDAC cells with miR-21 expression below the median had significantly lower gemcitabine IC_{50} s than cells with miR-21 expression above the median. miR-21 expression was similar in PDAC cultures and their respective tissues, as reported in glioblastoma cultures and tumors (22), suggesting the suitability of these *ex vivo* models for further molecular analysis. However, miR-21 expression was detectable at similar levels in PDAC and hTERT-HPNE cells. These results can be explained by the fact that although hTERT-HPNE cells (47) have a normal phenotype

(diploid, with wild-type p16^{INK4a}, K-Ras, and p53), miR-21 expression may be related to the immortalization of these cells by the ectopic expression of hTERT, as reported previously in the immortalized pancreatic ductal cells HPDE (25).

Of note, miR-21 expression was increased after exposure to gemcitabine in all PDAC cells, suggesting that this miRNA can also contribute to acquired chemoresistance and explain the short time of response/stabilization in most PDAC patients. However, no tissues from previously treated patients were available, and high levels of miR-21 may not only characterize cancers but also represent a common feature of pathologic growth or stress, as observed in models of mouse hypertrophic heart (48).

Further, we studied the activity of miR-21 on pharmacologic effects of gemcitabine and molecular pathways involved in its activity. Increased expression of miR-21 following transfection with a specific precursor led to a significant reduction of antiproliferative effects and apoptotic index in cells treated with gemcitabine, as reported previously (25, 27). Computational algorithms predict hundreds of mRNA as possible targets for miR-21, but only a few of them have been experimentally validated and are involved in apoptosis regulation. Previous studies showed that both miR-21 and anti-miR-21 modulated a luciferase construct containing PTEN 3' untranslated region and the expression of PTEN *in vitro*, whereas the staining of PTEN was reversely correlated with miR-21 in tongue squamous cell carcinoma (24, 26, 33). Other reports did not find changes in PTEN expression after transfection with miR-21 precursors in PDAC cells (25), but in the present study, transfection with pre-miR-21 resulted in reduction of PTEN expression, which was also negatively correlated with miR-21 expression in 14 PDAC samples. Furthermore, in agreement with the hypothesis that overexpression of miR-21 leads to downregulation of PTEN and a more active signaling through the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Akt pathway, rendering the cancer cells less susceptible to apoptosis, we found that increased miR-21 expression was associated with activation of PI3K/Akt/mTOR pathway. Then, we showed that drugs targeting PI3K/Akt/mTOR pathway reduced pAkt levels and enhanced apoptosis when used in combination with gemcitabine. These findings are consistent with studies showing that addition of PI3K inhibitors to gemcitabine-treated cells decreased pAkt and increased apoptosis (41). In contrast, rapamycin treatment alone resulted in highly increased pAkt levels compared with untreated cells

and cells treated with gemcitabine. These results can be explained by the ability of rapamycin to inhibit the mTORC1-mediated pathway through dephosphorylation of several downstream effectors, including S6K1, which acted as antagonist of PI3K/Akt/mTOR pathway (49). Therefore, rapamycin-mediated inhibition of mTORC1 resulted in induction of Akt activity (50). However, the pAkt/Akt ratio was strongly downregulated by the combination of rapamycin with gemcitabine and LY294002, and the combination of the three drugs overcame the resistance to apoptosis caused by pre-miR-21 transfection, yielding useful information on critical targets to reduce chemoresistance.

Another recently identified miR-21 target is RECK, which might mediate miR-21 invasiveness and angiogenesis by inhibiting MMPs (22). Therefore, we studied mRNA expression of *MMP-2* and *MMP-9*, as well as mRNA and protein expression of VEGF, which were positively correlated with miR-21 expression, as reported in other PDAC cells (25).

The consistency and strength of the accumulating preclinical data, together with our clinical data on correlation with outcome, strongly suggest that PDAC cells are more aggressive and resistant to gemcitabine if they have high expression of miR-21, which therefore represents a promising target for prognostic and therapeutic approaches.

About the prognostic use of miR-21, further validation in prospective studies is warranted, and more accessible samples sources, such as miR-21-enriched tumor-derived exosomes from blood, should be investigated. Similarly, the modulation of miR-21 targets seems as a promising adjuvant to current therapies of PDAC in selected patients, thus providing a potential new tool for treatment optimization.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank Dr. Mauro Baron (Leica Microsystems) for the valuable technical support.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received 12/11/2009; revised 02/22/2010; accepted 03/17/2010; published OnlineFirst 05/11/2010.

References

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2009;59:225-49.
- Li D, Xie K, Wolff R, et al. Pancreatic cancer. *Lancet* 2004;363:1049-57.
- Burriss HA III, Moore MJ, Andersen J, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreatic cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997;15:2403-13.
- Rivera F, Lopez-Tarruella S, Vega-Villegas ME, Salcedo M. Treatment of advanced pancreatic cancer: from gemcitabine single agent to combinations and targeted therapy. *Cancer Treat Rev* 2009;35:335-9.
- Cunningham D, Chau I, Stocken DD, et al. Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2009;27:5513-8.
- Reni M, Cordio S, Milandri C, et al. Gemcitabine versus cisplatin, epirubicin, fluorouracil, and gemcitabine in advanced pancreatic cancer: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* 2005;6:369-76.
- Neuhauss P, Riess H, Post S, et al. CONKO-001: final results of the randomized, prospective, multicenter phase III trial of adjuvant chemotherapy with gemcitabine versus observation in patients with resected pancreatic cancer (PC) [abstract 4504]. *J Clin Oncol* 2008; 26 Suppl 15:214s.

8. Neoptolemos J, Büchler M, Stocken DD, et al. ESPAC-3(v2): a multicenter, international, open-label, randomized, controlled phase III trial of adjuvant 5-fluorouracil/folinic acid (5-FU/FA) versus gemcitabine (GEM) in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma [abstract LBA4505]. *J Clin Oncol* 2009;27 Suppl 18:203s.
9. Li D, Frazier M, Evans DB, et al. Single nucleotide polymorphisms of RecQ1, RAD54L, and ATM genes are associated with reduced survival of pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:1720–8.
10. Giovannetti E, Del Tacca M, Mey V, et al. Transcription analysis of human equilibrative nucleotide transporter-1 predicts survival in pancreas cancer patients treated with gemcitabine. *Cancer Res* 2006;66:3928–35.
11. Jones S, Zhang X, Parsons DW, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 2008;321:1801–6.
12. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009;136:642–55.
13. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol* 2009;27:5848–56.
14. Passetti F, Ferreira CG, Costa FF. The impact of microRNAs and alternative splicing in pharmacogenomics. *Pharmacogenomics J* 2009;9:1–13.
15. Blower PE, Chung JH, Verducci JS, et al. MicroRNAs modulate the chemosensitivity of tumor cells. *Mol Cancer Ther* 2008;7:1–9.
16. Boren T, Xiong Y, Hakam A, et al. MicroRNAs and their target messenger RNAs associated with ovarian cancer response to chemotherapy. *Gynecol Oncol* 2009;113:249–55.
17. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, et al. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2006;120:1046–54.
18. Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 2007;297:1901–8.
19. Szafranska AE, Doleshal M, Edmunds HS, et al. Analysis of microRNAs in pancreatic fine-needle aspirates can classify benign and malignant tissues. *Clin Chem* 2008;54:1716–24.
20. Mardin WA, Mees ST. MicroRNAs: novel diagnostic and therapeutic tools for pancreatic ductal adenocarcinoma? *Ann Surg Oncol* 2009;16:3183–9.
21. Nam EJ, Yoon H, Kim SW, et al. MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14:2690–5.
22. Krichevsky AM, Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA. *J Cell Mol Med* 2009;13:39–53.
23. Si ML, Zhu S, Wu H, et al. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 2007;26:2799–803.
24. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007;133:647–58.
25. Moriyama T, Ohuchida K, Mizumoto K, et al. MicroRNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion, and chemoresistance. *Mol Cancer Ther* 2009;8:1067–74.
26. Meng F, Henson R, Lang M, et al. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006;130:2113–29.
27. Park JK, Lee EJ, Esau C, Schmittgen TD. Antisense inhibition of microRNA-21 or -221 arrests cell cycle, induces apoptosis, and sensitizes the effects of gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 2009;38:e190–9.
28. Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, et al. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol* 2008;28:5369–80.
29. Lu Z, Liu M, Stribinskis V, et al. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene* 2008;27:4373–9.
30. Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 2008;27:2128–36.
31. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 2007;129:1401–14.
32. Yan LX, Huang XF, Shao Q, et al. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* 2008;14:2348–60.
33. Li J, Huang H, Sun L, et al. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin Cancer Res* 2009;15:3998–4008.
34. Schetter AJ, Nguyen GH, Bowman ED, et al. Association of inflammation-related and microRNA gene expression with cancer-specific mortality of colon adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2009;15:5878–87.
35. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, et al. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol* 2006;24:4677–84.
36. Dillhoff M, Liu J, Frankel W, Croce C, Bloomston M. MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival. *J Gastrointest Surg* 2008;12:2171–6.
37. Li Y, Li W, Yang Y, et al. MicroRNA-21 targets LRRFIP1 and contributes to VM-26 resistance in glioblastoma multiforme. *Brain Res* 2009;1286:13–8.
38. Wang P, Zou F, Zhang X, et al. MicroRNA-21 negatively regulates Cdc25A and cell cycle progression in colon cancer cells. *Cancer Res* 2009;69:8157–65.
39. Li Y, Vanden Boom TG II, Kong D, et al. Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2009;69:6704–12.
40. Funel N, Giovannetti E, Del Chiaro M, et al. Laser microdissection and primary cell cultures improve pharmacogenetic analysis in pancreatic adenocarcinoma. *Lab Invest* 2008;88:773–84.
41. Ng SS, Tsao MS, Nicklee T, Hedley DW. Wortmannin inhibits PKB/Akt phosphorylation and promotes gemcitabine antitumor activity in orthotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Clin Cancer Res* 2001;7:3269–75.
42. Streit S, Michalski CW, Erkan M, Friess H, Kleeff J. Confirmation of DNA microarray-derived differentially expressed genes in pancreatic cancer using quantitative RT-PCR. *Pancreatology* 2009;9:577–82.
43. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834–8.
44. Pawlik TM, Gleisner AL, Cameron JL, et al. Prognostic relevance of lymph node ratio following pancreaticoduodenectomy for pancreatic cancer. *Surgery* 2007;141:610–8.
45. Chan SH, Wu CW, Li AF, Chi CW, Lin WC. miR-21 microRNA expression in human gastric carcinomas and its clinical association. *Anticancer Res* 2008;28:907–11.
46. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008;141:672–5.
47. Lee KM, Nguyen C, Ulrich AB, Pour PM, Ouellette MM. Immortalization with telomerase of the Nestin-positive cells of the human pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;301:1038–44.
48. Thum T, Gross C, Fiedler J, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 2008;456:980–4.
49. Haruta T, Uno T, Kawahara J, et al. A rapamycin sensitive pathway downregulates insulin signaling via phosphorylation and proteosomal degradation of insulin receptor substrate-1. *Mol Endocrinol* 2000;14:783–94.
50. O'Reilly KE, Rojo F, She Q, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res* 2006;66:1500–8.

Correction: Online Publication Dates for *Cancer Research* April 15, 2010 Articles

The following articles in the April 15, 2010 issue of *Cancer Research* were published with an online publication date of April 6, 2010 listed, but were actually published online on April 13, 2010:

Garmy-Susini B, Avraamides CJ, Schmid MC, Foubert P, Ellies LG, Barnes L, Feral C, Papayannopoulou T, Lowy A, Blair SL, Cheresh D, Ginsberg M, Varner JA. Integrin $\alpha 4\beta 1$ signaling is required for lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cancer Res* 2010;70:3042–51. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3761.

Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, Martin F, Apetoh L, Rébé C, Ghiringhelli F. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res* 2010;70:3052–61. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3690.

Nagasaka T, Rhee J, Kloor M, Gebert J, Naomoto Y, Boland CR, Goel A. Somatic hypermethylation of *MSH2* is a frequent event in Lynch syndrome colorectal cancers. *Cancer Res* 2010;70:3098–108. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3290.

He X, Ota T, Liu P, Su C, Chien J, Shridhar V. Downregulation of HtrA1 promotes resistance to anoikis and peritoneal dissemination of ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2010;70:3109–18. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3557.

Fiorentino M, Judson G, Penney K, Flavin R, Stark J, Fiore C, Fall K, Martin N, Ma J, Sinnott J, Giovannucci E, Stampfer M, Sesso HD, Kantoff PW, Finn S, Loda M, Mucci L. Immunohistochemical expression of BRCA1 and lethal prostate cancer. *Cancer Res* 2010;70:3136–9. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4100.

Veronese A, Lupini L, Consiglio J, Visone R, Ferracin M, Fornari F, Zanesi N, Alder H, D'Elia G, Gramantieri L, Bolondi L, Lanza G, Querzoli P, Angioni A, Croce CM, Negrini M. Oncogenic role of *miR-483-3p* at the *IGF2/483* locus. *Cancer Res* 2010;70:3140–9. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4456.

Lu W, Zhang G, Zhang R, Flores LG II, Huang Q, Gelovani JG, Li C. Tumor site-specific silencing of *NF- κ B p65* by targeted hollow gold nanosphere-mediated photothermal transfection. *Cancer Res* 2010;70:3177–88. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3379.

Geng H, Rademacher BL, Pittsenbarger J, Huang C-Y, Harvey CT, Lafortune MC, Myrthue A, Garzotto M, Nelson PS, Beer TM, Qian DZ. ID1 enhances docetaxel cytotoxicity in prostate cancer cells through inhibition of p21. *Cancer Res* 2010;70:3239–48. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3186.

Yoo BK, Chen D, Su Z-z, Gredler R, Yoo J, Shah K, Fisher PB, Sarkar D. Molecular mechanism of chemoresistance by astrocyte elevated gene-1. *Cancer Res* 2010;70:3249–58. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4009.

Lu ZH, Shvartsman MB, Lee AY, Shao JM, Murray MM, Kladney RD, Fan D, Krajewski S, Chiang GG, Mills GB, Arbeit JM. Mammalian target of rapamycin activator RHEB is frequently overexpressed in human carcinomas and is critical and sufficient for skin epithelial carcinogenesis. *Cancer Res* 2010;70:3287–98. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3467.

Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, Mürköster SS, Penfold MET, Schall TJ, Mentlein R. The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer Res* 2010;70:3299–308. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3642.

Nadiminty N, Lou W, Sun M, Chen J, Yue J, Kung H-J, Evans CP, Zhou Q, Gao AC. Aberrant activation of the androgen receptor by NF- κ B2/p52 in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2010;70:3309–19. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3703.

Acu ID, Liu T, Suino-Powell K, Mooney SM, D'Assoro AB, Rowland N, Muotri AR, Correa RG, Niu Y, Kumar R, Salisbury JL. Coordination of centrosome homeostasis and DNA repair is intact in MCF-7 and disrupted in MDA-MB 231 breast cancer cells. *Cancer Res* 2010;70:3320–8. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3800.

McFarlane C, Kelvin AA, de la Vega M, Govender U, Scott CJ, Burrows JF, Johnston JA. The deubiquitinating enzyme USP17 is highly expressed in tumor biopsies, is cell cycle regulated, and is required for G₁-S progression. *Cancer Res* 2010;70:3329–39. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4152.

Dudka AA, Sweet SMM, Heath JK. Signal transducers and activators of transcription-3 binding to the fibroblast growth factor receptor is activated by receptor amplification. *Cancer Res* 2010;70:3391–401. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3033.

Cho SY, Xu M, Roboz J, Lu M, Mascarenhas J, Hoffman R. The effect of CXCL12 processing on CD34⁺ cell migration in myeloproliferative neoplasms. *Cancer Res* 2010;70:3402–10. Published OnlineFirst April 13, 2010. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3977.

Published OnlineFirst 05/11/2010.

©2010 American Association for Cancer Research.
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1347



Association between DNA-repair polymorphisms and survival in pancreatic cancer patients treated with combination chemotherapy

Aim: This multicenter study evaluated the association of 11 candidate polymorphisms in eight genes with outcome of pancreatic cancer patients treated with the equivalent polychemotherapeutic regimens: cisplatin/epirubicin/capecitabine/gemcitabine, cisplatin/docetaxel/capecitabine/gemcitabine and gemcitabine/capecitabine plus epirubicin/cisplatin intra-arterial infusion. **Patients & methods:** Towards this end, polymorphisms were assessed in DNA from 122 pancreatic cancer stage-III/IV patients, and their associations with toxicity/response and progression-free survival (PFS) and overall survival were evaluated using Pearson- χ^2 and log-rank test. **Results:** Patients harboring *XPD* Gln751Gln, *XPD* Asp312Asn+Asn312Asn or *XRCC1* Arg399Gln+Gln399Gln genotypes had a worse prognosis. *XPD* Gln751Gln (hazard ratio: 1.9; $p = 0.003$) as well as combination of over two risk genotypes (hazard ratio: 2.7; $p < 0.001$), emerged as independent predictors for death risk at multivariate analysis. No correlations were observed with toxicity. Conversely, *XPD* Gln751Gln was associated with shorter PFS, while the lack of association with overall survival/PFS in gemcitabine monotherapy-treated patients suggested its role only for platinum-based regimens. **Conclusion:** Polymorphisms of DNA-repair genes appear to be candidate biomarkers of primary resistance to gemcitabine/cisplatin-based polychemotherapeutic regimens. The relatively small sample size coupled with the retrospective and exploratory design of the present study, imply that these results should be considered as hypothesis generators, and should be further evaluated in larger and adequately designed retrospective/prospective studies.

Original submitted 26 April 2011; Revision submitted 20 July 2011

KEYWORDS: clinical outcome • pancreatic cancer • polychemotherapeutic regimens • polymorphisms • toxicity

Pancreatic cancer remains a major unsolved health problem, representing the fourth leading cause of cancer-related death worldwide, with only 3% of patients alive 5 years after diagnosis [1].

More than 80% of patients present with advanced disease (i.e., locally-advanced/unresectable or metastatic) at diagnosis. The primary goals of treatment in this setting are survival prolongation and palliation; however, pancreatic cancer is notoriously resistant to systemic treatments. The first line agent gemcitabine has produced some clinical benefit; however, it yields a limited disease control, with less than 15% of patients progression-free at 6 months from diagnosis [2-3].

Several doublet combinations of chemotherapy and/or molecularly targeted agents, failed to improve overall survival (OS) [4]. A statistically significant OS benefit was obtained by adding erlotinib to gemcitabine; however, the small survival gain renders the clinical value of this combination disputable [5]. However, the recent PRODIGE/ACCORD Phase III randomized trial demonstrated that the combination of more

than two drugs (e.g., 5-fluorouracil (5-FU) + leucovorin + irinotecan + oxaliplatin) significantly improved progression-free-survival (PFS) and OS, compared with gemcitabine alone, in metastatic patients with normal bilirubin and good performance status (PS) [6].

In our previous multicenter randomized Phase III trial [7], we showed that a cisplatin-epirubicin-5-FU gemcitabine regimen (PEFG) obtained a more favorable outcome in terms of PFS at 4 months, as well as in response rate and OS. More patients treated with PEFG experienced severe hematological toxicity; however, the quality of life for patients assigned PEFG was at least equal to that for the gemcitabine group [8]. These findings were reproduced in subsequent series treated with similar combinations which had a better toxicity profile and were more suitable for clinical use, such as with the substitution of 5-FU with capecitabine (Xeloda®, PEXG), as well as the use of docetaxel (PDXG) or cisplatin-epirubicin intra-arterial infusion (EC-GemCap) [9,10]. Therefore, a large confirmatory trial exploring these regimens would be the best candidate

Elisa Giovannetti^{†1*}
Paola Pacetti^{2*} Michele
Reni^{3*} Leticia G Leon¹,
Andrea Mambrini²,
Enrico Vasile⁴, Michele
Ghidini³, Nicola Funel⁴,
Matteo Lucchesi⁴,
Stefano Cereda²,
Godefridus J Peters^{1#}
Maurizio Cantore^{2#}

¹Department of Medical Oncology, VU University Medical Center, Cancer Center Amsterdam, CCA room 1.42, De Boelelaan 1117, 1081HV Amsterdam, The Netherlands

²Carrara Civic Hospital, Piazza Sacco e Vanzetti, 54033 Carrara, Italy

³Istituto Scientifico San Raffaele, via Olgettina, 20132 Milan, Italy

⁴University of Pisa, via Roma 55, 56100 Pisa, Italy

[†]Author for correspondence:

Tel.: +31 204 442 633

Fax: +31 204 443 844

elisa.giovannetti@gmail.com

^{*}Authors contributed equally

[#]Authors contributed equally

future
medicine part of fsg

cornerstone for the addition of targeted therapies to further improve pancreatic cancer outcome appears worthwhile. Furthermore, identification of key factors that play a critical role in tumor chemosensitivity/resistance should offer room for optimization of these therapies by selecting patients with the highest likelihood of responding and minimizing useless and toxic treatments.

Several genetic and epigenetic alterations, such as gene mutations, amplification, polymorphic status or altered gene/protein expression, have been associated with gemcitabine resistance. Not surprisingly, these include determinants of gemcitabine transport, activity and metabolism, such as human equilibrative nucleoside transporter 1, ribonucleotide reductase subunit M1 (RRM1) and cytidine deaminase (CDA) [11–13], as well as critical pathways in survival and apoptosis [14–15].

Similarly, alterations in the pivotal factors of DNA repair systems: excision-repair cross-complementing group 1 (ERCC1), xeroderma pigmentosum group D (XPD) and x-ray-repair cross-complementing group-1 (XRCC1) influence the activity of platinum compounds, and have been associated with resistance toward gemcitabine/cisplatin/carboplatin combinations in non-small-cell lung cancer (NSCLC) [16,17].

Among the possible predictive factors of survival benefit to a specific treatment, germline polymorphisms have emerged as an attractive target, especially for advanced cancers, since their analysis can be much more easily performed in routine clinical setting than tumor mutational-analysis or gene-expression arrays [17].

Recent studies have reported significant associations between polymorphic status of drug metabolic/transport genes with toxicity and outcome in pancreatic cancer patients with locally advanced pancreatic cancer who have undergone gemcitabine-based chemoradiotherapy or patients with resectable pancreatic cancer treated with neoadjuvant gemcitabine-based chemotherapy and radiotherapy. Polymorphisms in mismatch repair, cell cycle or DNA-damage response genes were also associated with OS in pancreatic cancer patients treated with neoadjuvant gemcitabine-based chemotherapy and radiotherapy [18–22], while previous findings demonstrated correlations between polymorphisms in homologous recombination and other DNA repair genes in patients treated with neoadjuvant concurrent gemcitabine and radiotherapy with or without a component of induction gemcitabine/cisplatin [23,24]. Other studies demonstrated that NSCLC patients harboring the *ERCC1* C118C, *XPD* Asp312Asn/

Lys751Lys or *XRCC1* Arg399Arg genotypes had significantly longer OS after platinum combination chemotherapies [25,26]; however, a recent meta-analysis demonstrated that data on the predictive value of *ERCC1* and *XPD* polymorphisms in advanced NSCLC patients receiving platinum-based chemotherapy are inconclusive [27]. These conflicting results suggest that pharmacogenetic associations may not always be reproducible when explored in small-size studies, without standardized unbiased methods, as well as in different settings for tumor type, stage and treatment.

Therefore, in the present study we investigated whether functional polymorphisms in eight key genes involved metabolism, resistance mechanisms and drug activity, may affect the outcome of a homogeneous population of 122 stage III/IV pancreatic cancer patients who underwent upfront treatment with PEXG, PDXG or EC-GemCap (SUPPLEMENTARY TABLES 1–2; www.futuremedicine.com/doi/suppl/10.2217/pgs.11.109). The role of these polymorphisms was further explored by correlation with PFS and an additional analyses in 65 patients treated with single agent gemcitabine [11,28].

Patients & methods

■ Patients

This retrospective pharmacogenetic study included 187 chemotherapy naive patients with histologically confirmed locally advanced or metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma treated in three oncology units: Carrara Civil-Hospital (Carrara, Italy), S Raffaele Scientific Institute (Milan, Italy) and Pisa University Hospital (Pisa, Italy). Patients' characteristics and treatment details can be found in the SUPPLEMENTARY MATERIAL. The study was approved by the local Hospital Ethics Committees and conducted according to Good Clinical Practice Guidelines and with the World Medical Association Helsinki declaration.

■ Genotyping

DNA was isolated from blood samples shipped to the Laboratory Medical Oncology (VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands), as described previously [29]. Details of genetic variants and methods can be found in the SUPPLEMENTARY MATERIAL.

■ Statistics

The primary endpoint was to investigate the association between polymorphisms and OS, while secondary endpoints included correlations of polymorphisms with PFS or toxicity.

The Kaplan-Meier method was used to plot OS and PFS, and the log-rank test was used to compare curves. Demographic and clinical information were also compared across genotypes, using Pearson- χ^2 twosided test. The univariate analysis included different baseline demographic and clinical characteristics, such as gender, age, PS, clinical stage and CA19.9. Statistical analyses were performed grouping patients according to the three different genotypes for each polymorphism. Further analyses were performed: collapsing the homozygous and heterozygous genotypes when they had the same direction of effect (e.g., both had reduced/increased OS compared with the reference group); and combining variant alleles associated with worse outcome (i.e., 'risk-genotypes'). The significant prognostic variables in the univariate analysis were included in multivariate analyses, using Cox's proportional hazards model, using a step down procedure based on the likelihood ratio test, where hazard ratios (HR) were calculated to estimate the magnitude and the direction of the effect.

Data were analyzed using SPSS-17 software (SPSS Inc., IL, USA). All the analyses were

two-sided and $p < 0.05$ was considered statistically significant. Appropriate adjustment for multiple testing and the false-positive report probability (FPRP) of significant associations were performed according to Bonferroni correction and the Wacholder method [30]. Further details on statistics are provided in the

SUPPLEMENTARY MATERIAL.

Results

■ Clinical characteristics & outcome

TABLE 1 summarizes the clinical characteristics and their accordance with the outcome of 122 patients who had undergone upfront treatment with the PEXG, PDXG and ECGemCap regimens. No significant difference in any clinical feature was observed between patients treated with these regimens. Overall, median OS was 12.4 months (95% CI: 10.9–13.9). An age of over 65 years, female gender, PS status ≤ 80 , and stage IV were associated with significantly shorter OS. No significant differences in OS were observed for CA19.9 levels and for treatment with either epirubicin or docetaxel, underlying the homogeneity of chemotherapeutic regimens administered.

Table 1. Clinical outcome according to baseline characteristics and treatments of patients treated with the PEXG, PDXG and EC-GemCap regimens.

Characteristic	Patients n (%)	OS median mo. (95% CI)	p-value	PFS median mo. (95% CI)	p-value
All	122	12.4 (10.9–13.9)		8.9 (7.6–10.2)	
Age					
≤ 65	81 (66.4)	14.0 (10.9–17.0)	0.037	9.1 (7.9–10.3)	0.131
> 65	41 (33.6)	11.3 (10.6–12.0)		8.1 (6.3–9.8)	
Sex					
Male	75 (61.5)	11.9 (14.3–19.1)	0.018	8.7 (7.3–10.0)	0.035
Female	47 (38.5)	16.7 (10.8–13.0)		10.6 (9.2–11.9)	
PS					
≤ 80	34 (27.9)	11.2 (8.9–13.6)	0.014	7.8 (3.7–12.0)	0.005
> 80	88 (72.1)	13.3 (10.5–16.2)		9.1 (8.0–10.2)	
CA19.9					
$<$ median	61 (50.0)	12.6 (9.3–15.9)	0.142	9.8 (8.1–11.5)	0.017
$>$ median	61 (50.0)	12.2 (10.0–14.4)		7.8 (5.9–9.7)	
Clinical stage					
III	53 (43.4)	15.8 (12.5–19.1)	0.002	10.6 (9.5–11.7)	<0.001
IV	69 (56.6)	10.3 (8.8–11.8)		7.1 (5.6–8.6)	
Regimens including					
Epirubicine (PEXG/EC-GemCap)	89 (73.0)	12.2 (10.6–13.8)	0.240	8.8 (7.2–10.4)	0.126
Docetaxel (PDXG)	33 (27.0)	15.1 (8.9–21.2)		8.9 (6.5–11.3)	

CA19.9: ; EC-GemCap: ; .mo: Months; OS: Overall survival; PDXG: ; PEXG: ; PFS: Progression-free survival; PS: Performance status.

There were 102 deaths (event-rate of 83.6%), while 8 patients were alive without PD at last contact (June 2010).

■ Polymorphisms & survival

Genotyping was successfully performed in the vast majority of DNA samples (TABLE 2). No discrepancies were observed in the samples analyzed in duplicate (approximately 10%). All polymorphisms followed Hardy–Weinberg equilibrium and their allelic frequencies were comparable with those reported in previous studies in Caucasian populations and in NCBI and NCI-SNP500 databases [26]. Linkage disequilibrium (LD) analysis demonstrated moderate LD ($r^2 = 0.5528$) between the *XPB* Asp312Asn and *XPB* Lys751Gln polymorphisms, while no LD was detected between *CYP1B1* Leu432Val and *CYP1B1* Asn453Ser, as well as between *RRM1* A2462G and *RRM1* A2452G polymorphisms (FIGURE A1).

No significant correlations were detected between genotype frequencies and demographic/clinical characteristics or regimens, while variant alleles for *XPB* and *ERCC1* or *XRCC1* were not associated with one another (data not shown).

At univariate analysis, polymorphisms of DNA-repair genes were associated with differential OS. In particular, the variant genotypes of both *XPB* polymorphisms were associated with decreased survival. Significantly longer survival (15.1 months; 95% CI: 10.6–19.5) was observed in patients harboring the *XPB* Asp312Asp genotype, in comparison with patients carrying the *XPB* Asn312Asn genotype who had a median OS of 11.6 months (95% CI: 9.3–13.9), quite similar to the heterozygote OS of 11.2 months (95% CI: 9.5–13.0, $p = 0.041$). Similarly, patients with the *XPB* Gln751Gln genotype had a worse prognosis (10.3 months; 95% CI: 4.0–16.5) of median OS, than *XPB* Lys751Lys (15.1 months; 95% CI: 10.6–19.5) and *XPB* Lys751Gln (11.9 months; 95% CI: 10.2–13.6, $p = 0.004$; FIGURE 1A) patients.

Significant differences were also observed upon grouping patients carrying the *XPB* Lys751Lys + Lys751Gln (13.3 months; 95% CI: 10.9–15.7) versus *XPB* Gln751Gln patients ($p = 0.003$). Similarly, grouped *XPB* Asn312Asn + Asp312Asn (11.2 months; 95% CI: 9.9–12.6) had a significantly shorter OS than *XPB* Asp312Asp patients ($p = 0.008$; FIGURE 1B). Analysis of *ERCC1* C118C + C118T (median OS: 11.8 months; 95% CI: 10.4–13.4) versus *ERCC1* T118T patients (median OS: 13.3; 95% CI: 9.7–17.0) also resulted in a $p = 0.044$. Furthermore, median OS was 13.3 months (95% CI: 9.8–16.8) for carriers of the *XRCC1* Arg399Arg, and 11.8 months (95% CI: 9.0–13.4) for those with the *XRCC1* Arg399Gln + Gln399Gln genotype ($p = 0.036$).

Bonferroni adjusted p -values remained significant for *XPB*-Lys751Gln, but not for the other polymorphisms. However, we estimated the FPRP of *XPB* Lys751Gln, *XPB* Asp312Asn, *ERCC1* C118T and *XRCC1* Arg399Gln groups to be 0.002, 0.010, 0.049 and 0.038, respectively, indicating noteworthiness. Furthermore, in the multivariate analysis age > 65, PS \leq 80, stage IV (TABLE 3), but also *XPB* Gln751Gln and *XRCC1* Arg399Gln + Gln399Gln polymorphisms remained significant predictors for shorter survival, with an increased risk of death of 1.9 (95% CI: 1.3–2.9; $p = 0.003$) and 2.0 (95% CI: 1.1–3.7; $p = 0.030$), respectively.

Because *XPB*, *ERCC1* and *XRCC1* are all involved in DNA repair, we further explored the effect of combined risk genotypes on OS. These deleterious genotypes included *ERCC1* C118C + C118T, *XPB* Asn312Asn + Asp312Asn, *XPB* Gln751Gln and *XRCC1* Arg399Gln–Gln399Gln, all of which were related to shorter OS. These combinations were analyzed in 118 patients (patients not assessable for *XRCC1* Arg399Gln were excluded), and patients carrying more than two risk-genotypes had a significantly shorter OS (FIGURE 2A & 2B). A negative impact on OS was also observed in the multivariate model. Considering all the significant variables in the univariate analysis, the HR of patients ($n = 37$) with over two versus patients ($n = 81$) harbouring ≤ 2 risk-genotypes was 2.7 (95% CI: 1.8–4.2; $p < 0.001$).

■ Polymorphisms & toxicity

Of the 90 patients evaluable for toxicity, 86 patients (95.5%) developed haematological toxicity (i.e., anemia, neutropenia and/or thrombocytopenia), whereas 87 (85.5%) experienced vomiting, nausea, diarrhea, weakness, stomatitis, hand–foot syndrome and/or hepatic toxicity. According to previous analyses [29], patients were grouped as patients without versus with toxicity as well as patients without severe toxicity (grade: 0–2) versus those with severe toxicity (grade: 3–4).

No significant correlations were observed between any polymorphism analysed and toxicity (SUPPLEMENTARY TABLE 3).

■ Polymorphisms & PFS

As a secondary endpoint of the study we also evaluated differences in PFS (TABLE 2), and the *XPB* Gln751Gln genotype (FIGURE 1C & 1D) was associated with a significantly increased risk of progression (HR: 2.1; 95% CI: 1.2–3.5; $p = 0.008$; TABLE 3).

Table 2. Clinical outcome according to polymorphisms.

Polymorphism	Genotype	Patients n (%)	HWE p-value	OS mo. (95% CI)	p-value	PFS mo. (95% CI)	p-value
<i>ERCC1</i>	CC	21 (17.2)	0.955	11.9 (9.6–14.2)	0.111	8.9 (8.3–9.5)	0.346
C118T	CT	54 (44.3)		11.3 (9.4–13.2)		8.1 (5.4–10.7)	
	TT	47 (38.5)		13.3 (9.7–17.0)		9.5 (5.4–13.6)	
	CC+CT	75 (61.5)		11.8 (10.4–13.4)	0.044 [†]	9.0 (7.1–10.8)	0.149
<i>XPD</i>	AspAsp	44 (36.1)	0.879	15.1 (10.8–19.4)	0.010	10.0 (8.0–12.0)	0.172
Asp312Asn	AspAsn	61 (50.0)		11.2 (9.5–13.0)		8.7 (7.4–9.9)	
	AsnAsn	17 (13.9)		11.6 (9.3–13.9)		8.2 (4.5–11.8)	
	AsnAsn+AspAsn	78 (63.9)		11.2 (9.9–12.6)	0.008 [†]	8.2 (7.0–9.3)	0.080
<i>XPD</i>	LysLys	54 (44.6)	0.650	15.1 (10.6–19.5)	0.004 [†]	10.0 (8.2–11.9)	0.062
Lys751Gln	LysGln	50 (41.4)		12.9 (10.2–13.6)		8.7 (6.5–10.8)	
	GlnGln	17 (14.0)		10.3 (4.0–16.5)		6.8 (4.4–9.2)	
	LysLys+LysGln	104 (86.0)		13.3 (10.9–15.7)	0.003 [†]	9.6 (8.6–10.6)	0.045 [†]
<i>XRCC1</i>	ArgArg	66 (55.9)	0.574	13.3 (9.8–16.8)	0.078	9.5 (8.4–10.5)	0.098
Arg399Gln	ArgGln	39 (33.1)		11.2 (9.2–13.1)		8.7 (4.5–8.9)	
	GlnGln	13 (11.0)		12.2 (8.3–16.1)		6.7 (4.5–8.9)	
	GlnGln+ArgGln	52 (44.1)		11.8 (9.0–13.4)	0.036 [†]	8.0 (6.4–9.5)	0.079
<i>ABCB1</i>	CC	32 (26.5)	0.703	11.2 (7.9–14.4)	0.079	8.8 (7.2–10.5)	0.258
C3435T	CT	65 (53.7)		15.0 (12.0–18.0)		8.9 (7.0–10.9)	
	TT	24 (19.8)		11.0 (9.2–12.7)		8.8 (6.3–11.4)	
	CC+CT	97 (80.2)		13.3 (10.6–16.0)	0.165	8.9 (7.5–10.3)	0.298
<i>CYP1B1</i>	LeuLeu	16 (13.2)	0.830	12.3 (9.1–15.4)	0.972	7.8 (4.4–11.39)	0.984
Leu432Val	LeuVal	53 (43.4)		13.1 (11.0–14.3)		9.5 (8.4–10.6)	
	ValVal	53 (43.4)		12.2 (10.1–14.3)		8.8 (6.6–11.1)	
	LeuLeu+LeuVal	69 (56.6)		13.1 (11.4–14.8)	0.884	9.1 (7.9–10.3)	0.911
<i>CYP1B1</i>	AsnAsn	75 (62.0)	0.970	13.0 (10.5–15.2)	0.633	8.9 (7.3–10.5)	0.753
Asn453Ser	AsnSer	41 (33.9)		12.2 (8.4–16.0)		8.2 (6.2–10.1)	
	SerSer	5 (4.1)		11.0 (6.5–15.5)		10.7 (2.9–18.6)	
	SerSer+AsnSer	46 (38.0)		11.9 (8.5–15.3)	0.444	8.2 (5.9–10.4)	0.460
<i>CDA</i>	AA	39 (32.2)	0.658	12.6 (9.8–15.3)	0.658	8.8 (6.6–11.0)	0.588
A79C	AC	64 (52.9)		12.3 (8.4–18.2)		8.9 (7.0–10.9)	
	CC	18 (14.9)		13.3 (8.4–18.2)		9.5 (7.3–11.6)	
	CC+AC	82 (67.8)		12.4 (10.2–14.7)	0.118	8.9 (7.3–10.5)	0.315
<i>RRM1</i>	AA	98 (80.4)	0.994	12.3 (10.2–14.4)	0.331*	8.9 (7.9–9.9)	0.861*
A2464G	AG+GG	24 (19.6)		12.4 (10.4–14.4)		7.6 (4.8–10.3)	
<i>RRM1</i>	AA	29 (23.8)	0.633	12.3 (10.3–14.3)	0.763	9.5 (6.1–12.8)	0.807
A2542G	AG	55 (45.1)		13.4 (9.7–17.1)		8.9 (7.2–10.7)	
	GG	38 (31.1)		10.9 (5.3–16.4)		8.8 (6.6–11.0)	
	AA+AG	84 (68.9)		12.4 (11.0–13.9)	0.994	8.8 (6.6–11.0)	0.540
<i>TSER</i>	2R2R	25 (20.5)	0.937	11.9 (7.4–16.5)	0.672	9.0 (6.1–11.9)	0.332
	2R3R	40 (32.8)		12.4 (9.8–15.1)		8.1 (6.4–9.7)	
	3R3R	57 (46.7)		12.6 (10.5–14.7)		9.7 (8.4–11.0)	
	3R3R+2R3R	97 (79.5)		12.6 (11.0–14.2)	0.541	8.9 (7.5–10.4)	0.470

HWE: Hardy–Weinberg equilibrium; mo: Months; OS: Overall survival; PFS: Progression-free survival; Pts: patients.
The median follow-up time for living patients was 25.0 months (range: 7.3–45.4 months).
Genotyping for *ERCC1* C118T, *XPD* Asp312Asn, *CYP1B1* Leu432Val, *RRM1* A2464G and *RRM1* A2542G was successfully performed in all the available samples, while a total of 121 out of the 122 patients were evaluable for *XPD* Lys751Gln, *ABCB1* C3435T, *CYP1B1* Asn453Ser and *CDA* A79C, and 118 out of the 122 patients for *XRCC1* Arg399Gln.
*Only one patient harbored the *RRM1* G2464G genotype, and the log-rank p-values were calculated for AA versus AG-GG.
[†]Significant p-values.

■ Polymorphisms & outcome in gemcitabine monotherapy-treated patients

Patients (n = 65) treated with gemcitabine monotherapy were considered for an exploratory analysis to endorse the hypothesis of the

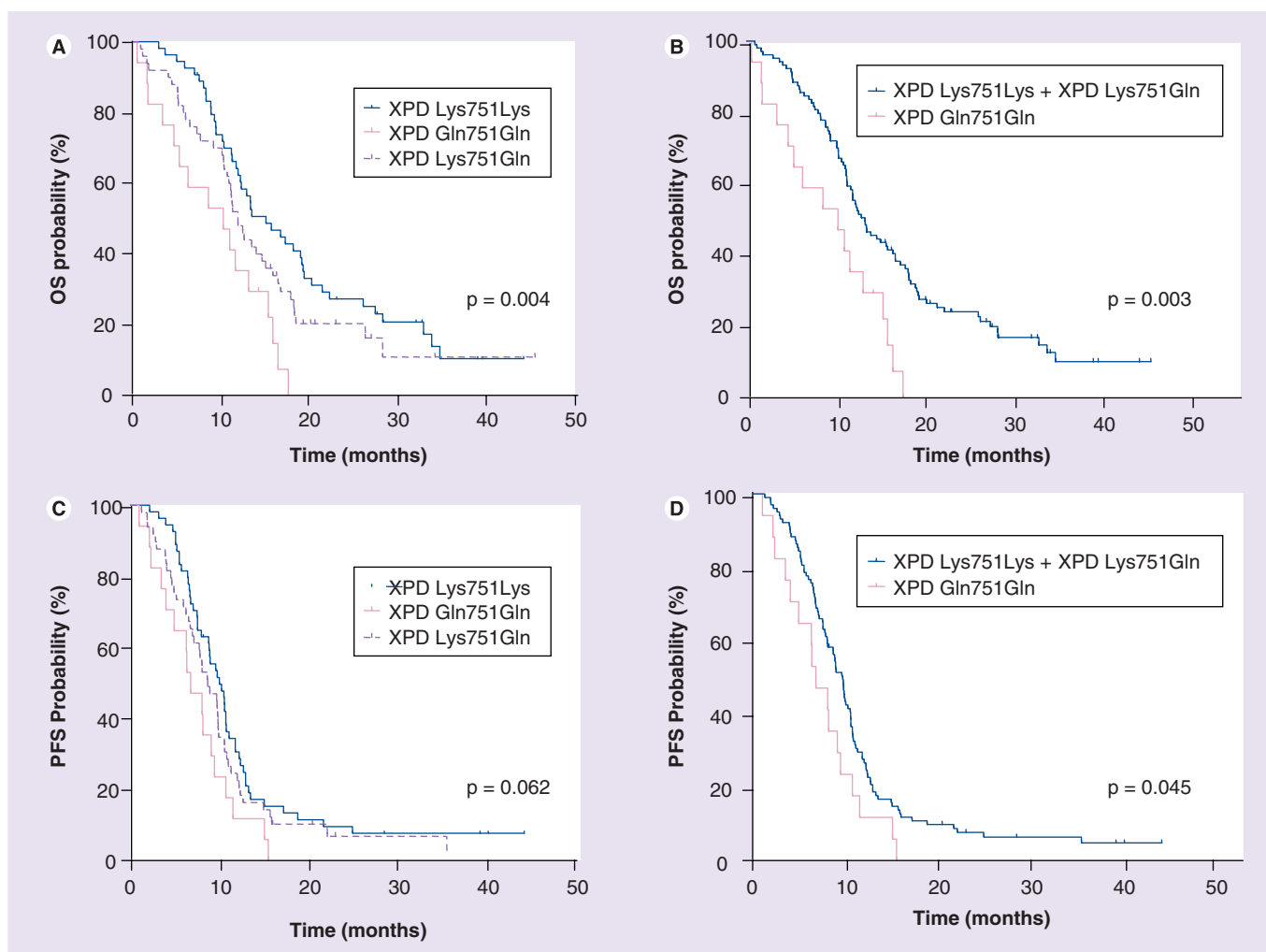


Figure 1. Kaplan-Meier curves of OS (A-B) and PFS (C-D) according to *XPD* Lys751Lys, *XPD* Lys751Gln or *XPD* Gln751Gln and *XPD* Lys751Lys-Lys751Gln or *XPD* Gln751Gln polymorphisms, respectively. p-values were calculated with the log-rank test. OS: Overall survival; PFS: Progression-free survival.

specific value of DNA-repair polymorphisms in patients treated with platinum-based regimens. Although the purpose of this analysis was not to perform a case-control study, we compared the baseline demographic characteristics of these groups. No data on CA19.9 were available; however, no significant differences were measured for age, gender, PS and clinical stage across the series (SUPPLEMENTARY TABLE 4). *ERCC1*, *XPD* and *XRCC1* polymorphisms were detectable in all of these patients, and their allelic frequencies were similar to those in PEXG/PDXG/EC-GemCap-treated patients ($p > 0.05$ in all the Pearson- χ^2 tests). No significant differences were reported in OS and PFS (data not shown) for *XPD* Gln751Gln as well as for the other genotypes (TABLE 4).

The interaction test between *XPD* Lys751Gln variants and treatment effect, including the platinum-containing polychemotherapy and

the gemcitabine monotherapy groups, suggested that the relation of *XPD* Gln751Gln genotype with poor outcome was significantly associated with the effect of polychemotherapy in terms of both PFS and OS ($p < 0.01$) (SUPPLEMENTARY TABLE 5). However, only 65 patients were treated with gemcitabine-monotherapy, the cohorts' inception was retrospective, and patients were not randomized whether receiving the platinum-containing regimens or not. Therefore, the significance of the interaction test is affected by several limitations, including the nonrandomization bias.

Discussion

This study evaluated the impact of functional polymorphisms on outcome in advanced pancreatic cancer patients and, to our knowledge, is the first to demonstrate the association of selected polymorphisms in DNA-repair genes with the

OS and PFS of patients treated within the three homogeneous polychemotherapeutic regimens PEXG, PDXG and EC-GemCap.

Over the past few years there has been an increase in the use of gemcitabine platinum combinations in the treatment of pancreatic cancer [4]. Although Phase III trials failed to demonstrate any improvement for gemcitabine cisplatin combination [31,32], our previous studies have demonstrated that cisplatin/gemcitabine-based 4-drug regimen obtained a more favourable outcome than gemcitabine monotherapy [7]. The choice of such combinations was based on the lack of overlapping dose-limiting toxicities and results of experiments against pancreatic cancer cells [33]. In particular, the synergism between gemcitabine and cisplatin appeared to be mainly dependent on an increase in platinum-adduct formation possibly related to changes caused by gemcitabine incorporation into DNA [34,35].

However, platinum-based therapies have two critical drawbacks: drug resistance and toxicity, and the four drugs combinations which might amplify the toxic effects of the single agents. Therefore, this study was aimed to identify patients who could benefit most from such therapies on the basis of pharmacogenetic information.

Resistance to chemotherapy is multifactorial; however, DNA repair plays a key role in platinum activity. Platinum compounds inhibit cell proliferation by damaging DNA through the formation of intra/inter-strand crosslinks. Therefore, platinum resistance occurs mostly owing to detoxification or efficient repair of DNA by the nucleotide excision repair (NER) and base-excision repair systems (BER). ERCC1, XPD and XRCC1 are major components of these systems and have been related to platinum function. In particular, a low ERCC1 tumor expression was associated with better outcome to adjuvant cisplatin-based chemotherapy in NSCLC patients and with improved response/survival of colorectal cancer patients treated with oxaliplatin [16,36]. However, tissue samples are not available for most advanced pancreatic cancers, while the analysis of polymorphisms can be easily performed in blood, and several clinical data has demonstrated a correlation between ERCC1 C118T, XPD Asp312Asn/Lys751Gln and/or XRCC1 Arg399Gln polymorphisms and outcome in various cancer types [24–26,37–42]. A recent pharmacogenetic study within a Phase II trial of gemcitabine and cisplatin in metastatic breast cancer patients also reported that carriers

Table 3. Factors associated with OS and PFS in the multivariate analysis.

Characteristic/polymorphism	Multivariate analysis			
	Hazard ratio (95% CI)	df	p-value	
OS				
Age	≤ 65	1.0 (ref)	1	0.022
	> 65	2.0 (1.3–3.2)		
Sex	Male	1.6 (0.9–2.6)	1	0.057
	Female	1.0 (ref)		
PS	≤ 80	1.8 (1.1–2.8)	1	0.014
	> 80	1.0 (ref)		
Stage	III	1.0 (ref)	1	0.001
	IV	2.0 (1.3–3.2)		
ERCC1 C118T	CC-TT	1.2 (0.7–1.8)	1	0.500
	TT	1.0 (ref)		
XPD Asp312Asn	AspAsp	1.0 (ref)	1	0.137
	AspAsn+AsnAsn	1.4 (0.9–2.4)		
XPD Lys751Gln	LysLys+LysGln	1.0 (ref)	1	0.003
	GlnGln	1.9 (1.3–2.9)		
XRCC1 Arg399Gln	ArgArg	1.0 (ref)	1	0.030
	GlnGln+ArgGln	2.0 (1.1–3.7)		
PFS				
Sex	Male	1.3 (0.9–2.0)	1	0.161
	Female	1.0 (ref)		
CA19.9	≤ median	1.0 (ref)	1	0.058
	> median	1.4 (1.0–2.1)		
Stage	III	1.0 (ref)	1	0.001
	IV	1.9 (1.3–2.9)		
XPD Lys751Gln	LysLys+LysGln	1.0 (ref)	1	0.008
	GlnGln	2.1 (1.2–3.5)		

CA19.9; df: Degrees of freedom; OS: Overall survival; PFS: Progression-free survival, PS: Performance status; Ref: Reference.

of the XPD Gln751Gln genotype had significantly shorter OS and PFS [43]. We observed similar results in our uniform population of 122 pancreatic cancer patients treated with PEXG, PDXG or EC-GemCap regimens. XPD Gln751Gln genotype was associated with shorter OS. Carriers of the ERCC1 C118C + C118T, XPD Asp312Asn + Asn312Asn and XRCC1 Arg399Gln + Gln399Gln had also shorter OS. At multivariate analysis, only the XPD Gln751Gln and XRCC1 Arg399Gln polymorphisms remained independent predictive parameters of death risk. This might be explained on the basis of a weaker effect of ERCC1 C118T and XPD Asp312Asn variants with respect to XPD Lys751Gln, but also because of the existing LD, however incomplete, between the two XPD loci [26,27]. However, when more than two unfavorable genotypes are present, the adverse effect is also observed in the multivariate analysis,

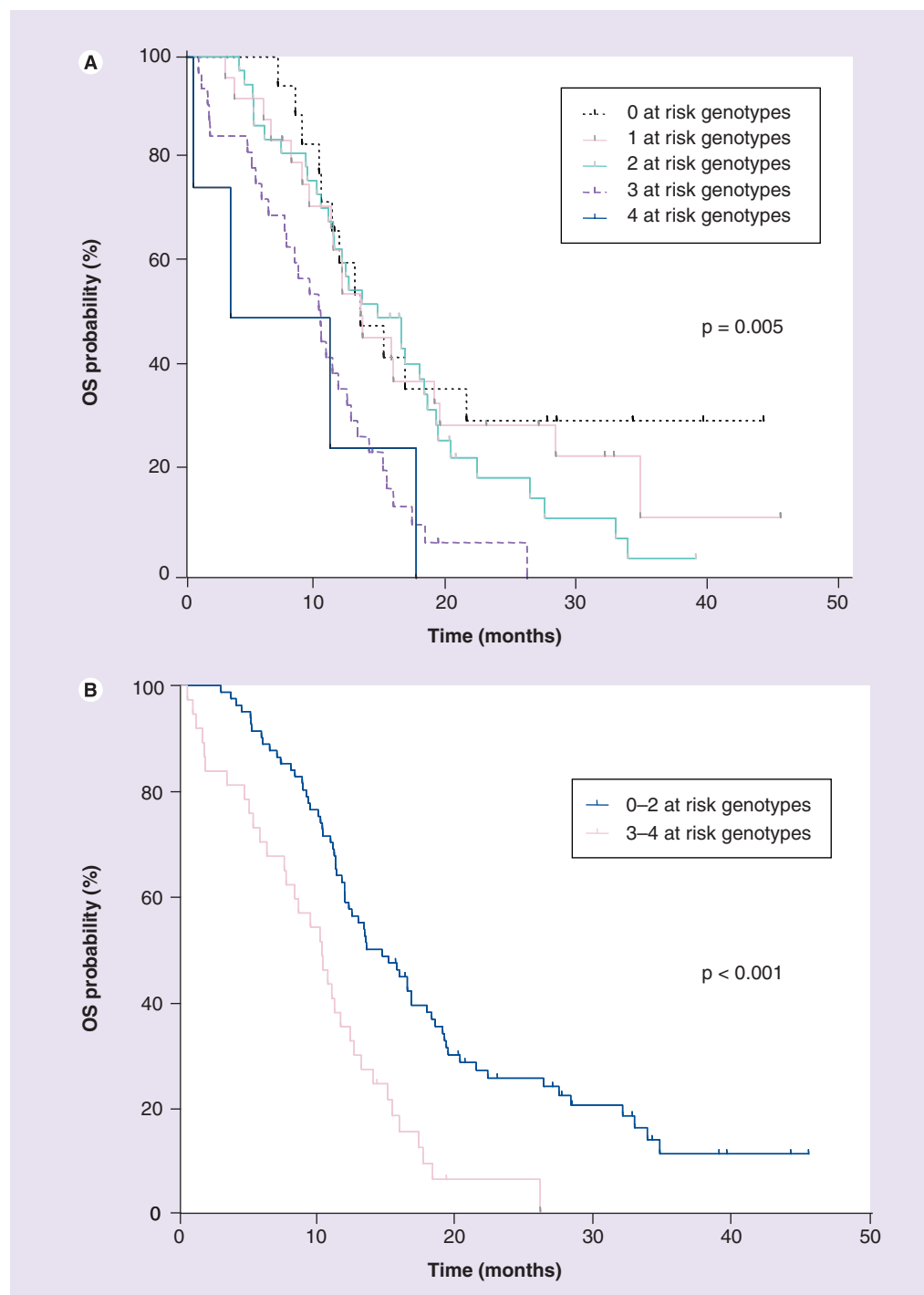


Figure 2. OS Kaplan-Meier curves of combined risk genotypes (A-B). The number of 0–4 indicates the number of risk genotypes (e.g., *ERCC1* C118C+C118T, *XPB* Asn312Asn + Asp312Asn, *XPB* Gln751Gln and *XRCC1* Arg399Gln-Gln399Gln), which were analyzed in 118 patients (patients not assessable for *XRCC1* Arg399Gln were excluded). Patients carrying over two risk genotypes had a significantly ($p < 0.001$) shorter OS (e.g., 10.3 months; 95% CI: 7.8–12.8), than patients with one to two risk genotypes (13.5 months; 95% CI: 10.2–16.7) (FIGURE 2B). p -values were calculated with the log rank test.

suggesting that these genes act in concert and their combination may be more helpful for the identification subgroups of patients who gain the least benefit from our four-drug regimens.

In contrast, although all of the polymorphisms

included in the present study have been demonstrated to have functional significance or be related with drug activity in previous studies, no other polymorphism was significantly related to survival [18,25–27,44,45]. These controversial results

might be explained by a small sample size, lack of multivariate analysis or correction for multiple testing, and different tumor types and clinical settings, as reported previously [46]. Findings in patients with early disease treated with adjuvant chemotherapy may not be confirmed in patients treated with first- or second-line chemotherapy for metastatic disease. Tumor progression is a dynamic process, while the polymorphic germline status is a static portrait whose clinical impact may be more or less influenced by the accumulating genetic changes in the tumor cells.

A major strength of the present study is that it was performed on patients from multicenter series who were all treated with upfront chemotherapy. The results of the FPRP test are of note. Moreover, of the alleles that demonstrated a positive association in this study, the minor allele frequency in a random Caucasian population is frequent, ranging from 18–33%. Thus, these findings might be relevant to a large number of patients.

Conversely, the main limitations of this study included the relatively modest sample size, the possible confounding influence of four drug combinations on the treatment–SNP effects, and the retrospective explorative single-arm study design. In particular, although OS in pancreatic cancer is a valid outcome to assess the response to treatment and evaluate possible predictive markers, the planning of randomized studies with a control arm of patients treated with other regimens and the comparison of the survival stratified by genotype would be the only way to establish the predictive role of selected pharmacogenetic biomarkers, as described in the recent seminal review by Stingl Kirchheiner and Brockmüller [47]. These future trials should follow standardized study design and include appropriate power calculations of the sample size for the specific pharmacogenetic factors, in order to have adequate statistical power.

However, the results of the present study might also be important to hypothesize the biological significance of selected DNA-repair polymorphisms in this specific clinical setting. In particular, our data are in agreement with the results of Lunn and colleagues which reported the association between *XPD* Lys751Lys and suboptimal DNA-repair capacity [48]. Therefore, it is possible that a deficient *XPD* function might confer a higher sensitivity to genotoxic stress; thus eliciting a better response to cytotoxic therapy [49]. However, there are still controversies regarding which genotypes confer decreased DNA-repair activity, and although the different carcinogens/

Table 4. Clinical outcome according to *ERCC1*, *XPD* and *XRCC1* polymorphisms in patients treated with gemcitabine alone.

Polymorphism	Genotype	Patients n (%)	OS mo. (95% CI)	p-value
All		65	7.7 (6.7–8.6)	
<i>ERCC1</i>	CC	18 (27.7)	8.4 (7.2–9.7)	0.35
C118T	CT	27 (41.5)	6.9 (5.7–8.1)	
	TT	20 (30.8)	7.1 (5.7–8.1)	
	CC+CT	45 (54.2)	7.7 (5.9–9.6)	0.68
<i>XPD</i>	AspAsp	25 (38.5)	11.2 (5.6–16.9)	0.17
Asp312Asn	AspAsn	27 (41.5)	6.5 (5.1–8.0)	
	AsnAsn	13 (20.0)	8.5 (3.7–13.2)	
	AsnAsn+AspAsn	38 (61.5)	7.1 (6.2–8.1)	0.50
<i>XPD</i>	LysLys	26 (40.0)	8.4 (4.3–12.6)	0.47
Lys751Gln	LysGln	26 (40.0)	6.5 (4.9–8.1)	
	GlnGln	13 (20.0)	7.8 (1.9–13.7)	
	LysLys+LysGln	52 (80.0)	7.5 (6.5–8.5)	0.74
<i>XRCC1</i>	ArgArg	28 (43.1)	7.2 (3.9–10.4)	0.34
Arg399Gln	ArgGln	25 (38.5)	9.4 (5.2–13.7)	
	GlnGln	12 (18.4)	6.9 (6.2–7.6)	
	GlnGln+ArgGln	37 (56.9)	8.4 (5.6–11.2)	0.32

Genotyping was successfully performed in all the available blood samples. The event rate was 91% and the median follow-up time for living patients was 25.0 months (range: 7.3–45.4 months). mo.: Months; OS: Overall survival.

genotoxic compounds could explain some differences, previous studies have demonstrated that *XPD* Asn312Asn and *XPD* Gln751Gln alleles are associated with increased risk for smoking-related pancreatic cancer [50,51]. Functional studies to link altered protein function and cellular phenotype/chemoresistance with the presence of *XPD* Gln751Gln genotype in pancreatic cancer are warranted, and it is tempting to speculate that *XPD* may play a specific role in the mechanisms involved in the repair of DNA damage induced by the specific combination of gemcitabine with platinum compounds [22,34,35].

The mechanisms responsible for the repair of gemcitabine-induced DNA damage are also not yet completely clarified, and we performed further analyses in patients treated upfront with gemcitabine alone. Although we are aware of the small sample size, the lack of correlation between polymorphisms and survival in these platinum-naïve patients suggested that the NER and BER systems do not affect the repair of gemcitabine-induced DNA damage, in agreement with results from previous studies in pancreatic cancer patients treated with neoadjuvant gemcitabine and radiotherapy [24].

Our results also raise concerns regarding polymorphisms predictive of toxicity. Previous studies reported significant correlation between the *CDA* A79C polymorphism and hematological

toxicity in NSCLC and pancreatic cancer patients treated with gemcitabine-based chemotherapy [18,52,53]. These discordances might be attributable to the different description/analysis of toxicity data. In addition, no significant correlations between toxicity and the polymorphisms in DNA-repair genes associated with OS were observed. These results might be explained by the availability of toxicity data only from a subgroup of patients (n = 90), as well as by the few severe adverse events occurring in our population. Indeed, the toxicity reported in our patients confirmed the manageability of our polychemotherapeutic combinations in the first-line setting of advanced pancreatic cancer [7–10].

Conclusion

Polymorphisms of DNA-repair genes were already associated with outcome in other tumor types [25,26]; however, this is the first evidence demonstrating their predictive role in pancreatic cancer patients treated with polychemotherapeutic regimens. Since pancreatic cancer is such a dismal disease, any biomarker that can help to better stratify patients might have crucial clinical applications. Ultimately, the validation of the role of these polymorphisms in larger

retrospective studies and in prospective trials will offer new tools for optimization of currently available treatments in selected patients.

Acknowledgements

This work has been previously presented at the 2010 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO): Pacetti P, Giovannetti E, Reni M et al. Significant association between DNA repair polymorphisms and survival in pancreatic cancer patients treated with combination chemotherapy. ASCO Annual Meeting, IL, USA, 6 June 2010. J. Clin. Oncol. 28, 15s, 2010 (suppl; abstract 4098).

Financial & competing interests disclosure

Elisa Giovannetti would like to thank the Netherlands Organisation for Scientific Research (NWO) for the VENI grant. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate

Executive summary

- Pancreatic cancer is a major unsolved health problem, and identification of key factors that play a critical role in tumor chemosensitivity/resistance should offer room for treatment optimization by selecting patients with the highest likelihood of responding and minimizing useless and toxic regimens.
- The polychemotherapeutic regimens cisplatin-epirubicin-capecitabine-gemcitabine (PEXG), cisplatin-docetaxel-capecitabine-gemcitabine (PDGX), and gemcitabine-capecitabine plus epirubicin-cisplatin intra-arterial infusion (EC-GemCap) improved outcome, compared with gemcitabine, in advanced/metastatic pancreatic cancer.
- Single nucleotide polymorphisms (SNP) in key genes might have an important impact on metabolism, resistance mechanisms, and drug's activity, and, subsequently, on clinical outcome.
- The aim of the current study was to evaluate the correlation between these candidate polymorphisms and clinical outcome in PEXG/PDXG/EC-GemCap-treated advanced/metastatic pancreatic cancer patients.

Pharmacogenetics of DNA-repair genes in PDAC patients

- Patients carrying XPD-Gln751Gln, XPD-Asp312Asn+Asn312Asn or XRCC1-Arg399Gln+Gln399Gln genotype had a worse prognosis.
- A strong combined genotype effect was observed: patients with 0-to-2 and 3-to-4 risk-genotypes had median OS of 13.5 and 10.3 months, respectively (P<0.001).
- XPD-Gln751Gln (HR=1.9, P=0.003) as well as combination of >2 risk-genotypes (HR=2.7, P<0.001), emerged as independent predictors for death-risk at multivariate analysis.
- No associations were found between these polymorphisms and PFS or OS in patients treated with gemcitabine monotherapy, suggesting their role only for platinum-based regimens.

Conclusion & future perspective

- The results of the present study demonstrated a strong association between the XPD-Lys751Gln polymorphism and the combination of selected DNA-repair genes with PFS and OS, suggesting that these pharmacogenetic markers should be considered to optimize pancreatic cancer treatment.
- Polymorphisms of DNA-repair genes were already associated with outcome in other tumor types, but this is the first evidence about their role in pancreatic cancer patients treated with polychemotherapeutic regimens.
- Since pancreatic cancer is such a dismal disease, any biomarker that can help to better stratify patients might have crucial clinical applications.
- Hopefully, these biomarkers will be further validated in larger retrospective studies and then in prospective studies and used to select pancreatic cancer patients to be treated with polychemotherapy regimens in the near future.

institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as:

▪ of interest

▪▪ of considerable interest

- 1 Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 60, 277–300 (2010).
- 2 Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet* 363, 1049–1057 (2004).
- 3 Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J *et al.* Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 15, 2403–2413 (1997).
- 4 Stathis A, Moore MJ. Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7, 163–172 (2010).
- 5 Moore MJ, Goldstein D, Hamm J *et al.* Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a Phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol.* 25, 1960–1966 (2007).
- 6 Conroy T, Desseigne F, Ychou M *et al.* FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* 364, 1817–1825 (2011).
- **The first study to demonstrate that the combination of 5-fluorouracil, leucovorin, irinotecan and oxaliplatin (FOLFIRINOX) is a first-line option for patients with metastatic pancreatic cancer who are younger than 76 years of age and who have a good performance status (i.e., ECOG 0 or 1), no cardiac ischemia and normal or nearly normal bilirubin levels.**
- 7 Reni M, Cordio S, Milandri C *et al.* Gemcitabine versus cisplatin, epirubicin, fluorouracil, and gemcitabine in advanced pancreatic cancer: a randomised controlled multicentre Phase III trial. *Lancet Oncol.* 6, 369–376 (2005).
- **The first study to demonstrate the activity of cisplatin/epirubicin/fluorouracil/gemcitabine regimen in advanced pancreatic cancer.**
- 8 Reni M, Bonetto E, Cordio S *et al.* Quality of life assessment in advanced pancreatic adenocarcinoma: results from a Phase III randomized trial. *Pancreatol.* 6, 454–463 (2006).
- 9 Cereda S, Rognone A, Ghidini M *et al.* A randomized Phase II trial of two different four-drug combinations in advanced pancreatic adenocarcinoma: cisplatin, capecitabine, gemcitabine plus either epirubicin or docetaxel. *J. Clin. Oncol.* 27, 15s (Suppl., abstract 4614) (2009).
- 10 Mambrini A, Pacetti P, Del Frio A *et al.* Gemcitabine–capecitabine plus intra-arterial epirubicin–cisplatin in pretreated pancreatic cancer patients: a Phase I study. *Anticancer Res.* 29, 1547–1549 (2009).
- 11 Giovannetti E, Del Tacca M, Mey V *et al.* Transcription analysis of human equilibrative nucleoside transporter-1 predicts survival in pancreas cancer patients treated with gemcitabine. *Cancer Res.* 66, 3928–3935 (2006).
- 12 Nakahira S, Nakamori S, Tsujie M *et al.* Involvement of ribonucleotide reductase M1 subunit overexpression in gemcitabine resistance of human pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* 120, 1355–1363 (2007).
- 13 Nakano Y, Tanno S, Koizumi K *et al.* Gemcitabine chemoresistance and molecular markers associated with gemcitabine transport and metabolism in human pancreatic cancer cells. *Br. J. Cancer* 96, 457–463 (2007).
- **A comprehensive review on molecular markers associated with gemcitabine transport and metabolism.**
- 14 Giovannetti E, Mey V, Nannizzi S, Pasqualetti G, Del Tacca M, Danesi R. Pharmacogenetics of anticancer drug sensitivity in pancreatic cancer. *Mol. Cancer Ther.* 5, 1387–1395 (2006).
- 15 Kim MP, Gallick GE. Gemcitabine resistance in pancreatic cancer: picking the key players. *Clin. Cancer Res.* 14, 1284–1285 (2008).
- 16 Olausson KA, Dunant A, Fouret P *et al.* DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N. Engl. J. Med.* 355, 983–991 (2006).
- 17 Danesi R, Pasqualetti G, Giovannetti E *et al.* Pharmacogenomics in non-small-cell lung cancer chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 408–417 (2009).
- 18 Tanaka M, Javle M, Dong X, Eng C, Abbruzzese JL, Li D. Gemcitabine metabolic and transporter gene polymorphisms are associated with drug toxicity and efficacy in patients with locally advanced pancreatic cancer. *Cancer* 116, 5325–5335 (2010).
- 19 Okazaki T, Javle M, Tanaka M, Abbruzzese JL, Li D. Single nucleotide polymorphisms of gemcitabine metabolic genes and pancreatic cancer survival and drug toxicity. *Clin. Cancer Res.* 16, 320–329 (2010).
- 20 Dong X, Jiao L, Li Y *et al.* Significant associations of mismatch repair gene polymorphisms with clinical outcome of pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* 27, 1592–1599 (2009).
- 21 Chen J, Li D, Killary AM *et al.* Polymorphisms of *p16*, *p27*, *p73*, and *MDM2* modulate response and survival of pancreatic cancer patients treated with preoperative chemoradiation. *Ann. Surg. Oncol.* 16, 431–439 (2009).
- 22 Okazaki T, Jiao L, Chang P, Evans DB, Abbruzzese JL, Li D. Single-nucleotide polymorphisms of DNA damage response genes are associated with overall survival in patients with pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 2042–2048 (2008).
- 23 Li D, Liu H, Jiao L *et al.* Significant effect of homologous recombination DNA repair gene polymorphisms on pancreatic cancer survival. *Cancer Res.* 66, 3323–3330 (2006).
- 24 Li D, Frazier M, Evans DB *et al.* Single nucleotide polymorphisms of *RecQ1*, *RAD54L*, and *ATM* genes are associated with reduced survival of pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* 24, 1720–1728 (2006).
- 25 Ryu JS, Hong YC, Han HS *et al.* Association between polymorphisms of *ERCC1* and *XPB* and survival in non-small-cell lung cancer patients treated with cisplatin combination chemotherapy. *Lung Cancer* 44, 311–316 (2004).
- 26 Gurubhagavatula S, Liu G, Park S *et al.* *XPB* and *XRCC1* genetic polymorphisms are prognostic factors in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with platinum chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 22, 2594–2601 (2004).
- **An important study to demonstrate the role of DNA repair genes polymorphisms in the anticancer effect of platinum chemotherapy.**
- 27 Wei SZ, Zhan P, Shi MQ *et al.* Predictive value of *ERCC1* and *XPB* polymorphism in patients with advanced non-small cell lung cancer receiving platinum-based chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *Med. Oncol.* 28, 315–321 (2011).
- 28 Giovannetti E, Funel N, Peters GJ *et al.* MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity. *Cancer Res.* 70, 4528–4538 (2010).
- 29 Giovannetti E, Zucali PA, Peters GJ *et al.* Association of polymorphisms in *AKT1* and *EGFR* with clinical outcome and toxicity in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Mol. Cancer Ther.* 9, 581–593

- (2010).
- 30 Wacholder S, Chanock S, Garcia-Closas M, El Ghormli L, Rothman N. Assessing the probability that a positive report is false: an approach for molecular epidemiology studies. *J. Natl Cancer Inst.* 96, 434–442 (2004).
- 31 Heinemann V, Quietzsch D, Gieseler F *et al.* Randomized Phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer. *J. Clin. Oncol.* 24, 3946–3952 (2006).
- 32 Colucci G Labianca R, Di Costanzo F *et al.* Randomized Phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with single-agent gemcitabine as first-line treatment of patients with advanced pancreatic cancer: the GIP-1 study. *J. Clin. Oncol.* 28, 1645–1651 (2010).
- 33 Peters GJ, van der Wilt CL, van Moorsel CJ, Kroep JR, Bergman AM, Ackland SP. Basis for effective combination cancer chemotherapy with antimetabolites. *Pharmacol. Ther.* 87, 227–253 (2000).
- 34 Peters GJ, Bergman AM, Ruiz van Haperen VW, Veerman G, Kuiper CM, Braakhuis BJ. Interaction between cisplatin and gemcitabine *in vitro* and *in vivo*. *Semin. Oncol.* 22(4 Suppl. 11), 72–79 (1995).
- 35 Bergman AM, Ruiz van Haperen VW, Veerman G, Kuiper CM, Peters GJ. Synergistic interaction between cisplatin and gemcitabine *in vitro*. *Clin. Cancer Res.* 2, 521–530 (1996).
- **An important study demonstrating the mechanisms underlying the synergistic interaction between gemcitabine and cisplatin.**
- 36 Lord RV, Brabender J, Gandara D *et al.* Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 8, 2286–2291 (2002).
- 37 Park DJ, Zhang W, Stoecklacher J *et al.* ERCC1 gene polymorphism as a predictor for clinical outcome in advanced colorectal cancer patients treated with platinum-based chemotherapy. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 1, 162–166 (2003).
- 38 Stoecklacher J, Park DJ, Zhang W *et al.* A multivariate analysis of genomic polymorphisms: prediction of clinical outcome to 5-FU/oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 91, 344–354 (2004).
- 39 Viguiet J, Boige V, Miquel C *et al.* ERCC1 codon 118 polymorphism is a predictive factor for the tumour response to oxaliplatin/5-fluorouracil combination chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 6212–6217 (2005).
- 40 Isla D, Sarries C, Rosell R *et al.* Single nucleotide polymorphisms and outcome in docetaxel-cisplatin-treated advanced non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 15, 1194–1203 (2004).
- 41 Allan JM, Smith AG, Wheatley K *et al.* Genetic variation in XPD predicts treatment outcome and risk of acute myeloid leukemia following chemotherapy. *Blood* 104, 3872–3877 (2004).
- 42 Gu J, Zhao H, Dinney CP *et al.* Nucleotide excision repair gene polymorphisms and recurrence after treatment for superficial bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* 11, 1408–1415 (2005).
- 43 Chew HW, Doroshow JH, Frankel P *et al.* Phase II studies of gemcitabine and cisplatin in heavily and minimally pretreated metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 13, 2163–2169 (2009).
- 44 Sissung TM, Danesi R, Price KM *et al.* Association of the CYP1B1*3 allele with survival in patients with prostate cancer receiving docetaxel. *Mol. Cancer Ther.* 1, 19–26 (2008).
- 45 Park DJ, Stoecklacher J, Zhang W, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ. Thymidylate synthase gene polymorphism predicts response to capecitabine in advanced colorectal cancer. *Int. J. Colorectal Dis.* 17, 46–49 (2002).
- 46 Marsh S, Paul J, King CR, Gifford G, McLeod HL, Brown R. Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome after platinum plus taxane chemotherapy in ovarian cancer: the Scottish Randomised Trial in Ovarian Cancer. *J. Clin. Oncol.* 25, 4528–4535 (2007).
- 47 Stingl Kirchheiner JC, Brockmüller J. Why, when, and how should pharmacogenetics be applied in clinical studies?: current and future approaches to study designs. *Clin. Pharmacol. Ther.* 89, 198–209 (2011).
- 48 Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R *et al.* XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis (Lond.)* 21, 551–555 (2000).
- 49 Wei Q, Frazier ML, Levin B. DNA repair: a double-edged sword. *J. Natl Cancer Inst.* 92, 440–441 (2000).
- 50 McWilliams RR, Bamlet WR, Cunningham JM *et al.* Polymorphisms in DNA repair genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk. *Cancer Res.* 68, 4928–4935 (2008).
- 51 Duell EJ, Bracci PM, Moore JH, Burk RD, Kelsey KT, Holly EA. Detecting pathway-based gene-gene and gene-environment interactions in pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17, 1470–1479 (2008).
- 52 Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E *et al.* Correlation of CDA, ERCC1, and XPD polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 14, 1797–1803 (2008).
- 53 Farrell JJ, Bae K, Wong J, Guha C, Dicker AP, Elsaleh H. Cytidine deaminase single-nucleotide polymorphism is predictive of toxicity from gemcitabine in patients with pancreatic cancer. RTOG 9704. *Pharmacogenomics J.* DOI: 10.1038/tpj.2011.22 (2011) (Epub ahead of print).