

**Influències clíniques i ambientals
en la prevalença de mutacions en l'oncogèn K-ras
en pacients amb adenocarcinoma ductal de pàncrees**

TESI DOCTORAL
MARTA CROUS BOU

Tesi Doctoral

Influències clíniques i ambientals
en la prevalença de mutacions en l'oncogèn *K-ras*
en pacients amb adenocarcinoma ductal de pàncrees

Marta Crous Bou

Barcelona, 2009

Tesi Doctoral

Influències clíniques i ambientals
en la prevalença de mutacions en l'oncogèn *K-ras*
en pacients amb adenocarcinoma ductal de pàncrees

Marta Crous Bou
Grup de Recerca en Epidemiologia Clínica i Molecular del Càncer
Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM-Hospital del Mar)
CIBER de Epidemiología y Salud Pública
Universitat Autònoma de Barcelona

Director: Dr. Miquel Porta Serra
Cap del Grup de Recerca en Epidemiologia Clínica i Molecular del Càncer
Institut Municipal d'Investigació Mèdica
Catedràtic de Medicina Preventiva i Salut Pública
Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Pediatria, d'Obstetrícia i Ginecologia i de Medicina Preventiva
Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, 2009

A tots i totes els que m'estimo.
I a tots i totes els que heu lluitat, i els que seguïu fent-ho,
per superar aquesta malaltia.

AGRAÏMENTS

Els dies passen, sovint més de pressa del que voldries, i el període de realització de la tesi acaba sent una etapa divertida, apassionant, intensa, i alhora dura, difícil, llarga, complicada... com la vida! Però, tot i els dubtes i entrebancs, segueixes endavant, perquè tens la sort d'estar envoltat de gent que t'estima i et recolza, sense els quals et seria impossible continuar. Segurament necessitaria molt espai per agrair com es mereixen a totes les persones que, d'una manera o altra, m'han ajudat en aquesta etapa, només espero no deixar-me'n cap i, si és així, perdoneu-me per endavant!

En primer lloc, voldria deixar constància del meu profund agraïment i, sobretot admiració, per a totes aquelles persones, pacients i familiars, participants en aquest estudi i en tants altres que es fan, per acceptar participar-hi en un moment tan delicat de la seva vida, probablement el pitjor moment. Sense aquestes persones seria impossible fer aquesta recerca i poder avançar en el coneixement del càncer. A tots i totes, moltes gràcies!

Al Dr. Miquel Porta, director d'aquesta tesi, per donar-me l'oportunitat d'incorporar-me al seu grup de recerca. Vaig passar de donar classes de genètica i estudiar evolució de gens i filogènies en peixos, a treballar en epidemiologia molecular del càncer, i això va suposar tot un repte per una biòloga com jo. Per deixar-me ficar en una feina on prèviament hi havien posat tant esforç tantes persones, i alhora tan desconeguda per mi, però que m'entusiasmava. Per la seva confiança i per donar-me l'oportunitat de conèixer persones que, de ben segur, seran decisives pel meu futur professional. Perquè el seu gran coneixement, i alhora la seva enorme exigència, m'han ensenyat a ser "millor científica" i m'han ajudat a entendre que el món de la recerca és complicat, dur, competitiu, moltes vegades molt més difícil del que havia imaginat, però que, tot i això, és el que m'agrada i al que vull dedicar-me. Moltes gràcies per tot Miquel!

A totes les persones que van participar, d'una manera o altra, en l'estudi PANKRAS II des del seu inici i fins avui: en el disseny de l'estudi, el treball de camp, la recol·lecció de mostres i de dades, l'anàlisi de les mateixes, etc. A tots els que heu passat abans per la unitat i aplanat el camí perquè els que venim al darrere ho tinguem més fàcil i puguem aprendre del que ja heu fet vosaltres. Especialment a en Joan Alguacil i la Núria Malats, que m'han ajudat i escoltat quan ho he necessitat, i que han respost molt amablement a tots els meus correus electrònics i trucades, quan em perdia i costava trobar-se.

A tots els coautors dels articles que formen el nucli de la tesi, als que conec i als que no, per la feina feta i per les vostres aportacions i comentaris als manuscrits a l'hora de donar-hi forma.

A la fundació IMIM i al CIBERESP perquè han estat els responsables que a final de mes rebés una beca primer o un contracte després, i així pogués finançar les meves anades i vingudes a la Ciutat Comtal. I perquè m'han permès fer la meva contribució al manteniment dels peatges i a una RENFE que funciona amb tanta puntualitat.

To Immaculata De Vivo and other colleagues from the Channing Laboratory and the Harvard School of Public Health for their warmly welcome during my stage. Immaculata, thanks for giving me the opportunity to go to Boston and collaborate with you and your team in your projects, to help me in my own work from Barcelona, and to keep telling me so many times that you want me to collaborate with you (It's a pleasure to hear this). I hope to see you soon!

A tots els que us ha "tocat" llegir la tesi abans de presentar-la, perquè reconec que us he posat en un compromís i que fa molta mandra que et demanin una cosa així. Sort que hi ha confiança i heu tingut la paciència de fer-ho, sense queixar-vos massa, i fins i tot heu

fet veure que us feia il·lusió! Amics de dins i fora la feina, professionals o no, família... els comentaris sempre són benvinguts i tothom hi ha dit la seva: Eli, Sílvia, Eva, Laura, Dr Amado, Dr Ricart, Joan Alguacil, Michelle Méndez, Cristiane Murta, Sergi, Anna, Mare... gràcies a tots! Especialment a la Cris, perquè no només va oferir-se a llegir-la sinó que tot els seus comentaris han estat molt útils i pràctics, i perquè, juntament amb la Michelle, m'esteu "internacionalitzant" de mica en mica, i perquè parlar amb vosaltres sempre és agradable i ajuda força a "relativitzar". I al Dr Wifredo Ricart, per revisar la tesi encara que fos com un favor, per ser aquell "algú amb criteri" i pels seus valuosos consells i aportacions que han fet que la tesi millorés moltíssim. Per rebrem amablement tantes vegades com ha calgut i per donar-me ànims i confiança en la feina feta. Moltes gràcies!

A tots els companys i companyes de la URECMC & friends, els que hi sou encara i els que heu passat per aquí, que en 4 anys ha donat per força! Als que treballem plegats dia a dia i als que treballeu en altres unitats però que compartim les estones de "relax". Els cafès, el gimnàs, les xerradetes i la terrasseta ajuden més del que us penseu en els moments de crisi, que no han estat pocs, gràcies a totes i tots. Especialment, a la Isa, per fer el camí més fàcil des del primer dia que vaig entrar per la porta de l'antic edifici IMIM. A la Sílvia per fer el mateix al PRBB, per ser un suport incondicional i desfer-se en atencions per qualsevol cosa que necessites. A en Tomàs, per presidir un "comitè d'apostes" que encara no ens ha arruïnat del tot i per ser el meu "estadístic de capçalera"; per deixar-me atabalar-lo tant com he volgut i ensenyar-me gairebé tot el que ara sé sobre "l'apassionant món de l'estadística". I, juntament amb en Jose, perquè mentre era a Boston, vaig estar pendents de mi i de les meves baralles amb l'SPSS donant-me un cop de mà sempre que ho necessitava. Gràcies per la paciència i per l'ajuda nois! A l'Eva, perquè treballant plegades n'he après moltíssim i per totes les seves crítiques, sempre constructives. A les meves noves companyes de despatx, les "súpernenes", gràcies per deixar-me formar part del vostre món, ha estat molt divertit compartir aquesta etapa amb vosaltres... sort de les rialles que ajuden a relativitzar els moments pre i post-reunió, sovint estressants! I com no, a la Betty i a l'Eli, les "geishes" i co-presidentes del "comitè de festes i esdeveniments", per fer-me riure tantes vegades, per ajudar-me a ser una mica menys seria, pels ànims, la confiança, el bon humor, per l'agradable companyia de l'Eli quan érem lluny de casa, per les hores de teràpia de psicòloga d'urgència de la Betty (i gratis!); i perquè les alegries i les dificultats d'aquests 4 anys han fet que es convertissin, mica en mica, en bones amigues a més de companyes de feina.

Als ex-companys del LIG de la Universitat de Girona, on vaig fer la meva "primera tesi", especialment a la Rosa i a la Sandra, perquè no m'oblido que no és la primera vegada que passo per això (tot i que la pel·lícula sembla que, per sort, aquest cop acaba diferent) i vosaltres em vaig fer costat en aquella etapa. Perquè seguim en contacte, i això sempre és agradable.

Als meus amics, la colla "biogirona, 1996-2000", ostres quants anys fa ja! A l'Anna, la Gemma, l'Isaac, l'Ivan, en Jordi, la Laura, la Núria, la Sara, la Rosa, la Txell i en Xevi. També a tots els respectius i respectives que són, en part, els responsables de la dispersió de la colla arreu de la geografia catalana, ja tenim seus a Mollerussa i Tàrrrega, al Montseny i les Guilleries, la Selva, l'Empordà i el Maresme, el Delta de la Tordera i del Llobregat i, fins i tot, a l'Aragó! Per tots els moments que després de tants anys, i tot i les distàncies, encara compartim: els sopars de Nadal, de fires, de festa major (sembla que qualsevol excusa és bona), els focs de Blanes, els dinars i piscines a casa la Gemma, les excursions, els viatgets, els blogs, les cases rurals per celebrar que fa anys que ens coneixem... i ara fins i tot els casaments i naixements. I perquè després de tants anys seguïu sent la meva colla! Especialment a l'Isaac, perquè ja fa molts anys que compartim aquesta "extranya afició" de fer d'investigadors i això ens ha donat moltes hores de conversa; i perquè sap que per mi sempre serà especial. A l'Ivan i en Vicenç, perquè són

uns pesats i m'obliguen a quedar els caps de setmana, encara que tingui feina; i perquè m'han deixat apadrinar la punky que, a més, és una excusa per deixar el meu costat "pijo" a casa i anar al "Melic del Delta" a veure els avanços de l'hort i de pas recollir algun enciam ecològic i quatre ous de gallines felices de tant en tant! I a la Laura, perquè juntament amb aquells dos hi sou per distreure'm (o el que faci falta) sempre que us necessito. Perquè és tot el que es pot demanar d'una amiga, perquè ens hem fet costat sempre que ho hem necessitat, perquè s'hi pot parlar de qualsevol cosa, per aguantar-me el rotllo, per animar-me encara que fos ella qui més ho necessitava... han estat uns anys difícils, però, tot i això, m'ha contagiats l'entusiasme i ha fet que no perdés la il·lusió per fer la feina que t'agrada. Moltes gràcies, ja ho saps!

A en Joan, per "complicar-me la vida" tantes vegades, sempre amb la millor de les intencions i acompanyat d'una bona dosi d'aquest cinisme i ironia que sovint m'encén, però que trobaria a faltar si no hi fos! Per fer-me riure i per desviure's, preocupar-se, ajudar-me i estimar-me com ho fa. Per fer que em reafirmi en pensar com n'és d'important conèixer, aprendre, estudiar... encara que només siguin "espurnes". Perquè és especial; i per presentar-me al meu "bell i vell" company de viatge!

I finalment, però el més important, a la meva família: als meus pares, la meva germana, la meva àvia, els meus cosins, cosines i cosinets, oncles i ties... a tots! Per la vostra paciència i el suport incondicional durant tot aquest temps. Amb tot plegat ja fa 8 anys que vaig acabar la carrera i dedicar-te a aquesta feina a vegades costa d'entendre (fins i tot un mateix moltes vegades s'ha d'autoconvèncer); les hores d'estudi, les beques, el sou, la inestabilitat laboral, la incertesa, els horaris inacabables, els moments de crisi... tot plegat no ajuda gaire a l'hora d'explicar-los a què et dediques. De tota manera, tinc molta sort de la família que m'ha tocat perquè, tot i preguntar-me sovint quan acabava la tesi i què faria després (coi de preguntetes...), han entès perfectament que estic fent el que m'agrada i que això és el més important! Per fi la meva àvia, a qui tant agrada que treballi a Barcelona per tenir excusa per venir amb el meu pare a dinar i passejar a aquesta ciutat que la té enamorada, tindrà algunes respostes. Al meu pare, pel seu suport incondicional en tota aquesta etapa i per l'ajuda (també econòmica) sense la qual hauria estat impossible viure de fer el que m'agrada. Especialment, vull donar les gràcies a la meva germana, per maquetar la tesi i per la portada, ha quedat genial, no esperava menys de tu. Perquè em té admirada per com sempre dóna cap a tot, i va al 200%, com aquell que res; per trobar-me a faltar quan sóc fora, i muntar-me festetes quan torno. Per deixar-me fer de germana gran ara que és fora de casa, per les converses que tenim ara, després de tants anys, i per preocupar-se per mi i estimar-me com ho fa, tot i els problemes que li va donar el meu Rh (sap greu)! A més, la poca diferència d'edat fa que en tots els meus records ella sempre hi sigui i això ajuda molt a aprendre a compartir, és un sol de germaneta! I, per extensió, a en Diego, pel seu sentit de l'humor i pels ànims de qui sap què és passar per tot això. I molt especialment, a la meva mare, per ser un model amb majúscules d'absolutament tot. Per tantes coses que necessitaria pàgines i pàgines per explicar-ho i, segurament, encara me'n deixaria. Perquè, tot i repetir-me mil vegades que d'això no n'entén, ha estat la meva primera i més fidel "lectora". Perquè sempre ha cregut en mi, perquè m'ha ajudat i recolzat en qualsevol moment de la meva vida, perquè sempre hem pogut parlar (i ha escoltat i aguantat estoicament la meva xerrera inacabable, i una mica precoç), perquè no hi ha hagut mai distància entre nosaltres i perquè m'ha ensenyat a respectar i a estimar (encara que sigui "lo normal"). Per fer-me com sóc i deixar-me assemblar a ella, ni que sigui una mica!

A totes i tots, moltes gràcies!

PRESENTACIÓ

La tesi que presentem a continuació es basa en un recull d'articles científics, resultants del treball realitzat els darrers 4 anys en el Grup de Recerca en Epidemiologia Clínica i Molecular del Càncer (GRECMC), de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM-Hospital del Mar).

Ens va semblar adient estructurar la tesi i els seus continguts de la següent manera: en primer lloc, una introducció general al tema de recerca, seguit per les hipòtesis i els objectius que ens vam plantejar a l'inici i els aspectes més rellevants de la metodologia comuna als diferents treballs. En segon lloc, un capítol de resultats on s'inclouen els articles científics, que formen el nucli de la tesi; cadascun d'ells va precedir d'un breu resum del contingut i de les principals troballes de l'article corresponent. En tercer lloc, una discussió general, en la qual hem aprofundit en les troballes dels diferents estudis que formen el nucli de la tesi, evitant repetir el contingut dels propis articles, i les conclusions dels diferents treballs. I finalment, les referències bibliogràfiques; aquesta bibliografia és complementària a la que apareix citada als articles.

Els quatre articles científics que formen el nucli de la tesi s'emmarquen dins l'estudi PANKRAS II (Estudi multicèntric prospectiu sobre el paper de les mutacions en el gen *K-ras* i altres alteracions genètiques en el diagnòstic, pronòstic i etiologia del càncer de pàncrees i altres patologies pancreàtico-biliars). Els Investigadors Principals de l'estudi són els Drs Miquel Porta i Francisco X. Real, i la Coordinadora General, la Dra Núria Malats. La resta d'investigadors es presenta en l'Annex 1.

A note about English language in this thesis: the core of the thesis includes four scientific papers in English. While the rest of the thesis is written in Catalan, some contents have been translated into English: the index, which includes titles of tables and figures; the abstract; the annex 2; and tables in annex 3.

ÍNDEX GENERAL

Resum	1
Abstract	3
Llista d'abreviacions	5
Introducció general	7
Hipòtesis i objectius	21
Metodologia general	25
Resultats	37
Discussió general	97
Conclusions	107
Bibliografia	109
Annexes	125

GENERAL INDEX

Resum	1
Abstract	3
List of abbreviations	5
General introduction	7
Hypotheses & aims	21
General methodology	25
Results	37
General discussion	97
Conclusions	107
References	109
Annexes	125

ÍNDIX DETALLAT

CAPÍTOL 1: INTRODUCCIÓ GENERAL	7
1.1. Factors clínics, ambientals i genètics relacionats amb l'etiologia de l'adenocarcinoma ductal de pàncrees	8
1.1.1. Consum de tabac	9
1.1.2. Consum d'alcohol	10
1.1.3. Antecedents patològics	10
1.1.4. Polimorfismes genètics	11
1.2. Origen de les mutacions en l'oncogèn <i>K-ras</i> en l'adenocarcinoma ductal de pàncrees	11
CAPÍTOL 2: HIPÒTESIS I OBJECTIUS	21
2.1. Hipòtesis	21
2.2. Objectiu general	23
2.3. Objectius específics	23
CAPÍTOL 3: METODOLOGIA GENERAL	25
3.1. L'estudi PANKRAS II	25
3.2. Selecció de pacients	26
3.3. Informació clínico-patològica i entrevistes als pacients	29
3.4. Anàlisis moleculars	31
3.4.1. Detecció de mutacions en l'oncogèn <i>K-ras</i>	32
3.4.2. Identificació de polimorfismes en el gen <i>CYP1B1</i>	34
3.5. Anàlisis estadístiques	35

CAPÍTOL 4: RESULTATS	37
4.1. Article 1: Consum de tabac i mutacions en l'oncògen K-ras en pacients amb adenocarcinoma ductal de pàncrees	39
4.1.1. Resum	39
4.1.2. Principals troballes	40
Crous-Bou M, Porta M, López T, Jariod M, Malats N, Alguacil J, Morales E, Fernàndez E, Corominas JM, Carrato A, Guarner L, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Lifetime history of tobacco consumption and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. <i>Pancreas</i> 2007; 35: 135-141	41
4.2. Article 2: Polimorfismes en el gen <i>CYP1B1</i> i mutacions en l'oncògen K-ras en pacients amb adenocarcinoma ductal de pàncrees	51
4.2.1. Resum	51
4.2.2. Principals troballes	52
Crous-Bou M, De Vivo I, Porta M, Pumarega JA, López T, Alguacil J, Morales E, Malats N, Rifà J, Hunter DJ, Real FX for the PANKRAS II Study Group. <i>CYP1B1</i> polymorphisms and K-ras mutations in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. <i>Digestive Diseases and Sciences</i> 2008; 53: 1417-1421	53
4.3. Article 3: Antecedents patològics i mutacions en l'oncògen K-ras en pacients amb adenocarcinoma ductal de pàncrees	61
4.3.1. Resum	61
4.3.2. Principals troballes	62
Crous-Bou M, Porta M, Morales E, López T, Carrato A, Puigdomènech E, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Past medical conditions and K-ras mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma. <i>Cancer Causes and Control</i> 2009; 20 (en premsa)	63

4.4. Article 4: Consum d'alcohol i mutacions en l'oncogèn K-ras en pacients amb adenocarcinoma ductal de pàncrees	75
4.4.1. Resum	75
4.4.2. Principals troballes	76
Crous-Bou M, Porta M, López T, Jariod M, Malats N, Morales E, Guarner L, Rifà J, Carrato A, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Lifetime history of alcohol consumption and K-ras mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma. <i>Environmental and Molecular Mutagenesis</i> 2009; 50 (en premsa)	77
 CAPÍTOL 5: DISCUSSIÓ GENERAL	 97
5.1. Principals troballes	97
5.2. Fortaleses i limitacions de l'estudi	104
 CAPÍTOL 6: CONCLUSIONS	 107
 CAPÍTOL 7: BIBLIOGRAFIA	 109

ANNEXES

Annex 1. Llistat de publicacions derivades dels estudis PANKRAS I i II	125
Annex 2. Grups diagnòstics dels pacients de l'estudi PANKRAS II	131
Annex 3. Comparació dels pacients inclosos i exclosos en les diferents anàlisis	133
- Taula 1. Comparació de les característiques dels casos d'adenocarcinoma ductal de pàncrees amb i sense entrevista completa	135
- Taula 2. Comparació de les característiques dels casos d'adenocarcinoma ductal de pàncrees amb i sense les mutacions en l'oncogèn K- <i>ras</i> determinades	139
- Taula 3. Comparació de les característiques dels casos d'adenocarcinoma ductal de pàncrees amb i sense extracció de sang	143
- Taula 4. Comparació de les característiques dels casos d'adenocarcinoma ductal de pàncrees inclosos i exclosos en les anàlisis de l'associació entre consum de tabac i alcohol i mutacions en l'oncogèn K- <i>ras</i>	147
- Taula 5. Comparació de les característiques dels casos d'adenocarcinoma ductal de pàncrees inclosos i exclosos en les anàlisis de l'associació entre antecedents patològics i mutacions en l'oncogèn K- <i>ras</i>	151
- Taula 6. Comparació de les característiques dels casos d'adenocarcinoma ductal de pàncrees inclosos i exclosos en les anàlisis de l'associació entre polimorfismes en el gen <i>CYP1B1</i> i mutacions en l'oncogèn K- <i>ras</i>	155
- Taula 7. Comparació de les característiques dels casos d'adenocarcinoma ductal de pàncrees amb i sense mutacions en l'oncogèn a K- <i>ras</i>	159
Annex 4. Projectes de recerca del GRECMC durant el període de realització de la tesi	163
Annex 5. <i>Curriculum Vitae</i>	169
- Currículum en anglès (versió breu)	169
- Currículum en català (versió completa)	171

ÍNDEX DE TAULES I FIGURES

Taules

- Les grans xifres del càncer en general, i del càncer de pàncrees en particular, a Catalunya	8
- Característiques principals dels estudis que han analitzat la relació entre la prevalença de mutacions en l'oncogèn <i>K-ras</i> i el consum de tabac, el consum d'alcohol i els antecedents patològics, en l'adenocarcinoma ductal de pàncrees en humans.....	20
- Consum de tabac en els casos d'adenocarcinoma ductal de pàncrees amb i sense mutacions en el codó 12 de l'oncogèn <i>K-ras</i>	45
- Comparació del consum de tabac entre els controls hospitalaris, tots els casos d'adenocarcinoma ductal de pàncrees, els casos amb el gen <i>K-ras</i> mutat i els casos sense la mutació.....	47
- Freqüències genotípiques dels al·lels m1 i m2 en els casos d'adenocarcinoma ductal de pàncrees amb i sense mutacions al codó 12 de l'oncogèn <i>K-ras</i> , i en els controls hospitalaris.....	57
- Relació entre els polimorfismes als al·lels m1 i m2 del gen <i>CYP1B1</i> i la freqüència de mutacions en l'oncogèn <i>K-ras</i> , en pacients amb adenocarcinoma ductal de pàncrees	57
- Antecedents mèdics de pancreatitis en pacients amb adenocarcinoma ductal de pàncrees, amb i sense mutacions en l'oncogèn <i>K-ras</i>	68
- Història de diabetis mellitus en els casos d'adenocarcinoma ductal de pàncrees, amb i sense mutacions en l'oncogèn <i>K-ras</i>	69
- Antecedents de malalties digestives i al·lèrgies en pacients amb adenocarcinoma ductal de pàncrees, amb i sense mutacions en l'oncogèn <i>K-ras</i>	71
- Consum d'alcohol en els casos d'adenocarcinoma ductal de pàncrees amb i sense mutacions en el codó 12 de l'oncogèn <i>K-ras</i>	93

- Tipus d'alcohol que consumeixen els pacients amb adenocarcinoma ductal de pàncrees amb i sense mutacions en el codó 12 de l'oncogèn <i>K-ras</i>	94
--	----

Figures

- Mecanismes d'actuació dels carcinògens al llarg del procés de desenvolupament del càncer	13
- Model de progressió i alteracions genètiques característiques de l'adenocarcinoma ductal de pàncrees	15
- Coneixements establerts i incògnites: diagrama sobre les possibles influències de factors clínics, ambientals i genètics en la prevalença de mutacions en l'oncogèn <i>K-ras</i> en l'adenocarcinoma ductal de pàncrees	17
- Nombre de casos inclosos en cadascuna de les anàlisis realitzades	28
- Disponibilitat i obtenció de mostres parafinades per la determinació de mutacions en l'oncogèn <i>K-ras</i> en pacients amb adenocarcinoma ductal de pàncrees	33
- Consum de tabac en casos d'adenocarcinoma ductal de pàncrees amb i sense mutació en l'oncogèn <i>K-ras</i>	46
- Durada de la diabetis mellitus abans del diagnòstic de l'adenocarcinoma ductal de pàncrees en els casos amb i sense mutacions en l'oncogèn <i>K-ras</i>	70
- Associació entre el consum d'alcohol i les mutacions en l'oncogèn <i>K-ras</i> en diferents períodes de la vida dels pacients abans del diagnòstic de l'adenocarcinoma ductal de pàncrees	95
- Associació entre el consum d'alcohol i les mutacions en l'oncogèn <i>K-ras</i> en pacients d'adenocarcinoma ductal de pàncrees, en funció de l'edat del pacient	95

DETAILED INDEX

CHAPTER 1: GENERAL INTRODUCTION	7
1.1. Clinical, environmental and genetic factors in the etiology of pancreatic ductal adenocarcinoma	8
1.1.1. Tobacco smoking	9
1.1.2. Alcohol consumption	10
1.1.3. Medical history	10
1.1.4. Genetic polymorphisms.....	11
1.2. Etiology of <i>K-ras</i> mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma	11
CHAPTER 2: HYPOTHESES AND AIMS	21
2.1. Hypotheses.....	21
2.2. General aim	23
2.3. Specific aims	23
CHAPTER 3: GENERAL METHODOLOGY	25
3.1. The PANKRAS II study	25
3.2. Selection of patients	26
3.3. Clinico-pathological information and personal interviews to patients	29
3.4. Molecular analysis	31
3.4.1. Detection of <i>K-ras</i> mutations	32
3.4.2. Identification of <i>CYP1B1</i> genetic polimorphisms	34
3.5. Statistical analysis	35

CHAPTER 4: RESULTS	37
4.1. Paper 1: Tobacco consumption and K- <i>ras</i> mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma	39
4.1.1. Abstract.....	39
4.1.2. Main findings	40
Crous-Bou M, Porta M, López T, Jariod M, Malats N, Alguacil J, Morales E, Fernández E, Corominas JM, Carrato A, Guarner L, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Lifetime history of tobacco consumption and K- <i>ras</i> mutations in exocrine pancreatic cancer. <i>Pancreas</i> 2007; 35: 135-141	41
4.2. Paper 2: <i>CYP1B1</i> polymorphisms and K- <i>ras</i> mutations in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma	51
4.2.1. Abstract	51
4.2.2. Main findings	52
Crous-Bou M, De Vivo I, Porta M, Pumarega JA, López T, Alguacil J, Morales E, Malats N, Rifà J, Hunter DJ, Real FX for the PANKRAS II Study Group. <i>CYP1B1</i> polymorphisms and K- <i>ras</i> mutations in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. <i>Digestive Diseases and Sciences</i> 2008; 53: 1417-1421	53
4.3. Paper 3: Past medical conditions and K- <i>ras</i> mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma.....	61
4.3.1. Resum	61
4.3.2. Principals troballes	62
Crous-Bou M, Porta M, Morales E, López T, Carrato A, Puigdomènech E, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Past medical conditions and K- <i>ras</i> mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma. <i>Cancer Causes and Control</i> 2009; 20 (In press)	63

4.4. Article 4: Consum d'alcohol i mutacions en l'oncogèn K-ras en pacients amb adenocarcinoma ductal de pàncrees	75
4.4.1. Resum	75
4.4.2. Principals troballes	76
Crous-Bou M, Porta M, López T, Jariod M, Malats N, Morales E, Guarner L, Rifà J, Carrato A, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Lifetime history of alcohol consumption and K-ras mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma. <i>Environmental and Molecular Mutagenesis</i> 2009; 50 (In press)	77
CHAPTER 5: GENERAL DISCUSSION	97
5.1. Main findings	97
5.2. Strengths and limitations of the study	104
CHAPTER 6: CONCLUSIONS	107
CHAPTER 7: REFERENCES	109

ANNEXES

Annex 1. List of publications from the PANKRAS I and II Studies	125
Annex 2. Diagnostic group of patients from the PANKRAS II Study	131
Annex 3. Comparisons between groups of patients included and excluded from each analysis	133
- Table 1. Characteristics of pancreatic cancer cases with and without complete interview	135
- Table 2. Characteristics of pancreatic cancer cases with and without K- <i>ras</i> determined.....	139
- Table 3. Characteristics of pancreatic cancer cases with and without blood extraction	143
- Table 4. Characteristics of pancreatic cancer cases with and without epidemiological information from patient interviews and K- <i>ras</i> determined	147
- Table 5. Characteristics of pancreatic cancer cases with and without medical records and K- <i>ras</i> analyzed	151
- Table 6. Characteristics of pancreatic cancer cases with and without <i>CYP1B1</i> polymorphisms and K- <i>ras</i> mutations analyzed	155
- Table 7. Characteristics of pancreatic cancer cases with and without K- <i>ras</i> mutations	159
Annex 4. Financial aids of the research group during the PhD period	163
Annex 5. <i>Curriculum Vitae</i>	169
- Curriculum in English (brief version)	169
- Curriculum in Catalan (extended version)	171

INDEX OF TABLES AND FIGURES

Tables

- Number of cancer cases, particularly pancreatic cancer cases, in Catalonia	8
- Main characteristics and results of studies that analyzed the association between the occurrence and persistence of <i>K-ras</i> mutations and tobacco consumption, alcohol consumption and medical history, in human pancreatic ductal adenocarcinoma	20
- Main characteristics of smoking history among cases of pancreatic ductal adenocarcinoma with and without mutations in codon 12 of the <i>K-ras</i> oncogene	45
- Main characteristics of smoking history: comparison of hospital controls with all cases of pancreatic ductal adenocarcinoma, with <i>K-ras</i> mutated cases, and with <i>K-ras</i> wild-type cases	47
- Genotype frequencies of the m1 and m2 alleles among cases of pancreatic ductal adenocarcinoma with and without mutations in codon 12 of the <i>K-ras</i> oncogene, and among hospital controls	57
- Relationship between m1 and m2 polymorphisms in <i>CYP1B1</i> and the frequency of <i>K-ras</i> mutations in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma	57
- Past medical history of pancreatitis in pancreatic ductal adenocarcinoma patients with and without mutations in the <i>K-ras</i> oncogene	68
- History of diabetes mellitus in pancreatic ductal adenocarcinoma cases with and without mutations in the <i>K-ras</i> oncogene	69
- Medical history of digestive diseases and allergies in pancreatic ductal adenocarcinoma patients with and without mutations in the <i>K-ras</i> oncogene	71
- Main characteristics of drinking habits among cases of pancreatic ductal adenocarcinoma with and without mutations in codon 12 of the <i>K-ras</i> oncogene	93

- Type of alcohol consumption in pancreatic ductal adenocarcinoma patients with and without mutations in the <i>K-ras</i> oncogene	94
--	----

Figures

- Action mechanisms of carcinogens during the development of cancer	13
- Progression model and characteristic genetic alterations in pancreatic ductal adenocarcinoma	15
- Knowledges and mysteries: diagram on possible clinical, environmental and genetic influences on mutations in the <i>K-ras</i> oncogene	17
- Number of cases included in the different analyses	28
- Sample availability and retrieval for <i>K-ras</i> mutation analysis from patients with pancreatic ductal adenocarcinoma	33
- Tobacco consumption in cases of pancreatic ductal adenocarcinoma with and without a mutation in the <i>K-ras</i> gene	46
- Duration of diabetes mellitus prior to the diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma in cases with <i>K-ras</i> wild-type tumors and cases with <i>K-ras</i> mutated tumors	70
- Association between alcohol consumption and <i>K-ras</i> mutations in different lifetime periods before the diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma	95
- Association between alcohol consumption and <i>K-ras</i> mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma patients, by patient age	95

RESUM

Antecedents

La prevenció primària de l'adenocarcinoma ductal de pàncrees (ADP) està fortament limitada per la falta de coneixement sobre la seva etiologia. El factor de risc més ben establert per aquesta patologia és el consum de tabac, però explica només una petita proporció de casos. Es discuteix el paper d'altres factors etiològics com els antecedents patològics de diabetis i pancreatitis, la dieta, determinades exposicions ambientals o laborals, i els factors hereditaris o de susceptibilitat genètica.

Mutacions puntuals en l'oncogèn *K-ras*, i la seva conseqüent activació, són presents en més del 80% dels casos d'ADP; és un dels esdeveniments genètics fonamentals perquè el càncer tingui lloc. L'activació d'aquest oncogèn dóna lloc a gran varietat de respostes, des de l'augment de la proliferació cel·lular fins a la inhibició de l'apoptosi (o mort cel·lular programada), en funció del context cel·lular. Els gens *Ras* són dianes crítiques per als carcinògens químics; els càncers de pàncrees amb mutacions en l'oncogèn *K-ras* i sense aquestes probablement es desenvolupen a partir de diferents interaccions gen-ambient. Tot i això, els estils de vida i les exposicions ambientals que poden influir en la presència de mutacions en el gen *K-ras* són pràcticament desconeguts.

Per aquest motiu, l'*objectiu general* d'aquesta tesi és estudiar la relació entre la prevalença de mutacions en el codó 12 de l'oncogèn *K-ras* i diferents factors ambientals (consum de tabac i alcohol), clínics (antecedents patològics) i genètics (polimorfismes en el gen metabolitzador de xenobiòtics CYP1B1), en pacients amb ADP.

Metodologia

La tesi s'emmarca en el projecte PANKRAS II, un estudi multicèntric prospectiu sobre el paper de les mutacions en l'oncogèn *K-ras* i altres alteracions genètiques en el diagnòstic, el pronòstic i l'etiologia del càncer de pàncrees exocrí.

Es van reclutar 602 pacients procedents de 5 hospitals generals del nord-est de la península ibèrica amb patologies relacionades amb el pàncrees, dels quals 185 eren pacients amb ADP; en ells es basen les anàlisis que presentem. Es va entrevistar personalment més del 85% dels pacients per obtenir informació sociodemogràfica, clínica (antecedents patològics i història familiar de càncer) o sobre els seus estils de vida (dieta, ocupació o hàbits tòxics), entre d'altres factors; paral·lelament es van revisar les històries clíniques d'aquests pacients. Finalment es van realitzar anàlisis moleculars de gens implicats en el procés de carcinogènesi pancreàtica (*K-ras*, *TP53*, *p-16/CDKN2*, *SMAD4/DPC4*, *BRCA2* o *CFTR*, entre d'altres).

L'anàlisi de l'associació entre la prevalença de mutacions en l'oncogèn *K-ras* i els diferents factors clínics, ambientals i genètics s'ha realitzat fonamentalment mitjançant regressió logística no condicional.

Resultats i discussió

Tot i que el consum de tabac és el factor de risc més ben establert i les mutacions en l'oncògen *K-ras* un dels esdeveniments fonamentals en l'etiologia de l'ADP, els nostres resultats mostren que no existeix associació entre ambdós factors. Els carcinògens del tabac presents en el teixit pancreàtic, les nitrosamines, serien les responsables d'alteracions en gens que intervenen en estadis més tardans del desenvolupament del càncer; alhora, altres carcinògens del tabac amb capacitat per activar *K-ras*, com els hidrocarburs aromàtics policíclics, no tindrien el pàncrees com a òrgan diana. Els carcinògens del tabac intervenen en la carcinogènesi pancreàtica per vies alternatives a l'activació de *K-ras*.

El gen citocrom *P4501B1 (CYP1B1)* codifica un enzim metabolitzador de carcinògens i estrògens amb un rol important en la bioactivació de procarcinògens ambientals. En les reaccions de detoxificació es generen productes capaços d'unir-se al DNA formant adductes i que poden ser els responsables de les mutacions activadores en l'oncògen *K-ras*. Els nostres resultats mostren que el genotip homocigot per l'al·lel valina (Val) en el locus m1 del gen *CYP1B1*, augmenta de risc de tenir un ADP amb mutacions en l'oncògen *K-ras*; aquest genotip estaria associat a una activitat detoxificadora més baixa i, en conseqüència, a un procés deficient de biotransformació, metabolització i eliminació de tòxics de l'organisme, que serien l'origen de mutacions en l'oncògen *K-ras*.

Les mutacions en l'oncògen *K-ras* són presents en estadis molt inicials del procés carcinogènic pancreàtic, i també en el teixit de pacients amb pancreatitis o diabetis; ambdues patologies es consideren possibles factors de risc per l'ADP. Els nostres resultats mostren que els antecedents patològics de diabetis tipus 2 (DM-2) i de pancreatitis no són més freqüents en els casos d'ADP amb mutacions a *K-ras*; així doncs, en pacients d'ADP, tant els antecedents de DM-2 com els de pancreatitis semblen estar associats amb vies d'activació de la carcinogènesi pancreàtica independents de *K-ras*. Els antecedents de DM-2 possiblement estan relacionats amb les homologies que presenta la insulina amb determinats factors de creixement tumoral i, per tant, amb la seva capacitat d'unir-s'hi; els antecedents de pancreatitis podrien estar lligats al dany que pateix el teixit pancreàtic com a conseqüència de la inflamació crònica a la que està sotmès i a mediadors de la resposta inflamatòria.

Tot i que es discuteix el paper del consum d'alcohol en la carcinogènesi pancreàtica, tant l'etanol com el seu metabòlit, l'acetaldehid, estan reconeguts com a carcinògens en humans. Els nostres resultats mostren que el consum d'alcohol al llarg de la vida està lleugerament associat amb la presència de mutacions en l'oncògen *K-ras* en pacients amb ADP; aquesta associació es fa més evident en augmentar la durada i la intensitat del consum de begudes alcohòliques. Els efectes carcinogènics i mutagènics de l'etanol i l'acetaldehid (que és capaç d'unir-se al DNA i formar adductes estables que condueixen a errors en la replicació i, per tant, a mutacions en determinats gens) podrien jugar un paper important en l'aparició de les mutacions en l'oncògen *K-ras* en l'epiteli pancreàtic.

ABSTRACT

Background

The primary prevention of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) cancer is severely hampered by limited knowledge on its etiology. Tobacco consumption is the best established risk factor, but it explains only a small fraction of cases. It is currently being discussed the role of other etiologic factors including diet, medical history, environmental and occupational exposures, or genetic susceptibility.

Activating point mutations in the *K-ras* oncogene are one of the fundamental genetic events leading to PDA; at diagnosis, about 80% of PDA cases harbour mutations in codon 12 of *K-ras*. Depending on the cellular and molecular context, oncogenic *K-ras* activation can result in a wide variety of responses ranging from the activation of a senescence programme to an increased cell proliferation and inhibition of apoptosis. *Ras* genes are critical targets for chemical carcinogens; *K-ras*-mutated and wild-type cancers may develop through pathways involving different gene-environment interactions. Although mutations in *K-ras* are the most frequent alteration of oncogenes in human cancer, the potential lifestyle and environmental influences on their occurrence and persistence are largely unknown.

The *main objective* of the present thesis is to assess the relationship between activating mutations in codon 12 of the *K-ras* oncogene and environmental, clinical, and genetic factors, (specifically tobacco and alcohol consumption, medical history and genetic polymorphisms in *CYP1B1*) in patients with PDA.

Methodology

This thesis is developed in the context of the PANKRAS II project, a multicentre prospective study on the role of mutations in the *K-ras* oncogene and other genetic alterations in the diagnosis, prognosis and etiology of exocrine pancreatic cancer.

A total of 602 subjects were recruited at five general hospitals in the eastern Mediterranean part of Spain; among them, 185 were incident cases of PDA. Over 85% of the patients were interviewed face-to-face during hospital stay, close to the time of diagnosis. Interviews included questions about lifestyle, past clinical history, symptoms, occupation, diet, coffee, alcohol and tobacco consumption. A structured form was used to collect clinicopathological information from medical records, including details on diagnostic procedures, laboratory results and follow-up care. Molecular analyses of genes involved in pancreatic carcinogenesis were also undertaken (i.e., *K-ras*, *TP53*, *p-16/CDKN2*, *SMAD4/DPC4*, *BRCA2* or *CFTR*).

The association between the presence of *K-ras* mutations and clinical, environmental and genetic factors was assessed by unconditional logistic regression.

Results and discussion

While both smoking and *K-ras* mutations have important roles in the etiopathogenesis of PDA, our results show no association between the presence of *K-ras* mutations and tobacco consumption in PDA patients; the two processes may act independently in pancreatic carcinogenesis. Carcinogens from tobacco smoke detected in pancreatic tissue (nitrosamines) might be the responsible of other genetic alterations that act late in the carcinogenic process. On the other hand, pancreatic tissue is not a target organ for tobacco carcinogens that could activate oncogenic *K-ras* (such as polycyclic aromatic hydrocarbons). Tobacco does not play a major part in the acquisition of *K-ras* mutations in the pancreatic epithelium.

Cytochrome P4501B1 (*CYP1B1*) is a carcinogen and estrogen-metabolizing enzyme with an important role in the bioactivation of some environmental procarcinogens. The oxidant steps catalyzed by this enzyme often create more reactive intermediates that are able to bind with DNA, leading to DNA adduct formation and genetic mutations. Our results suggest that *CYP1B1* polymorphisms might influence interindividual differences in susceptibility to chemically-induced cancers (as pancreatic cancer) by the acquisition of *K-ras* mutations. Val/Val genotype increases the probability of having a *K-ras* mutated PDA; this genotype might be associated with poor detoxification activity and, consequently, with an impaired elimination of some environmental toxics. Some of these compounds may be oxidized to electrophilic metabolites that can react with DNA to form stable adducts, which may favor mutations in *K-ras*.

Activating point mutations in the *K-ras* oncogene are present in early stages of the PDA development, and have been also detected in pancreatic tissue from patients with diabetes and pancreatitis, both considered as possible risk factors for PDA. Our results show no association between the presence of *K-ras* mutations and medical history of diabetes or pancreatitis in PDA patients; medical history of pancreatitis and diabetes may favor pancreatic carcinogenesis through pathways independent of *K-ras* activation. It has been suggested that insulin and its precursors have some homology to the insulin-like growth factors, and affinity to bind to receptors of the tumor growth factor; hence, a biological basis exists for a relationship between diabetes, hyperinsulinemia and pancreatic carcinogenesis independent of *K-ras*. On the other hand, chronic inflammation during pancreatitis causes a gradual damage of pancreatic tissue that might contribute to create a microenvironment that favours carcinogenic transformation of acinar pancreatic cells through molecular alterations not involving *K-ras* oncogene mutation, perhaps by mediators of the inflammatory response.

Although the role of alcohol in pancreatic carcinogenesis remains inconclusive, there is sufficient evidence for the carcinogenicity of ethanol and acetaldehyde. Our results show a weakly positive relationship between lifetime history of alcohol consumption and the prevalence at diagnosis of *K-ras* mutations in PDA patients. Acetaldehyde, a cytotoxic, mutagenic, and carcinogenic metabolite of ethanol, is responsible for tumor enhancing effects leading to cell proliferation; it can also bind to DNA, leading to the formation of stable DNA adducts that could cause replication errors and mutations in oncogenes and tumor suppressor genes, and *K-ras* seems to be one of them.

LLISTA D'ABREVIACIONS

ADP = Adenocarcinoma ductal de pàncrees

BRCA2 = Gen de susceptibilitat al càncer de mama (*breast cancer 2 early onset*)

CFTR = Gen regulador de la transductància transmembrana de la fibrosis quística (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulador; ATP-binding cassette sub-family C, member 7*)

CPE = Càncer de pàncrees exocrí

CSBE = Càncer del sistema biliar extrahepàtic

CYP = Gen citocrom P450

CYP1B1 = Gen citocrom P450, variant 1B1

DM = Diabetis mellitus (DM-2 = *diabetis mellitus* tipus 2)

GST = Gen glutatió-S transferasa

IARC = Agència Internacional per a la Recerca en Càncer (*International Agency for Research on Cancer*)

IC = Interval de confiança

NAT = Gen N-acetil transferasa

OR = Raó d'odds (*odds ratio*)

PAH = Hidrocarburs aromàtics policíclics (*polycyclic aromatic hydrocarbons*)

PanIN = Neoplàsia intraepitelial pancreàtica (*pancreatic intraepithelial neoplasia*)

PANKRAS II = Estudi multicèntric prospectiu sobre el paper de les mutacions en el gen *K-ras* i altres alteracions genètiques en el diagnòstic, pronòstic i etiologia del càncer de pàncrees i altres patologies pancreàtico-biliars.

PC = Pancreatitis crònica

PCR = Reacció en cadena de la polimerasa (*polimerase chain reaction*)

PPB = Patologia pancreàtica benigna

RFLP = Polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció (*restriction fragment length polymorphism*)

SMAD4/DPC4 = (*deletion target in pancreatic carcinoma 4 gene*)

TP16/CDKN2 = Gen supressor de tumors p16 (*cyclin-dependent kinase 4 inhibitor A*)

TP53 = Gen supressor de tumors p53

XRCC = Gen de reparació de DNA per excisió (*Xeroderma pigmentosum complementation group C*)

1. INTRODUCCIÓ GENERAL

Un dels principals reptes de la recerca biomèdica actual és el coneixement sobre l'etiologia del càncer. Durant l'any 2007 es van diagnosticar més de 12 milions de casos nous de càncer arreu del món (20.000 persones/dia), i en van morir uns 7,6 milions, fet que representa una de les tres causes principals de mortalitat en els països desenvolupats [1,2]. A Catalunya, tot i que la incidència de càncer està augmentant (i es preveu que seguirà fent-ho), la mortalitat causada per càncer s'ha estabilitzat en la majoria de tumors i la supervivència dels pacients amb càncer ha augmentat molt clarament com a conseqüència dels avenços en el diagnòstic precoç i la millora dels tractaments (**Taula 1**) [3-8].

A nivell mundial, el càncer de pàncrees és el tretzè en incidència, es diagnostiquen entre 8 i 12 casos per cada 100.000 persones/any, però ocupa el vuitè lloc en quant a causa de mort per càncer; tot i que la seva incidència és relativament baixa, comparada amb la d'altres neoplàsies, aquesta s'igualava pràcticament amb la seva mortalitat. Les gran xifres del càncer de pàncrees a Catalunya es presenten a la **Taula 1**. L'agressivitat d'aquesta neoplàsia dona els pitjors índex de supervivència. La taxa mitjana de supervivència als 5 anys és inferior al 5% i de només 6 mesos després de ser diagnosticat. Les dificultats en el seu diagnòstic precoç, degut a l'absència de símptomes específics i a la limitació en les metodologies diagnòstiques, són en part responsables del seu mal pronòstic [1-9].

Les interaccions genètico-ambientals són especialment rellevants en l'estudi de l'etiologia del càncer de pàncrees, entre d'altres neoplàsies [10]. Aquesta i d'altres dimensions del coneixement de les bases moleculars del procés carcinogènic, així com les seves repercussions en la promoció de mesures de prevenció primària (especialment per disminuir-ne la incidència), representen un repte per a la salut pública i, alhora, un "lloc de trobada natural" entre la salut pública i les ciències biològiques [10-12].

Taula 1. Les grans xifres del càncer en general, i del càncer de pàncrees en particular, a Catalunya.

	Totes les localitzacions tumorals			Càncer de pàncrees		
	Homes	Dones	Total	Homes	Dones	Total
Incidència (núm. total de casos nous en el període o en l'any esmentat)						
Incidència 1998-2002	16.984	12.078	29.062	334	341	675
Incidència 1985	8.325	7.448	15.773	201	131	332
Incidència 1995	14.017	11.187	25.204	304	337	641
Incidència 2002	17.884	12.831	30.715	366	376	742
Incidència projectada 2005	20.999	14.141	35.140	412	427	839
Incidència projectada 2010	24.532	16.433	40.965	491	525	1.016
Incidència projectada 2015	27.438	18.986	46.424	574	638	1.212
Taxa de supervivència als 5 anys (%)						
Supervivència observada 1995-1999	38,0	51,1		4,3	3,0	
Supervivència relativa 1995-1999	46,0	56,4		5,0	3,4	

Font: *El impacto del cáncer en Cataluña. Medicina Clínica. 2008; 131 (número extraordinario). Referències [3-8].*

1.1. Factors clínics, ambientals i genètics relacionats amb l'etiologia de l'adenocarcinoma ductal de pàncrees

Els factors demogràfics que influencien clarament el risc de l'adenocarcinoma ductal de pàncrees (ADP), el tipus histològic majoritari en el càncer de pàncrees, són el sexe i l'edat: és més freqüent en homes que en dones i s'associa amb l'edat avançada; aproximadament el 80% dels casos es donen en individus d'entre 60 i 80 anys, i la mitjana d'edat de diagnòstic és de 73 anys [2,13-18].

Els factors genètics i clínics que s'han associat amb un augment del risc de desenvolupar un ADP inclouen, en primer lloc, diferents processos i malalties hereditàries que impliquen mutacions en la línia germinal: la història familiar de càncer de pàncrees, la pancreatitis hereditària, el càncer de mama hereditari (lligat a mutacions germinals en *BRCA2*), la síndrome de Peutz-Jeghers, el síndrome de Lynch (o càncer colorectal sense pòlips hereditari), l'atàxia

telangiectasia, o el melanoma múltiple atípic hereditari; però la proporció de càncers de pàncrees atribuïbles directament a l'herència no supera el 10% dels casos [13,18,19-23]. A més, la literatura científica probablement sobreestima aquesta proporció ja que, com és sabut, té un fort biaix vers l'estudi de les alteracions genètiques heretades, en detriment de les no heretades o adquirides [24]. En segon lloc, hi ha els polimorfismes en gens implicats en el metabolisme de carcinògens o bé en els gens que intervenen en la reparació de DNA, com per exemple els gens de la família dels citocroms P450 (CYP), les N-acetiltransferases (NAT), les glutatió S-transferases (GST) o els gens de reparació de DNA per excisió (XRCC) [14,25-28]. I en tercer lloc, es consideren alguns antecedents patològics com la pancreatitis crònica (PC), la diabetis mellitus tipus 2 (DM-2), l'úlceres pèptica o infeccions per *Helicobacter pylori* [13,18,19].

Finalment, també s'han relacionat diferents factors ambientals (incloent els lligats amb els estils de vida [29]) amb el desenvolupament de l'ADP. El consum de tabac és un factor de risc consistent; per si sol explica un 25% dels casos d'ADP. Altres factors implicats, però amb resultats inconsistents, inclouen exposicions ambientals o laborals a tòxics, dietes riques en carn i greixos i pobres en fruita i verdura, l'obesitat, o el consum de cafè i begudes alcohòliques [15,30-42].

1.1.1. Consum de tabac

El consum de tabac és el factor de risc més ben establert per l'ADP; la majoria d'estudis (però no pas tots) han observat que el risc es dobla en els fumadors de cigarrets respecte als que no han fumats mai, i alhora augmenta amb la quantitat (nombre de cigarrets fumats) i amb la durada de l'hàbit tabàquic (anys de fumador) [13,15,30-32,36]. Tot i això, només aproximadament un de cada 4 casos d'ADP és atribuïble al consum de tabac [43].

Dels més de 60 carcinògens presents en el tabac, les nitrosamines són els més potents en la carcinogènesi pancreàtica; aquestes nitrosamines s'han identificat en teixit pancreàtic i, a més, indueixen lesions precursors de l'ADP en models experimentals amb animals (concretament causen hiperplàsia en els ductes pancreàtics). Es desconeixen els mecanismes exactes a través dels quals aquestes nitrosamines indueixen el procés carcinogènic pancreàtic, però es creu que es basen en la capacitat dels seus metabòlits per unir-se al DNA formant-hi adductes i induint mutacions somàtiques en oncogens i/o gens supressors de tumors, crucials per al bon funcionament de la cèl·lula [44-46].

1.1.2. Consum d'alcohol

El consum elevat d'alcohol està fortament associat amb la PC [47,48], que alhora es considera factor de risc per a l'ADP [49,50]; però no hi ha suficient evidència per concloure que hi ha una relació causal entre el consum de begudes alcohòliques i l'augment del risc de càncer de pàncrees. Els resultats varien en funció de la quantitat i del tipus d'alcohol que es consumeix [51-53].

L'alcohol podria jugar un paper en la carcinogènesi pancreàtica a través del desenvolupament de la pancreatitis. A més, tant l'etanol com el seu metabòlit principal, l'acetaldehid, són carcinògens potencials reconeguts [51,54-58].

1.1.3. Antecedents patològics

Existeix evidència consistent que mostra que antecedents mèdics de PC [49,50] i de DM-2 [59-61] poden augmentar el risc de desenvolupar un ADP. Naturalment, els millors estudis han tingut en compte que, tot i que tenen unes característiques clíniques identificables, ambdues patologies poden ser alhora una causa i una conseqüència, o manifestació, del propi càncer [62,63].

La pancreatitis hereditària és un dels factors de risc clarament establerts per a l'ADP [49,64-68], però només una petita part dels casos de pancreatitis són hereditàries, la resta són pancreatitis cròniques, generalment degudes al consum d'alcohol [50,69-72]; per això, només un 3-4% dels casos d'ADP es poden atribuir a la pancreatitis hereditària [65,68,72]. Els resultats de l'associació entre els antecedents de pancreatitis crònica i el risc de càncer de pàncrees són inconsistents i la magnitud de les associacions varia molt en els diferents estudis [50,69,70]. La inflamació prolongada del pàncrees en els pacients amb PC podria iniciar o promoure la progressió dels tumors pancreàtics en aquests mateixos pacients [69,71,73-75].

Hi ha estudis que relacionen els antecedents patològics de DM-2 amb l'augment de risc d'ADP [59-62]; una DM-2 prèvia al diagnòstic de l'ADP es considera un possible factor causal per al càncer de pàncrees. A més, alguns estudis comenten el fet que les dues malalties poden estar relacionades per ser conseqüència d'una exposició comuna o bé perquè una sigui causa de l'altra [63]; fins i tot, en alguns casos, la diabetis podria ser una manifestació del propi càncer. No es coneixen els mecanismes exactes pels que la diabetis augmenta el risc de càncer de pàncrees [59-63].

1.1.4. Polimorfismes genètics

Polimorfismes en gens implicats en el metabolisme d'agents químics ambientals o en gens que intervenen en la reparació del DNA afecten la susceptibilitat individual a l'exposició a carcinògens i, en conseqüència, poden tenir un paper especialment rellevant en aquells càncers amb un fort component ambiental, és a dir, els relacionats amb determinades exposicions ambientals, com és el cas de l'ADP [26,76-85]. Alguns dels enzims biotransformadors o metabolitzadors de xenobiòtics inclouen els que codifiquen els gens de la família *CYP*, *NAT* o *GST*. Cap d'aquests polimorfismes té un efecte principal (*main effect*) sobre el risc d'ADP, però sí que s'han observat possibles interaccions gen-ambient; davant les mateixes exposicions ambientals, per exemple en relació a l'exposició als carcinògens del tabac, els pacients amb diferents genotips tenen diferent susceptibilitat al càncer de pàncrees [78,82]. Un exemple concret és el cas del gen *CYP1B1*, que codifica un enzim metabolitzador de carcinògens i estrògens de fase I, és a dir, que intervé en la bioactivació d'alguns pro-carcinògens ambientals (veure **Figura 1**); és l'encarregat de l'activació tant d'alguns hidrocarburs aromàtics policíclics (HAP), com el benzopirè o el dimetilbenzoantracè, com també de les amines aromàtiques heterocíclics derivades del fum del tabac o d'algunes exposicions laborals, i que són carcinògens demostrats en estudis experimentals. A més, l'oxidació de tots aquests compostos catalitzada per aquests enzims, genera intermediaris molt més reactius, capaços d'unir-se al DNA, permetent que es formin adductes i en conseqüència, que es produeixin mutacions al material genètic. Polimorfismes en el gen *CYP1B1* podrien influir en les diferències inter-individuals de susceptibilitat a càncers induïts per carcinògens químics, com és el cas de l'ADP. Les variants menys eficient de l'enzim *CYP1B1* podrien reduir la bioactivació d'alguns pro-carcinògens ambientals, dificultant així que els enzims de fase II duguin a terme la metabolització i eliminació d'aquests carcinògens (veure **Figura 1**); al no ser correctament eliminats de l'organisme, aquests carcinògens poden provocar danys irreversibles al DNA.

1.2. Origen de les mutacions en l'oncogen *K-ras* en l'adenocarcinoma ductal de pàncrees

Com en d'altres neoplàsies, també el procés de desenvolupament de la carcinogènesi pancreàtica ha d'incloure l'acumulació de múltiples alteracions en una mateixa cèl·lula; alhora múltiples punts de control, tant en la proliferació

com en la diferenciació cel·lular, s'han de veure afectats perquè la progressió tumoral tingui lloc [86].

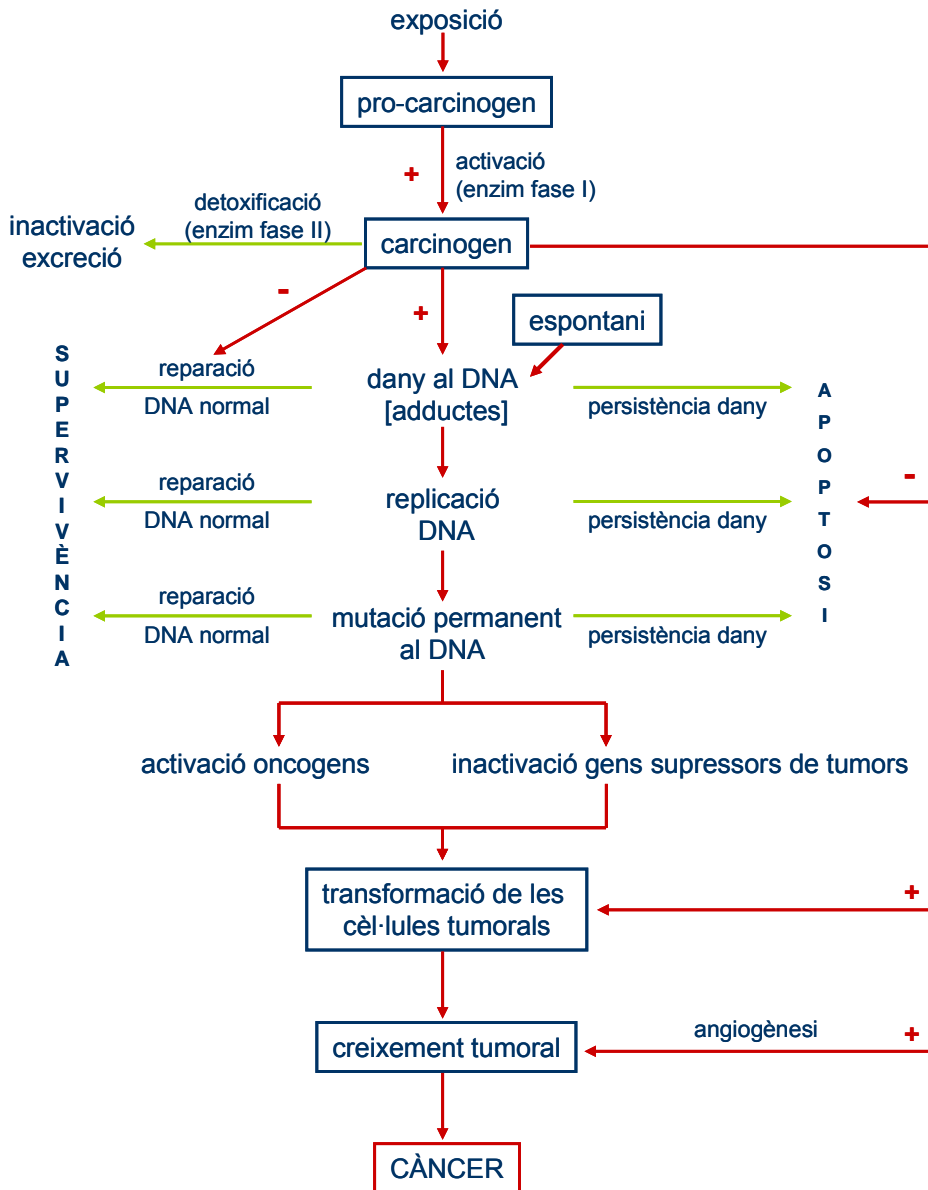
Com s'observa en la **Figura 1**, els carcinògens són el resultat de l'activació de pro-carcinògens als quals l'organisme està exposat a partir de diferents processos clínics i ambientals. Les primeres barreres que imposa la cèl·lula són el que es coneixen com enzims activadors (de fase I) i detoxificadors (de fase II); els enzims de fase I són proteïnes encarregades de detectar els pro-carcinògens i fer-los més actius perquè els enzims de fase II puguin inactivar-los augmentant la seva solubilitat i facilitant així la seva excreció de l'organisme. Determinats factors ambientals i genètics poden modular l'activitat d'aquests enzims. Si els carcinògens activats escapen d'aquests mecanismes de defensa poden unir-se al DNA i alterar la seva estructura mitjançant la formació d'adductes o induint altres tipus de danys [87,88].

Durant la replicació del material genètic, que té lloc a l'inici de la divisió cel·lular, poden produir-se errors que condueixen a l'aparició de mutacions espontànies; alhora, aquestes mutacions poden ser induïdes per carcinògens que, com dèiem, s'uneixen al DNA. En condicions normals, aquestes mutacions, tant les espontànies com les induïdes, són reparades pels mecanismes de defensa de la cèl·lula; si el dany és massa important i persisteix, aquesta cèl·lula serà conduïda a l'apoptosi o mort cel·lular programada [86].

Si la cèl·lula amb mutacions escapa a aquests controls i és capaç de replicar-se i originar dues noves cèl·lules filles, s'haurà fixat aquesta alteració i la mutació esdevindrà permanent. Els mateixos carcinògens actius poden alterar els mecanismes de reparació o d'inducció de mort cel·lular de manera que la cèl·lula mutada pugui replicar-se igualment [86,87].

Quan aquestes mutacions irreversibles tenen lloc en oncogens o gens supressors de tumors, té lloc la iniciació. Aquesta cèl·lula pot seguir proliferant i permetre l'expansió clonal i el desenvolupament del tumor, és el que es coneix com a promoció. Aquest procés és reversible, però si el carcinogen persisteix i les cèl·lules segueixen proliferant, poden produir-se altres mutacions que permeten la progressió tumoral que condueix al càncer. Els carcinògens actius als quals l'organisme està exposat són capaços d'actuar en més d'un moment al llarg del procés carcinogènic, de produir múltiples alteracions en una mateixa cèl·lula i d'afectar alhora múltiples punts de control, tant en la proliferació com en la diferenciació cel·lular, permetent que es produeixi el desenvolupament de la carcinogènesi [87,89].

Figura 1. Mecanismes d'actuació dels carcinògens al llarg del procés de desenvolupament del càncer.



Font: referències [86-89]

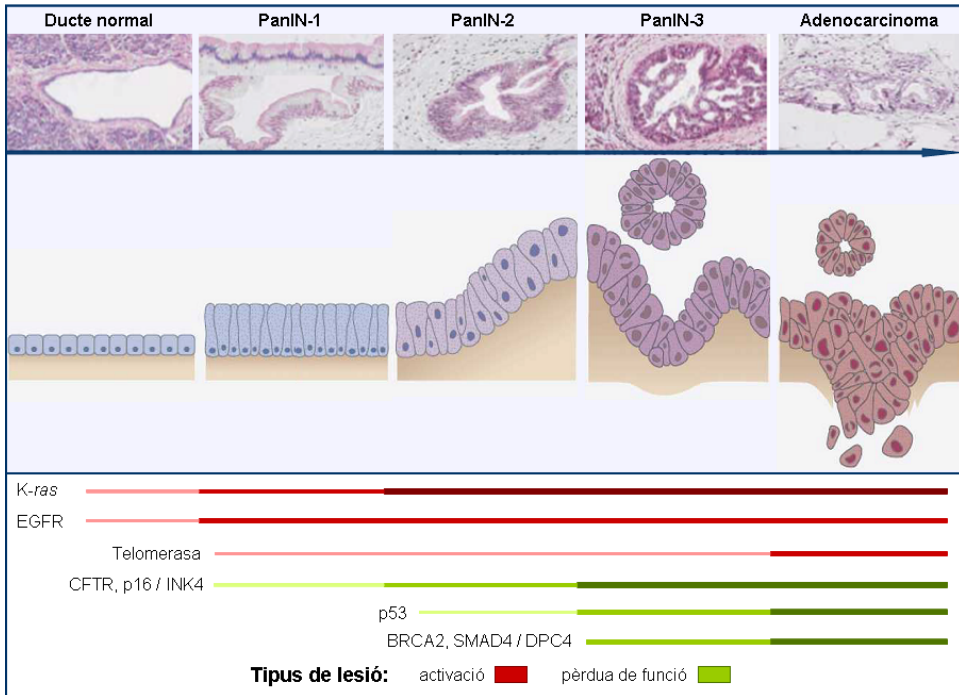
Al llarg del procés de carcinogènesi pancreàtica, hi han d'intervenir conjuntament diferents mecanismes, des de mutacions que resulten en l'activació d'oncogens (que codifiquen proteïnes que promouen el creixement cel·lular) o la pèrdua de funció de gens supressors de tumors (que codifiquen proteïnes que aturen la proliferació cel·lular), a fenòmens d'escurçament de telòmers o, fins i tot, la desregulació de l'expressió de determinats gens mitjançant canvis epigenètics [10,24,90-105].

L'acumulació d'alteracions genètiques heretades, però sobretot de les adquirides, és el que té com a conseqüència la transformació neoplàsica i la progressió de l'ADP; es produeix, doncs, una acumulació seqüencial aparent d'alteracions histològiques i genètiques característiques al llarg de les diferents lesions pancreàtiques.

Com s'observa en la **Figura 2**, l'ADP resulta de l'acumulació d'alteracions genètiques en el DNA de les cèl·lules normals. En el model que s'ha proposat en el cas del procés de carcinogènesi pancreàtica, s'observa un patró aparent d'alteracions genètiques característiques en funció del tipus de lesió pre-neoplàsica: mentre que les mutacions activadores en el codó 12 de l'oncogen K-ras es poden trobar ja en les primeres lesions (PanIN-1), la inactivació dels gens supressors de tumor *TP53*, *DPC4* o *BRCA2* es limiten a lesions més avançades (PanIN-3 i adenocarcinoma). El model mostra com es produeix, doncs, una acumulació seqüencial d'alteracions genètiques característiques, que sembla coincidir amb un patró de diferents lesions histològiques al llarg de la progressió tumoral.

En la **Figura 2**, el gruix i la intensitat del color (vermell i verd) de les línies horitzontals representa la hipotètica freqüència aproximada de les principals alteracions genètiques en el model de progressió tumoral del pàncrees.

Figura 2. Model de progressió i alteracions genètiques característiques de l'adenocarcinoma ductal de pàncrees.



Font: referències [95,96,98].

Les mutacions en el codó 12 de l'oncògen *K-ras*, i la seva conseqüent activació, són l'alteració més freqüent en el conjunt de càncers humans [106,107]. El principal oncògen implicat en la carcinogènesi pancreàtica és *K-ras*; les mutacions activadores en l'oncògen *K-ras* són un dels esdeveniments genètics fonamentals perquè l'adenocarcinoma pancreàtic tingui lloc: més del 80% dels casos d'ADP tenen mutacions puntuals en el codó 12 de l'oncògen *K-ras* en el moment del diagnòstic de la malaltia [108-115]. A més, les mutacions són presents ja en estadis molt inicials del procés carcinogènic i la seva freqüència va incrementant a mesura que augmenta el grau de displàsia de les lesions pancreàtiques (veure **Figura 2**); és per aquest motiu que es considera que les mutacions puntuals en aquest gen són essencials perquè la carcinogènesi pancreàtica tingui lloc. Però, tot i que com hem dit, les mutacions en l'oncògen *K-ras* són un esdeveniment inicial, i aparentment bàsic, per al desenvolupament de l'ADP, la seva absència en una proporció de lesions inicials suggereix que l'activació de l'oncògen *K-ras* no és necessària tant pel que fa a la iniciació, com a la progressió del tumor [90,115,116].

L'activació per mutacions de l'oncogèn K-*ras* dóna lloc a un ampli ventall de respostes biològiques en funció del context cel·lular i molecular: des de l'augment de la proliferació i la diferenciació cel·lular, fins a la inhibició de l'apoptosi (o mort cel·lular programada) [106]. K-*ras*, un dels membres de la família de les proteïnes Ras d'unió a GTP, actua com a transmissor de senyals des de les proteïnes tirosina quinasa situades a la membrana citoplasmàtica; la seva activació per factors de creixement implica el desencadenament de diferents rutes intracel·lulars, entre elles la via de les MAP quinases (Raf/Map/ERK), la de la PI3 quinasa (PI3K) i la de RalGDS, les tres cascades de senyalització més importants relacionades amb la progressió i el manteniment de la carcinogènesi pancreàtica [99,117]. La inhibició de cadascuna d'aquestes cascades a diferents nivells inhibeix el procés de carcinogènesi pancreàtica en un gran nombre de sistemes *in vitro* i *in vivo* [95,99].

El gen K-*ras* codifica per una proteïna de 21 kDa que es localitza a la cara interna de la membrana citoplasmàtica i que té activitat guanosina trifosfatasa (GTPasa); aquesta proteïna per si sola és ineficient i requereix proteïnes activadores de l'activitat GTPasa, les GAPs (*GTPasa activating proteins*), per promoure la hidròlisi del GTP i atenuar la transmissió de la senyal. Les mutacions en l'oncogèn K-*ras* provoquen una activació constitutiva del seu senyal ja que fan que la proteïna que codifica l'oncogèn es torni insensible a les GAPs [99,106]. En l'ADP aquestes mutacions són gairebé exclusives del codó 12 de l'oncogèn K-*ras*; les mutacions al codó 13, característiques del càncer de còlon per exemple, són gairebé inexistents [118].

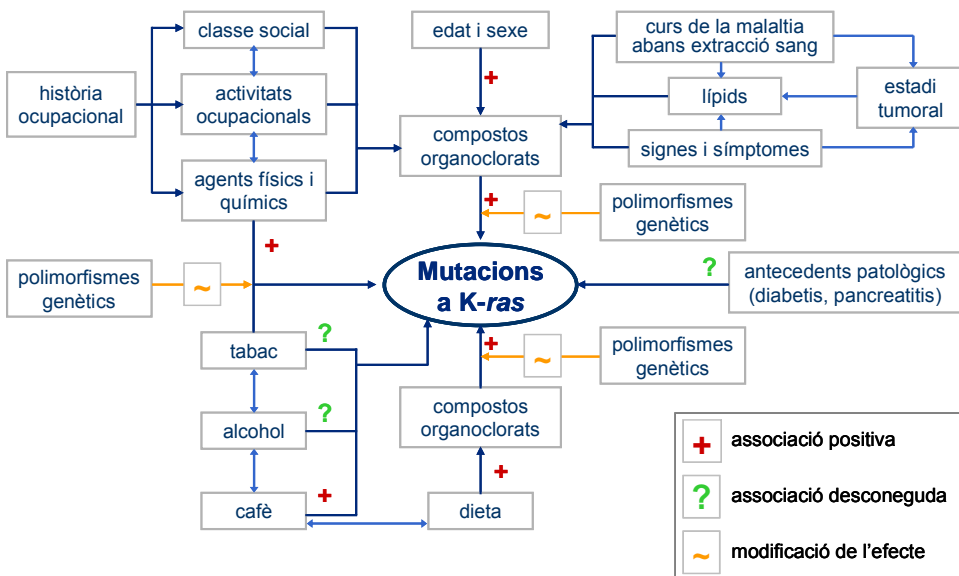
D'altra banda, el gen supressor de tumors més freqüentment mutat en l'ADP és *TP53* [91,93,112,113,119], es troba mutat en aproximadament un 55% dels casos. Aquest gen constitueix una de les barreres principals que, si funciona correctament, bloqueja la progressió de les lesions pre-neoplàsiques amb mutacions en l'oncogèn K-*ras* a estadis més avançats. Per això, la inactivació del gen *TP53* es creu que té lloc en estadis més tardans de la carcinogènesi pancreàtica [90,95,97,99].

Tot i que les mutacions activadores en l'oncogèn K-*ras* són les alteracions genètiques més freqüents en l'ADP, les seves causes són pràcticament desconegudes; el coneixement sobre els estils de vida, les exposicions ambientals, i els factors clínics i genètics que poden influir en la seva aparició i persistència són molt limitats [112-114,120-129]. Alhora, els càncers de

pàncrees amb i sense mutacions en el gen *K-ras* es poden desenvolupar a partir de diferents vies que impliquin interaccions gen-ambient característiques.

La **Figura 3** mostra els coneixements establerts i les incògnites sobre les possibles influències de factors clínics, ambientals i genètics en la prevalença de mutacions en l'oncògen *K-ras* en pacients amb ADP. Altres estudis mostren com la dieta, el consum de cafè, algunes ocupacions i l'exposició a compostos organoclorats, entre d'altres factors, influencien el risc de mutacions en el codó 12 de l'oncògen *K-ras* [120-124]. Polimorfismes en determinats gens poden modular l'efecte de totes aquestes exposicions. Com s'observa en la **Figura 3**, queden moltes incògnites per resoldre, algunes de les quals pretenem abordar-les en aquesta tesi.

Figura 3. Coneixements establerts i incògnites: diagrama sobre les possibles influències de factors clínics, ambientals i genètics en la prevalença de mutacions en l'oncògen *K-ras* en l'adenocarcinoma ductal de pàncrees.



Finalment, un altre aspecte interessant és que els gens *Ras* són dianes crítiques dels carcinògens químics; per tant les mutacions somàtiques en el gen *K-ras* (així com en altres oncogens o gens supressors de tumors), són induïbles per carcinògens, almenys a nivell experimental [45,46]. És per això que les exposicions ambientals, així com diferents factors clínics, poden ser la causa del

càncer de pàncrees a través de l'activació per mutacions de l'oncogèn K-ras. Aquest fet implica també que tant el gen afectat, com el tipus de mutació que s'observa, ens pot donar informació sobre el tipus de carcinogen implicat en la inducció de les mutacions i, en conseqüència, en la inducció del tumor [108,107,120-123].

La **Taula 2** mostra les característiques i els principals resultats dels estudis que han analitzat prèviament la relació entre la prevalença de mutacions en l'oncogèn K-ras i els diferents factors clínics i ambientals que són objecte d'estudi d'aquesta tesi (consum de tabac, consum d'alcohol i antecedents patològics), en pacients amb ADP.

Un total de 7 estudis [112-114,126-129] han analitzat prèviament la relació entre el consum de tabac i la prevalença de mutacions al codó 12 de l'oncogèn K-ras en pacients amb ADP, i els resultats són inconsistents. Només dos dels estudis mostren associacions positives entre el consum de tabac i la prevalença de mutacions en l'oncogèn K-ras [127,128]; un dels estudis troba que el consum de tabac és més freqüent entre els casos sense mutacions en l'oncogèn K-ras que entre els casos amb mutacions en aquest oncogèn [126], i la resta no detecten associació entre ambdós factors [112-114,129]. L'estudi de Berger et al. [128] recull retrospectivament teixit pancreàtic no neoplàsic en autòpsies de pacients en els que la causa de la mort no havia estat un ADP. En aquest estudi, tant el diagnòstic com els criteris de selecció, no s'especifiquen; la font d'informació sobre el consum de tabac no està clara i les variables que descriuen el consum de tabac i els anys de fumador havien estat estimades. En el teixit pancreàtic dels no fumadors no es van observar mutacions en l'oncogèn K-ras; tampoc es van detectar les mutacions en el teixit dels 10 pacients que havien fumat entre 1 i 2 paquets de tabac al dia, mentre que en 5 dels 13 teixits dels pacients que havien consumit més de 2 paquets de tabac al dia es van detectar mutacions en l'oncogèn K-ras [128]. En l'estudi de Hruban et al. [127], s'observa un augment del risc de mutacions en l'oncogèn K-ras en els fumadors respecte als no fumadors, però no es detecten associacions entre els paquets-anys fumats i la prevalença de mutacions en el gen K-ras. L'estudi de Fryzek [112] analitza l'associació en només 51 dels 245 casos inclosos (21%) i observa una associació dèbil i no significativa entre el consum de més de 22 paquets-anys i la prevalença de mutacions en l'oncogèn K-ras.

Només un estudi analitza la relació entre el consum d'alcohol i la prevalença de mutacions en l'oncogèn K-ras en pacients amb ADP [114]; basant-se en el teixit tumoral de 51 pacients d'ADP, l'estudi detecta que les mutacions en aquest

oncogèn són més freqüents en aquells pacients amb consums elevats d'alcohol que en els casos no bevedors o amb consums ocasionals, però les associacions són molt dèbils i no són estadísticament significatives.

L'efecte dels antecedents patològics de diabetis en la prevalença de mutacions en l'oncogèn *K-ras* en pacients amb ADP ha estat analitzat en 3 estudis [112,113,129], i cap d'ells ha trobat associacions positives entre els dos factors: els antecedents de diabetis eren més freqüents en aquells pacients d'ADP sense mutacions en l'oncogèn *K-ras*. Només un d'aquests estudis [129] ha analitzat a més la relació entre la prevalença de mutacions en l'oncogèn *K-ras* i la història mèdica de pancreatitis, i no ha detectat relació entre ambdós factors. L'estudi de Slebos et al. [113] analitza teixit tumoral de 61 pacients d'ADP (46 amb mutacions en l'oncogèn *K-ras* i 15 sense mutacions en aquest oncogèn) dels quals 8 tenen antecedents de DM-2 diagnosticada almenys un any abans que l'ADP. Només 2 d'aquests pacients van presentar mutacions en l'oncogèn *K-ras* mentre que en els altres 8 no es van detectar aquestes mutacions; de manera que els antecedents de DM-2 van ser més freqüents en els casos sense mutacions en l'oncogèn *K-ras* que en els casos amb mutacions en aquest oncogèn. En l'estudi de Fryzek et al. [112] es van detectar mutacions en l'oncogèn *K-ras* en un 59% dels pacients d'ADP inclosos i en 9 dels 17 amb antecedents de DM-2. En l'estudi de Jiao et al. [129] es van detectar mutacions en l'oncogèn *K-ras* en només un 32,5% dels pacients d'ADP, a partir de DNA extret de mostres de plasma; la detecció de mutacions en el gen *K-ras* en DNA de plasma és inferior que en teixit tumoral de manera que els resultats d'aquest estudi han de ser interpretats amb cautela i no són comparables als estudis que detecten les mutacions en teixit del tumor. En aquest estudi, la prevalença de mutacions en l'oncogèn *K-ras* no es va relacionar amb els antecedents patològics de DM-2, ni amb els antecedents de pancreatitis, autoreferits pels propis pacients.

D'altra banda, cap estudi ha analitzat prèviament l'associació entre els polimorfismes en el gen metabolitzador de xenobiòtics *CYP1B1* i la prevalença de mutacions en el codó 12 de l'oncogèn *K-ras* en pacients amb ADP.

Taula 2. Característiques principals dels estudis que han analitzat la relació entre la prevalença de mutacions en l'oncògen K-ras i el consum de tabac, el consum d'alcohol i els antecedents patològics, en l'adenocarcinoma ductal de pàncrees en humans.

Primer autor (data de publicació)	Núm. total de casos	% Mutats (N mut/N wt)*	Disseny de l'estudi	Tipus d'associació analitzada	Magnitud de l'associació (OR; p valor)**	Comentaris	
Nagata et al. (1990)	38	92% (36/3)	Cas-cas	Consum de tabac i mutacions a K-ras	OR=0,25; p=0,289	No especifica la font d'informació sobre el consum de tabac.	
Hruban et al. (1993)	82	83% (68/14)	Cas-cas	Consum de tabac i mutacions a K-ras	OR=3,53; p=0,046 No hi ha associació entre paquets-anys i mutacions a K-ras (p=0.40)	Font d'informació sobre el consum de tabac: història mèdica.	
Malats et al. (1997)	51	59% (30/21)	Cas-cas	Consum de tabac i mutacions a K-ras	OR=1,5; p=0,511	Font d'informació sobre el consum de tabac: història mèdica.	
				Consum d'alcohol i mutacions a K-ras	OR=3,02; p=0,079		
Berger et al. (1999)	39	74% (29/10)	Sèrie de casos	Consum de tabac i mutacions a K-ras	OR=9,81; p=0,08	No són casos d'ADP sinó mostres de teixit pancreàtic no neoplàsic. No especifica el diagnòstic actual ni el criteri de selecció. No deixa clara la font d'informació sobre el consum de tabac. Estima les variables sobre la història de consum de tabac.	
Slebos et al. (2000)	61	75% (46/15)	Cas-cas	Consum de tabac i mutacions a K-ras	OR=1,04; p=1,000	Font d'informació sobre el consum de tabac: entrevistes personals als pacients.	
				Antecedents patològics de diabetis i mutacions a K-ras	OR [§] =14,7; p<0,05		
Fryzek et al. (2006)	51	59% (30/21)	Cas-cas Cas-control: K-ras [§] -control K-ras [§] -control	Consum de tabac i mutacions a K-ras	OR=1,86; p=0,283 OR [§] =2,0; p=0,110 OR [†] =1,1; p=0,965	Font d'informació sobre el consum de tabac: entrevistes personals als pacients.	
				Cas-cas Cas-control: K-ras [§] -control K-ras [§] -control	Antecedents patològics de diabetis i mutacions a K-ras		OR [†] =1,44; p>0,05 OR [§] =3,1; p<0,05 OR [‡] =5,6; p<0,05
Jiao et al. (2007)	83	32% (25/52)	Cas-cas	Consum de tabac i mutacions a K-ras	OR=1,20; p=0,712	Mutacions detectades en el DNA obtingut en plasma. Font d'informació sobre consum de tabac: entrevistes personals als pacients.	
				Antecedents patològics de diabetis i mutacions a K-ras	OR [†] =1,56; p=0,53		
				Antecedents patològics de pancreatitis i mutacions a K-ras	OR [†] =0,95; p=0,92		

Mut: K-ras mutat (K-ras^{}). Wt: K-ras no mutat (wild-type) (K-ras^s).

**OR: Raó d'Odds (Odds Ratio). p: p-valor. Quan la OR no apareix en la publicació original, ha estat estimada mitjançant regressió logística a partir de les dades que aporten els autors. La OR estimada correspon a la comparació cas-cas, excepte quan s'especifica.

[†] Els casos sense mutacions a K-ras són la categoria de referència en aquestes comparacions.

[§] OR per la comparació cas-control: casos amb mutacions a K-ras versus controls.

[‡] OR per la comparació cas-control: casos sense mutacions a K-ras versus controls.

Nota: només hem inclòs aquells estudis que han analitzat les associacions que són objecte d'estudi de la tesi.

2. HIPÒTESIS I OBJECTIUS

2.1. Hipòtesis

En aquest apartat presentem les quatre hipòtesis fonamentals de la tesi, cadascuna de les quals es correspon amb els quatre articles que formen el nucli central de la tesi. Per cada hipòtesi, en primer lloc, resumim de forma molt breu els coneixements existents, que ja s'han presentat amb més detall en el capítol anterior i, sobretot, en la introducció de cadascun dels articles. En segon lloc, es formula la hipòtesi en termes generals; i finalment, es presenta el que anomenem hipòtesi operativa, que és la que es posa a prova empíricament en cadascun dels quatre articles.

El tabac és el factor de risc més ben establert per l'ADP, i carcinògens del tabac, com les nitrosamines, són presents en el teixit pancreàtic; alhora, les mutacions en l'oncogèn K-*ras* són presents en més del 80% dels casos d'aquesta neoplàsia.

Hipòtesi general 1: els carcinògens del tabac poden ser un dels factors causals de les mutacions en l'oncogèn K-*ras* en pacients amb ADP.

Hipòtesi operativa 1: el consum de tabac és més freqüent en els casos d'ADP amb mutacions en l'oncogèn K-*ras* que en els casos d'ADP sense mutacions en aquest oncogèn.

Els agents químics ambientals són biotransformats i metabolitzats dins de l'organisme per enzims específics, entre ells els de la família dels citocroms P450, que generen productes capaços d'unir-se al DNA formant adductes; aquests adductes poden ser els responsables de les mutacions activadores en l'oncogèn K-*ras*.

Hipòtesi general 2: els polimorfismes en el gen *CYP1B1* codifiquen variants de l'enzim amb diferent eficiència en la metabolització de carcinògens que poden ser l'origen de les mutacions activadores en l'oncogèn K-*ras*; així doncs, els pacients d'ADP portadors de diferents variants del gen *CYP1B1* poden tenir diferent risc de mutacions en l'oncogèn K-*ras*.

Hipòtesi operativa 2: els genotips de *CYP1B1* dels pacients d'ADP són diferents en els casos amb i sense mutacions en l'oncogèn K-*ras*.

Els antecedents patològics de DM-2 o de PC es consideren factors de risc per a l'ADP; a més, les mutacions en l'oncogèn K-ras són presents en més d'un 80% dels casos d'ADP i en estadis molt inicials del procés carcinogènic.

Hipòtesi general 3: la DM-2 i la PC, prèvies al diagnòstic de l'ADP, generen en el pàncrees determinades alteracions fisiològiques, cel·lulars i moleculars que poden afavorir la prevalença de mutacions en l'oncogèn K-ras.

Hipòtesi operativa 3: els antecedents de DM-2 i de PC són més freqüents en els casos d'ADP amb mutacions en l'oncogèn K-ras que en els casos d'ADP sense mutacions en aquest oncogèn.

No està clarament establert el paper del consum d'alcohol en la carcinogènesi pancreàtica, però són coneguts els potencials efectes carcinogènics i mutagènics tant de l'etanol com de l'acetaldehid.

Hipòtesi general 4: l'etanol o els seus metabòlits poden ser un dels factors causals de les mutacions en l'oncogèn K-ras en pacients amb ADP.

Hipòtesi operativa 4: el consum d'alcohol és més freqüent en els casos d'ADP amb mutacions en l'oncogèn K-ras que en els casos d'ADP sense mutacions en aquest oncogèn.

2.2. Objectiu general

L'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral és analitzar l'associació entre diferents factors clínics, genètics i ambientals (com ja hem dit, aquests darrers inclouen també factors relacionats amb els estils de vida) i la prevalença de mutacions en el codó 12 de l'oncogèn *K-ras* en pacients amb ADP.

2.3. Objectius específics

- Analitzar la relació entre el consum de tabac al llarg de la vida (tenint en compte la quantitat, la durada, el tipus de tabac o el patró inhalatori, entre d'altres) i la prevalença de mutacions en l'oncogèn *K-ras* en pacients amb ADP.
- Descriure la distribució i la freqüència dels polimorfismes en els loci m1 i m2 del gen *CYP1B1* en pacients amb ADP.
- Analitzar la relació entre els polimorfismes en els loci m1 i m2 del gen *CYP1B1* i la prevalença de les mutacions en l'oncogèn *K-ras* en pacients amb ADP.
- Analitzar la relació entre determinats antecedents patològics (diabetis, pancreatitis i úlcera pèptica, entre d'altres) i la prevalença al diagnòstic de les mutacions en l'oncogèn *K-ras* en pacients amb ADP.
- Analitzar la relació entre el consum d'alcohol al llarg de la vida (tenint en compte la quantitat, la durada, el tipus d'alcohol o la dependència del consum, entre d'altres) i la prevalença de mutacions en l'oncogèn *K-ras* en pacients amb ADP.

3. METODOLOGIA GENERAL

En els articles que formen el nucli de la tesi es descriu, amb el grau de detall habitual en els articles científics, la metodologia específica emprada en cadascun dels corresponents estudis. És per aquest motiu que aquest capítol presenta només un resum dels aspectes més rellevants de l'estudi PANKRAS II (el procés de selecció de pacients, la realització de les entrevistes, o les variables d'estudi, per exemple) i dels mètodes comuns en totes les anàlisis realitzades; fem èmfasi en trets generals de l'estudi i del seu context, que normalment no tenen gaire espai en les revistes científiques.

3.1. L'estudi PANKRAS II

La tesi s'emmarca en el projecte PANKRAS II, un estudi multicèntric prospectiu sobre l'epidemiologia clínica i molecular de la patologia pancreàtico-biliar. El treball de camp del PANKRAS II es va iniciar l'any 1992 i el seu objectiu principal era analitzar el paper de les mutacions en l'oncogèn *K-ras* i el gen supressor de tumors *TP53* (entre d'altres alteracions genètiques), en el diagnòstic, el pronòstic i l'etiologia del càncer de pàncrees exocrí, així com en altres patologies pancreàtiques i del sistema biliar [130,131].

Els objectius primaris que l'estudi PANKRAS II es va plantejar en el seu inici van ser els següents:

- avaluar la utilitat de la detecció de mutacions en el primer exó del proto-oncogèn *K-ras* i de mutacions en el gen que codifica la proteïna p53 com a proves diagnòstiques del càncer de pàncrees exocrí (CPE) i del càncer del sistema biliar extrahepàtic (CSBE);
- analitzar el valor pronòstic de les alteracions genètiques en l'oncogèn *K-ras* i en el gen supressor de tumors *TP53* en els pacients amb aquestes neoplàsies;
- analitzar la prevalença de les alteracions genètiques en l'oncogèn *K-ras* i en el gen *TP53* en funció de les característiques biològiques i clíniques dels tumors; i finalment,
- estudiar l'associació entre les alteracions genètiques en l'oncogèn *K-ras* i el gen *TP53* i el consum de tabac, el consum d'alcohol, la dieta (per grups d'aliments) i determinades exposicions laborals entre els casos de CPE i CSBE.

El projecte PANKRAS II ha generat fins al moment una àmplia producció científica (veure **Annex 1**); però queden encara molts aspectes en els que pot aportar coneixement. L'estudi ens ofereix un gran ventall de possibilitats i informació clínica, biològica i ambiental molt valuosa per posar a prova hipòtesis científiques amb rellevància clínica, biològica, sanitària i social [29].

En l'**Annex 1** es presenta la llista completa de publicacions derivades dels estudis PANKRAS I i II, en les quals s'han descrit amb detall els mètodes i les estratègies d'anàlisi de les diverses components de l'estudi.

3.2. Selecció de pacients

Del febrer de 1992 al juliol de 1995 es van reclutar prospectivament pacients de 5 hospitals generals de Catalunya, el País Valencià i les Illes Balears; concretament, de l'Hospital del Mar de Barcelona, l'Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona, l'Hospital Mútua de Terrassa, l'Hospital Son Dureta de Mallorca i l'Hospital General Universitari d'Eix. Es van seleccionar aquells casos que ingressaven amb sospita de diagnòstic de càncer de pàncrees exocrí (CPE), càncer del sistema biliar extrahepàtic (CSBE), pancreatitis crònica (PC) o patologia pancreàtica benigna (PPB) [120-123,130-141].

Un total de 602 pacients van ser inclosos a l'estudi PANKRAS II, els diagnòstics principals dels quals van ser els següents: 185 casos amb càncer de pàncrees exocrí o adenocarcinoma ductal de pàncrees, 128 casos amb càncer del sistema biliar extrahepàtic, 169 casos amb patologia pancreàtica benigna (dels quals 119 eren pacients amb pancreatitis crònica), 54 casos amb patologia benigna de la vesícula biliar i dels ductes biliars extrahepàtics, 19 casos amb altres patologies benignes i, finalment, 47 casos amb altres neoplàsies (**Figura 4; Annex 2**). A més, a l'Hospital del Mar es va recollir un grup control format per 29 individus ingressats per patologies benignes, sense relació amb cirurgia digestiva i amb patologies no relacionades amb el consum d'alcohol o tabac; aquests controls es van aparellar per edat i sexe amb els casos de CPE [120,121].

En l'**Annex 2** es presenten els grans grups diagnòstics dels pacients de l'estudi PANKRAS II.

Tots els casos van ser revisats independentment pels patòlegs de referència de l'estudi, que en desconeixien el diagnòstic original [136,137]. L'estadi tumoral al diagnòstic es va classificar d'acord el sistema *Tumour-Node-Metastasis* (TNM) [142,143]; el tipus histològic dels tumors es va assignar segons la classificació

internacional de malalties oncològiques (*International Classification of Diseases for Oncology*) [139,144,145].

Concretament, la distribució dels tipus histològics dels 185 casos de CPE és la següent:

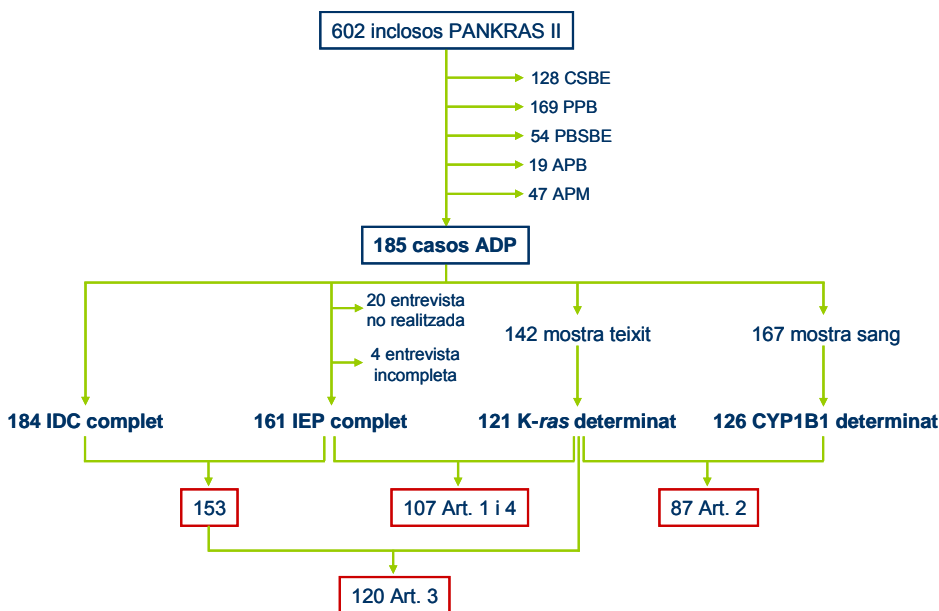
- 108 casos amb adenocarcinoma metastàtic.
- 4 casos amb adenocarcinoma mucinós.
- 2 casos amb adenocarcinoma papil·lar.
- 2 casos amb cistadenocarcinoma metastàtic.
- 2 casos amb cistadenocarcinoma mucinós.
- 9 casos amb carcinoma metastàtic.
- 1 cas amb carcinoma adenoescamos.
- 3 casos positius per cèl·lules malignes però amb el tipus histològic indeterminat.
- 54 casos sense prou evidència per establir amb certesa la histologia del tumor, o bé per falta de mostra de teixit sobre el qual verificar el tipus histològic (com és el cas de 43 pacients), o bé perquè els resultats d'anatomia patològica no van ser consistents (veure **apartat 3.4.1**).

La present tesi doctoral es basa en els 185 pacients amb ADP; més concretament, cadascuna de les anàlisis se centra en un dels diferents subgrups de pacients que descrivim a continuació (veure **Figura 4**), en funció de la informació disponible:

- 161 dels 185 pacients d'ADP (87%) tenen entrevista completa, amb dades sociodemogràfiques, epidemiològiques i clíniques; i, per tant, per aquests casos disposem d'informació sobre els hàbits tòxics (consum de tabac i alcohol).
- 184 dels 185 pacients d'ADP (99%) tenen dades clíniques per a l'estudi dels antecedents patològics (a més, en un 81,7% dels 185 casos es disposa d'informació sobre els antecedents familiars de càncer).
- 142 dels 185 pacients d'ADP (76,8%) tenen material citològic o histològic per a la determinació de mutacions en l'oncogen *K-ras* (descrites més endavant).
- 167 dels 185 pacients d'ADP (90,3%) disposen d'almenys una mostra de sang, que en el cas d'aquesta tesi es va utilitzar per a la identificació dels polimorfismes en el gen *CYP1B1* (descrits més endavant).

- 107 dels 185 pacients d'ADP (57,8%) disposen alhora d'entrevista completa i de l'estat de l'oncògen K-ras determinat, per a l'anàlisi de la relació entre el consum de tabac i alcohol i la prevalença de mutacions en l'oncògen K-ras.
- 120 dels 185 pacients d'ADP (64,9%) disposen alhora de dades clíniques i de l'estat de l'oncògen K-ras determinat, per a l'anàlisi de la relació entre els antecedents patològics i la prevalença de mutacions en l'oncògen K-ras.
- 87 dels 185 pacients d'ADP (47%) disposen alhora dels polimorfismes en els al·lels del gen *CYP1B1* identificats i de l'estat de l'oncògen K-ras determinat, per a l'anàlisi de la relació entre les variants del gen *CYP1B1* i la prevalença de mutacions en l'oncògen K-ras.

Figura 4. Nombre de casos inclosos en cadascuna de les anàlisis realitzades.



CSBE: càncer del sistema biliar extrahepàtic; PPB: patologia pancreàtica benigna; PBSBE: patologia benigna del sistema biliar extrahepàtic; APB: altres patologies benignes; APM: altres patologies malignes; ADP: adenocarcinoma ductal de pàncrees.

IDC: imprès de dades clíniques; IEP: imprès d'entrevista al pacient.

Art. 1-4: cadascun dels articles que formen el nucli de la tesi (Capítol 4: apartats del 4.1 al 4.4).

En l'Annex 3 es presenten les comparacions detallades entre els grups de pacients inclosos i exclosos en cadascun dels estudis. No es van observar diferències estadísticament significatives entre els pacients inclosos i exclosos en un ampli ventall de variables sociodemogràfiques, clíniques i

epidemiològiques, com ara les següents: sexe, educació, classe social, ocupació, hospital d'ingrés, durada de l'entrevista, estadi tumoral, símptomes, antecedents patològics (diagnòstic previ de pancreatitis, diabetis mellitus, colelitiasis, colecistitis o úlcera pèptica), ingesta calòrica, i consum de cafè, tabac i alcohol. L'única excepció rellevant és que els pacients amb mutacions en l'oncogen K-*ras* determinades són més joves: la seva mitjana d'edat és de 64,5 anys, mentre que la mitjana d'edat dels casos exclosos és de 71,2 anys (veure **Annex 3**) [120,121].

Els Comitès Ètics de cadascun dels hospitals participants van aprovar el protocol de l'estudi; tots els pacients van donar el seu consentiment informat per ser inclosos en l'estudi. L'obtenció de mostres biològiques es realitzava alterant el mínim possible el procés diagnòstic habitual en cadascun dels hospitals participants. El tipus d'informació que es donava als pacients, així com la manera com era transmesa a aquests, va ser la que utilitzava cada hospitals en la seva pràctica diària. Es demanava el consentiment informat als pacients per respondre les entrevistes; l'entrevistador es presentava i feia una breu descripció de l'estudi per demanar al pacient i/o als familiars la seva col·laboració. Tota la informació obtinguda dels pacients era considerada com estrictament confidencial.

3.3. Informació clínico-patològica i entrevistes als pacients

Durant l'ingrés hospitalari, els pacients van ser entrevistats per monitors entrenats. El qüestionari que administraven estava estructurat per obtenir informació sociodemogràfica, ambiental (que inclou estils de vida com el consum de tabac, alcohol i cafè, dieta, ocupacions laborals, etc.) i clínica (simptomatologia, antecedents patològics i familiars, entre d'altres) dels pacients [120-123,135]; es recollia així, informació detallada sobre el consum de tabac i alcohol en cada període de la vida dels pacients, incloent canvis en el tipus o la quantitat de producte consumit. Les entrevistes van ser completades en tots els casos per més del 85% dels pacients [120-123,136,140]. Quan el propi pacient no podia respondre directament a causa del seu estat, ho feia un familiar. Per avaluar la fiabilitat de les entrevistes, una mostra de 110 familiars van ser entrevistats al mateix temps i per separat sobre la història clínica i els hàbits dels pacients; la concordança entre les dues respostes va ser d'aproximadament un 80% [141]. Paral·lelament a les entrevistes, es van recollir dades clínico-patològiques sobre el procés diagnòstic, terapèutic i de seguiment

dels pacients, a partir de la revisió de les històries clíniques, les analítiques i les diferents proves diagnòstiques [136,137].

A continuació presentem un resum de les dades que es van recollir, tant pel que fa al consum de tabac i alcohol, com per als antecedents patològics i la història mèdica dels pacients; a més, en cadascun dels articles que formen el nucli de la tesi, així com en altres publicacions derivades de l'estudi PANKRAS II (**Annex 1**), s'explica amb detall quina era i com es recollia aquesta informació.

Es va recollir informació detallada sobre el consum de tabac i alcohol en tots els períodes de la vida del pacient. Es preguntava pel nombre de cigarrets, cigars o pipes fumats al dia i les corresponents dates d'inici i fi; es recollia el tipus de tabac fumat (negre o ros) i el patró inhalatori (boca, coll o profund) per cadascun dels períodes de consum. Es va definir la variable "paquets-anys" a partir del producte del nombre d'anys de fumador i la mitjana del nombre de paquets de cigarrets fumats per dia. Es va establir el temps que feia que el pacient havia deixat de fumar en aquells casos que informaven haver-ho deixat almenys un any abans del diagnòstic de l'ADP.

De la mateixa manera, es va obtenir la quantitat i el tipus d'alcohol que consumia l'individu per setmana, amb les corresponents dates d'inici i fi. Es van incloure diferents tipus de begudes alcohòliques, entre elles diferents tipus de cervesa, vi i begudes destil·lades (cervesa lleugera, mitjana i fermentada, vi i vi escumós, cava, sidra, vermut, licor, conyac, whisky, ginebra i rom, entre d'altres). Els grams d'alcohol consumits van ser estimats independentment per cadascun dels diferents tipus de begudes alcohòliques i, a partir d'aquí, es va calcular la quantitat d'alcohol consumida al llarg de la vida. El consum d'alcohol es va codificar en 4 categories: no bevedors, per als que mai havien consumit alcohol; bevedors esporàdics o ocasionals, quan la quantitat d'alcohol consumida no era quantificable; bevedors moderats, per consums d'alcohol inferiors a 280 grams per setmana en dones i menys de 560 grams per setmana en homes; i finalment, els bevedors intensos (*heavy drinkers*), quan l'alcohol consumit per setmana era superior o igual a 280 i 560 grams en dones i homes respectivament. Es van calcular els anys d'abstinència com la diferència entre l'edat a l'ingrés i l'edat al final del període de consum d'alcohol. La dependència de l'alcohol es va estimar a partir de la quantitat (grams per setmana), la durada (anys) i el sexe del pacient, i es va classificar en no dependència o abstinent (menys de 70 i 140 grams per setmana en dones i homes respectivament), dependència intermèdia (més de 70 grams per setmana en dones i 140 en homes, per un període inferior a 10 anys) i dependència crònica (més de 70

grams per setmana en dones i 140 en homes, per un període superior a 10 anys) [114,120-123].

El qüestionari també incloïa seccions sobre la història familiar de càncer i els antecedents patològics de diabetis mellitus, pancreatitis crònica i aguda, colelitiasis, colecistitis, úlcera pèptica i al·lèrgies. Es registraven a més, les dates d'inici, del diagnòstic, de la freqüència i del tractament que el pacient rebia per cadascun d'aquests antecedents [120,122,135,136,140]. D'altra banda, els metges de l'estudi van resumir, en un formulari específic, i a partir de la història clínica dels pacients, la informació detallada sobre els símptomes, l'examen físic en el moment de l'ingrés, les proves complementàries, els resultats del laboratori i els antecedents patològics dels pacients per complementar i contrastar la informació obtinguda a partir de les entrevistes [136,138,139,141]. A més, en un estudi específic, es va contactar amb familiars dels pacients, que van ser entrevistats telefònicament per validar la informació disponible en relació a la història familiar de càncer i a altres patologies pancreàtiques [139]. S'identificava als familiars més propers als pacients per tal d'assegurar el seu coneixement en relació als antecedents de càncer, i d'altres malalties, de tota la família. Es contactava el familiar seleccionat per telèfon i se li administrava un qüestionari específic per obtenir informació sobre la història familiar de càncer i d'altres malalties pancreàtiques; es construïa un arbre genealògic (o *pedigree*) per tal d'ajudar, tant al familiar com a l'entrevistador a recollir la informació. La durada mitjana d'aquestes entrevistes va ser de 41 minuts. Es va obtenir informació sobre la història familiar de càncer d'un total de 98 pacients, 33 dels quals tenien almenys un familiar de primer grau amb càncer; 25 pacients en tenien només un, 6 en tenien dos i 2 pacients tenien fins a 3 familiars de primer grau amb càncer. Les localitzacions tumorals van ser estómac, mama, còlon i recte, pulmó, abdomen (no especificat), fetge i pàncrees.

3.4. Anàlisis moleculars

Es van obtenir mostres biològiques per a les posteriors anàlisis moleculars de més del 80% dels pacients inclosos en l'estudi; es van recollir mostres de sang (de la qual se separaven les diferents fraccions: plasma, sèrum, hematies i limfòcits), orina, cabells, ungles i celles. A més, d'aquells casos que eren sotmesos a proves invasives durant el procés diagnòstic o terapèutic, se n'obtenien mostres histològiques i/o citològiques (parafinades i criopreservades) del teixit normal, el tumor primari i el teixit metastàtic; concretament, s'obtenia mostra histològica de pàncrees (benigne i maligne) dels casos que es realitzava

una laparoscòpia o una laparotomia i mostra citològica del pàncrees dels casos que es realitzava una punció-aspiració amb agulla fina per establir el diagnòstic i l'extensió de la malaltia. Totes les mostres van ser emmagatzemades en un banc de mostres biològiques. Dos anatomopatòlegs de referència de l'estudi revisaven i avaluaven en paral·lel les preparacions cito-histològiques que es van utilitzar per al diagnòstic patològic dels pacients. Els tipus de mostres, així com els procediments detallats del procés d'obtenció de les mateixes, s'ha descrit prèviament [121].

Les anàlisis moleculars van incloure, entre d'altres, la detecció de mutacions en els gens *K-ras*, *TP53*, *TP16* i *DPC4*, o l'estudi de polimorfismes en els gens *BRCA2* i *CYP1B1*, tots ells gens potencialment implicats en el procés de carcinogènesi pancreàtica.

3.4.1. Detecció de mutacions en l'oncogèn K-ras

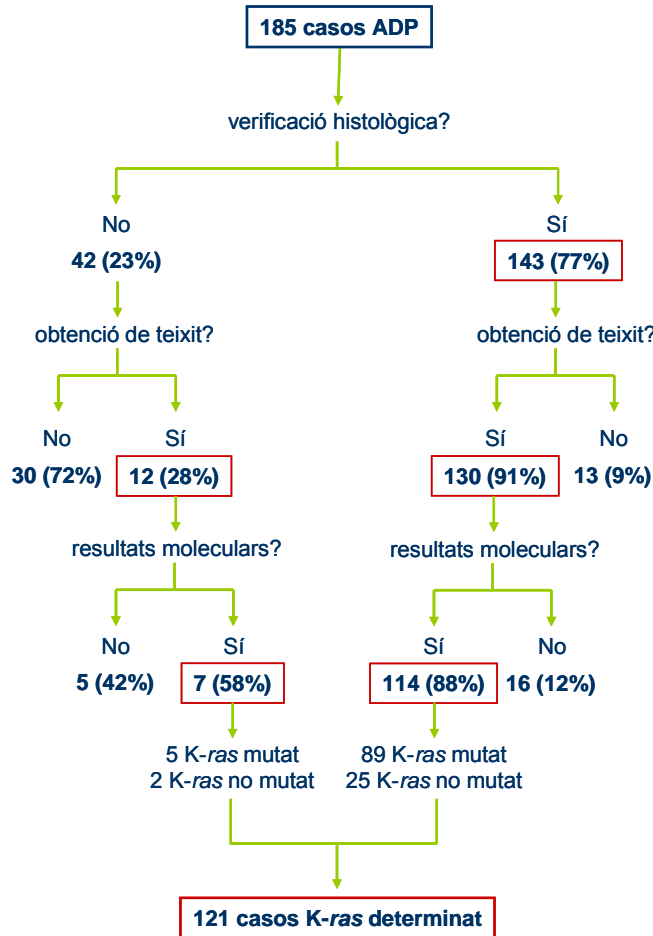
La **Figura 5** mostra el nombre de casos d'ADP dels que es disposava de teixit (parafinat i criopreservat) per la determinació de mutacions en l'oncogèn *K-ras* i dels que finalment es van poder obtenir resultats moleculars.

En més del 75% dels 185 casos d'ADP inclosos en l'estudi, es va verificar histològicament el diagnòstic dels pacients (veure pàgina 27, **apartat 3.2**). D'aquests 143 casos se'n va recollir mostra citològica o histològica que era parafinada i criopreservada. Les mostres de tumors pancreàtics es conservaven en nitrogen líquid després de la ressecció quirúrgica i eren preservades a -70°C fins al moment de les anàlisis.

La mostra era revisada pels anatomopatòlegs de l'estudi; aquests definien les àrees tumorals (zones T) i normals/no tumorals (zones N) mitjançant exploració al microscopi. Cadascuna de les àrees van ser independentment rascades i desparafinades, i el DNA va ser purificat i amplificat.

Posteriorment, es va poder obtenir mostra de teixit de 12 dels 42 casos restants. Així doncs, es va disposar de mostra d'un total de 142 casos d'ADP per a les anàlisis moleculars. La determinació de mutacions en l'oncogèn *K-ras* es va produir amb èxit en 121 dels 142 casos d'ADP dels quals es disposava de mostra citològica o histològica; així doncs, es van obtenir resultats moleculars d'un 65,4% del total de casos d'ADP inclosos en l'estudi (**Figura 5**). Dels 121 casos amb les mutacions en l'oncogèn *K-ras* determinades, més d'un 85% eren adenocarcinomes (veure pàgina 27, **apartat 3.2**).

Figura 5. Disponibilitat i obtenció de mostres parafinades i criopreservades per la determinació de mutacions en l'oncògen K-ras en pacients amb adenocarcinoma ductal de pàncrees.



El protocol detallat de l'anàlisi molecular per a la detecció de mutacions en el codó 12 de l'oncògen K-ras, realitzat a partir de teixit parafinat i mitjançant tècniques de PCR (reacció en cadena de la polimerasa) i RFLP (polimorfismes en la longitud dels fragments de restricció), ha estat descrit prèviament [114,120-123,146,147].

Els fragments de teixit es van desparafinar en xilè i esbandir en etanol al 95%; posteriorment, es van dissecar i escalfar a 95°C durant 10 minuts. La mostra de teixit tumoral es va digerir amb SDS i proteinasa k. L'extracció de DNA es va realitzar mitjançant el tractament amb fenol/cloroform i la posterior precipitació amb etanol. El DNA es va purificar mitjançant un *kit* comercial (LINUS, Cultek, Madrid).

L'amplificació es va realitzar en dues fases per PCR aniuada. Els *primers* i les condicions d'amplificació del DNA estan descrits en estudis anteriors [114,146,147]. La proporció d'amplificació va ser del 98%. Aquesta tècnica és capaç de detectar una cèl·lula mutada entre 10² cèl·lules normals.

En la segona PCR es va introduir una endonucleasa específica, l'enzim de restricció BstNI, el punt de tall del qual permetia diferenciar les seqüències mutades de les no mutades. El producte de l'amplificació, de 103 parells de bases, es va digerir durant tota la nit. Les seqüències normals quedaven dividides en dos fragments, de 82 i 21 parells de bases; en canvi, les seqüències amb mutacions al codó 12 de l'oncogèn K-ras quedaven intactes. Els productes de digestió van ser analitzats mitjançant gels d'electroforesi d'acrilamida tenyits amb bromur d'etidi; la interpretació dels gels la van realitzar alhora 2 investigadors de l'estudi de manera independent, així, si les lectures no coincidien l'anàlisi es repetia.

L'anàlisi es va restringir al codó 12 de l'oncogèn K-ras ja que mutacions en altres codons són molt rares en pacients amb ADP.

Dels 142 casos d'ADP amb mostra histològica i/o citològica es van determinar les mutacions en l'oncogèn K-ras d'un total de 121 casos (86,4%) (**Figura 5**).

3.4.2. Identificació de polimorfismes en el gen CYP1B1

El protocol detallat de l'anàlisi molecular per a la identificació dels polimorfismes en el gen que codifica per l'enzim CYP1B1 ha estat descrit prèviament [148,149].

El DNA es va extreure a partir de leucòcits amb el *kit* d'extracció *QIAamp Blood Kit* (Qiagen, Inc., Chadsworth CA). Es van examinar 2 polimorfismes funcionals del gen *CYP1B1*: al locus m1 el polimorfisme V432L (canvi de l'aminoàcid valina per l'aminoàcid leucina en la posició 432) i al locus m2 el polimorfisme A453S (canvi de l'aminoàcid asparagina per l'aminoàcid serina en la posició 453); a causa de la seva proximitat, només estan separats per 60 parells de bases, es van amplificar per PCR els dos polimorfismes en un sol amplicó amb els *primers* 5'-CCAACACCTCTGTCTTGGGA-3' i 5'-GCTCATTTGGGTTGGCCCTG-3'.

La reacció de seqüenciació es va realitzar mitjançant el *kit BigDye-terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (PE Biosystems, Foster City, CA). I finalment, el genotipat es va dur a terme en un seqüenciador automàtic ABI 377X.

3.5. Anàlisis estadístiques

En els apartats corresponents dels articles es detallen les anàlisis estadístiques realitzades en cada cas; per això en aquest apartat només les descrivim breument.

Les anàlisis realitzades es basen en el disseny cas-cas [120,121,150-153], que representa un mètode molt vàlid i eficient per estudiar interaccions gen-ambient [154,155]. Així, tots els resultats es refereixen als 121 pacients d'ADP amb les mutacions en l'oncogèn *K-ras* determinades; en tot moment es comparen els casos d'ADP amb i sense mutacions en l'oncogèn *K-ras* en relació a les diferents característiques sobre els hàbits de consum de tabac (article 1) i alcohol (article 4), als antecedents patològics (article 3) i als genotips de *CYP1B1* (article 2). En el cas dels articles 1 i 2 es van realitzar anàlisis cas-control per estimar la direcció de les associacions, comparant tots els casos d'ADP amb els 29 controls hospitalaris [120,150].

El càlcul de les freqüències al·lèliques i genotípiques dels loci m1 i m2 del gen *CYP1B1* es va realitzar tant pels casos d'ADP com per als controls hospitalaris (article 2). De la mateixa manera es va comprovar si cadascun dels loci es trobava en condicions d'equilibri de Hardy-Weinberg, tant pel grup de casos d'ADP com pel grup control; es comparaven les freqüències genotípiques observades i les esperades en condicions d'equilibri de Hardy-Weinberg mitjançant el càlcul de la χ^2 [156,157].

No es van detectar diferències estadísticament significatives entre els casos d'ADP amb i sense mutacions en l'oncogèn *K-ras* en tot un seguit de variables importants: edat al diagnòstic del càncer, sexe, educació, estadi tumoral, temps entre el primer símptoma i el diagnòstic del càncer, símptomes, i durada de l'entrevista (per més detalls veure la [Taula 7](#) de l'[Annex 3](#)).

L'anàlisi estadística univariada es va realitzar com és habitual en els estudis epidemiològics [158-162]. En les taules de contingència es va utilitzar el test exacte de Fisher per avaluar la independència entre dues variables categòriques. Per comparar variables contínues es va utilitzar la prova *t* de Student o la prova *U* de Mann Whitney, en funció de si les variables d'interès seguien o no la distribució normal, respectivament.

Per estimar la magnitud de les associacions es van calcular *odds ratio* (OR; raó d'*odds*), crues i ajustades, segons l'anàlisi, i els seus corresponents intervals de confiança (IC) al 95% mitjançant regressió logística no condicional [159,160]. Es va analitzar si les variables categòriques ordinals seguien una relació de dosi-resposta mitjançant la prova d'extensió anàloga multivariable de Mantel (mètode

de tendència de proporcions) [158,161]; quan no s'observava aquesta tendència lineal, s'aplicava la prova de Wald [162].

Els models bàsics inclouen, generalment, l'edat i el sexe com a possibles confusors; s'afegien a aquest model altres possibles variables confusores si alteraven significativament les estimacions. Les variables d'ajust són específiques per a cadascuna de les anàlisis; podien incloure el consum de tabac, alcohol o cafè, o els antecedents de pancreatitis crònica, segons l'estudi, com es pot veure en cadascun dels articles.

Els models finals es triaven de manera coherent amb la naturalesa de les variables i dels objectius de cada estudi. Es va fixar el nivell de significació estadística a 0,05, i totes les proves són bilaterals.

Les anàlisis estadístiques es van realitzar amb els paquets estadístics SPSS, versió 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) i SAS, versió 9.1 (SAS Institute, Inc, Cary, NC).

4. RESULTATS

En aquest capítol es presenten les 4 publicacions que formen el nucli de la tesi. Cadascun dels articles va precedir d'un resum i d'una breu descripció dels resultats més destacats. Els quatre articles que incloem estan ja publicats en revistes internacionals.

Les referències dels articles són les següents:

Crous-Bou M, Porta M, López T, Jariod M, Malats N, Alguacil J, Morales E, Fernández E, Corominas JM, Carrato A, Guarner L, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Lifetime history of tobacco consumption and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *Pancreas* 2007; 35: 135-141.

Crous-Bou M, De Vivo I, Porta M, Pumarega JA, López T, Alguacil J, Morales E, Malats N, Rifà J, Hunter DJ, Real FX for the PANKRAS II Study Group. CYP1B1 polymorphisms and K-ras mutations in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Digestive Diseases and Sciences* 2008; 53: 1417-1421.

Crous-Bou M, Porta M, Morales E, López T, Carrato A, Puigdomènech E, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Past medical conditions and K-ras mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Causes and Control* 2009; 20 (en premsa).

Crous-Bou M, Porta M, López T, Jariod M, Malats N, Morales E, Guarner L, Rifà J, Carrato A, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Lifetime history of alcohol consumption and K-ras mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2009; 50 (en premsa).

4.1. Article 1: Consum de tabac i mutacions en l'oncogèn K-ras en pacients amb adenocarcinoma ductal de pàncrees

4.1.1. Resum

Tot i que el tabac és el factor de risc més ben establert per a l'ADP i que les alteracions en l'oncogèn K-ras són les mutacions més freqüents en un oncogèn en pacients amb aquesta neoplàsia, no està clar el paper del consum de tabac en la prevalença de mutacions en l'oncogèn K-ras en pacients amb ADP; els resultats de l'associació entre els dos factors són inconsistents.

L'objectiu de l'estudi va ser analitzar la relació entre el consum de tabac al llarg de la vida i la prevalença de mutacions al codó 12 de l'oncogèn K-ras en pacients amb ADP.

Es van identificar prospectivament els casos incidents d'ADP i es van entrevistar durant l'ingrés hospitalari; entre d'altres factors, es preguntava pels seus hàbits de consum de tabac al llarg de tota la vida (la quantitat, la durada, el tipus de tabac o el patró inhalatori, entre d'altres). Es van utilitzar models de regressió logística exacta per comparar els casos de d'ADP (N=107) amb i sense mutacions en l'oncogèn K-ras en un estudi cas-cas.

Els casos mutats havien estat no fumadors amb més freqüència que els no mutats, tot i que les diferències no són estadísticament significatives: la OR ajustada per edat i sexe va ser de 0,54 (IC 95%: 0,10-2,69; $p=0,613$). Respecte als no fumadors, les OR dels ex-fumadors i fumadors actuals van ser 0,79 i 0,36 respectivament ($p=0,193$). Els paquets-anys fumats, els anys de fumador i els cigarrets fumats per any també tendien a ser superiors en els casos sense la mutació. Ni l'edat a l'inici del consum de tabac, ni el temps entre que el pacient havia deixat de fumar i el diagnòstic, es van associar amb la prevalença de mutacions en l'oncogèn K-ras.

Tot i que el tabac té un paper causal important en l'ADP, aquest no està implicat en l'adquisició de mutacions en l'oncogèn K-ras en l'epiteli pancreàtic.

4.1.2. Principals troballes

No hem observat cap associació positiva entre les variables que representen el consum de tabac al llarg de la vida i la prevalença al diagnòstic de les mutacions al codó 12 de l'oncogèn K-*ras* en els pacients amb ADP. De fet, la majoria de les anàlisis mostren una tendència inversa, encara que de manera molt dèbil i no significativa: els casos d'ADP que presenten tumors sense mutacions en l'oncogèn K-*ras* tendeixen a fumar lleugerament més que els pacients amb mutacions en aquest oncogèn.

A més, ni tan sols els casos d'ADP en què l'edat d'inici del consum de tabac és anterior, els que fumaven més quantitat de cigarrets i durant períodes més llargs de temps, o aquells que tendien a inhalar més profundament el fum del tabac, tenen un risc augmentat de tenir tumors amb mutacions en l'oncogèn K-*ras* respecte a aquells pacients que van començar a fumar més tard, que fumaven menys quantitat i durant períodes més curts de temps, o els que no inhalaven el fum del tabac, respectivament. La freqüència de mutacions no es veu influenciada ni pel període anterior al diagnòstic en què s'ha fumat, ni per l'edat del pacient mentre fumava.

Els resultats de l'estudi cas-cas i els de l'estudi cas-control són coherents entre ells. D'acord amb els resultats que han publicat altres estudis anteriors al nostre, el conjunt de casos amb ADP fumen més que els controls; de la mateixa manera, cadascun dels grups de casos per separat (els casos d'ADP amb i sense mutació en l'oncogèn K-*ras*) també fumen més que els controls. Així doncs, tal i com està descrit en la literatura, el consum de tabac és també un factor de risc per la nostra sèrie de casos. Les ORs en les categories més altes d'exposició són majors en la comparació entre els no mutats i els controls, respecte a la comparació entre els mutats i els controls.

Tot i que tant el tabac com les mutacions en l'oncogèn K-*ras* juguen un paper important en l'etiologia de l'ADP, els nostres resultats indiquen que els dos processos actuen de manera independent en el procés de carcinogènesi pancreàtica.

ARTICLE 1

Crous-Bou M, Porta M, López T, Jarrod M, Malats N, Alguacil J, Morales E, Fernández E, Corominas JM, Carrato A, Guarner L, and Real FX for the PANKRAS II Study Group. Lifetime history of tobacco consumption and K-*ras* mutations in exocrine pancreatic cancer. *Pancreas* 2007; 35: 135-141.

Lifetime History of Tobacco Consumption and K-*ras* Mutations in Exocrine Pancreatic Cancer

Marta Crous-Bou, BS,*† Miquel Porta, MD, PhD,*† Tomàs López, BS,* Manuel Jariod, MD,*‡
 Núria Malats, MD, PhD,* Juan Alguacil, MD, PhD,*§ Eva Morales, MD, PhD,*
 Esteve Fernandez, MD, PhD,||¶ Josep M. Corominas, MD, PhD,†# Alfredo Carrato, MD, PhD,**
 Luisa Guarner, MD, PhD,†,†† and Francisco X. Real, MD, PhD,*¶¶ For the PANKRAS II Study Group

Objectives: We analyzed the relation between mutations in codon 12 of the K-*ras* oncogene and lifetime consumption of tobacco in patients with exocrine pancreatic cancer (EPC).

Methods: Incident cases of EPC were prospectively identified and interviewed during hospital admission about smoking and other factors. Exact logistic regression was used to compare EPC cases (N = 107) with and without K-*ras* mutations (case-case study).

Results: Mutated cases were nonsignificantly less likely to have been smokers than wild-type cases: the odds ratio adjusted by age and sex was 0.54 (95% confidence interval, 0.10–2.69; $P = 0.613$). With respect to never smokers, adjusted odds ratios for former and current smokers were 0.79 and 0.36, respectively ($P = 0.193$). Pack-years smoked, years of smoking, and cigarettes smoked per year also tended to be higher in nonmutated than in mutated cases. Neither age at onset of smoking nor the time between quitting and diagnosis were associated with K-*ras*.

Conclusions: Tobacco does not play a major part in the acquisition of K-*ras* mutations in the pancreatic epithelium. Although both smoking and K-*ras* mutations have important roles in the etiopathogenesis of EPC, the 2 processes may act independently.

Key Words: pancreatic neoplasms, etiology, smoking, tobacco, K-*ras* oncogene, *ras* genes

Abbreviations: CI - confidence interval, EPC - exocrine pancreatic cancer, OR - odds ratio, PanIN - pancreatic intraductal neoplasia, PDA - pancreatic ductal adenocarcinoma

(*Pancreas* 2007;35:135–141)

The primary prevention of exocrine pancreatic cancer (EPC) is severely hampered by limited knowledge on its etiology.^{1–4} Tobacco carcinogens are found in the pancreas,^{5,6} and smoking is the most firmly established cause of EPC,^{2–6} although it explains only a fraction of cases.^{7–9} Activating point mutations in the K-*ras* oncogene is one of the fundamental genetic events leading to pancreatic intraductal adenocarcinomas.^{1–4,10–12} Oncogenic K-*ras* activation can result in a wide variety of responses ranging from the activation of a senescence program to increased cell proliferation and inhibition of apoptosis, depending on the cellular and molecular context.^{10,12} At diagnosis, about 80% of pancreatic adenocarcinomas harbor mutations in codon 12 of K-*ras*.^{1–4,10–13} *Ras* genes are critical targets for chemical carcinogens.^{1,13–16} K-*ras*-mutated and wild-type cancers may develop through pathways involving different gene-environment interactions.^{1–4,13,17} Although mutations in K-*ras* are the most frequent abnormality of oncogenes in human cancer,^{10–12} the potential lifestyle and environmental influences on their occurrence and persistence are largely unknown.^{13,18}

In pancreatic cancer, evidence on the relationship between the most common risk factor—smoking—and the most common molecular alteration—K-*ras* mutations—is scarce and inconsistent.^{19–23} Although methodological features of studies may partly explain the heterogeneous results, biologic reasons may also support a lack of association. They include variation in risk factors for different cancer histological types, which in turn show different patterns of genetic alterations. Specifically, in EPC, some 90% of tumors are intraductal adenocarcinomas;^{1–4,10–13} in other cancers, adenocarcinomas are more weakly related to tobacco consumption than other histological types. For instance, in lung cancer, the relation with smoking is weaker for adenocarcinomas than for squamous cell carcinomas and small cell carcinomas,^{24–27} whereas adenocarcinomas show the highest

Received for publication November 2, 2006; accepted March 8, 2007.

From the *Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Barcelona; †School of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona; ‡Universitat Rovira i Virgili, Tarragona; §Universidad de Huelva, Huelva; ||Institut Català d'Oncologia, L'Hospitalet de Llobregat, Catalonia; ¶Universitat Pompeu Fabra, Barcelona; #Hospital del Mar, Barcelona; **Hospital Universitario de Elche, Universidad Miguel Hernández, Alacant; and ††Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

Members of the Multicentre Prospective Study on the Role of K-*ras* and Other Genetic Alterations in the Diagnosis, Prognosis and Etiology of Pancreatic and Biliary Diseases (PANKRAS II) Study Group are mentioned in previous publications.

Supported by research grants from Ministerio de Ciencia y Tecnología (CICYT SAF 2000-0097); Fondo de Investigación Sanitaria (95/0017), Madrid; Generalitat de Catalunya (CIRIT SGR 0241, SGR 0078, and 1998/BEAi 400011); Red temática de investigación cooperativa de centros en Cáncer (C03/10); Red temática de investigación cooperativa de centros en Epidemiología y salud pública (C03/09); and CIBER de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Health, Madrid, Spain.

Reprints: Miquel Porta, MD, PhD, Clinical and Molecular Epidemiology of Cancer Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Universitat Autònoma de Barcelona, Carrer del Dr. Aiguader 88, E-08003 Barcelona, Spain (e-mail: mporta@imim.es).

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins

frequency of *K-ras* mutations of the 3 histological types.^{28–30} Evidence is also weak for a relation between *K-ras* mutations and smoking in other human neoplasias.^{18,29,31} The causal link between smoking and risk of EPC could be due to tobacco carcinogens causing alterations in genes other than *K-ras* that are also important in the etiopathogenesis of this neoplasm.

The main objective of the present study was to analyze the association between mutations in codon 12 of the *K-ras* oncogene and the lifetime history of tobacco smoking in patients with EPC.

MATERIALS AND METHODS

Selection of Patients

Methods have been previously described in detail.^{1,14–16,32–34} Briefly, subject recruitment took place between 1992 and 1995 at 5 general hospitals in the eastern mediterranean part of Spain, where 185 incident cases of EPC were prospectively identified. At one of the hospitals, 29 controls were included; they had been admitted for benign, nondigestive disorders unrelated to tobacco and alcohol consumption and were individually matched to pancreatic cancer cases by age and sex.¹ The present report is based on 107 EPC patients with known *K-ras* status and with information about smoking. There were no significant differences between them and the remaining cases with respect to education, social class, sex, occupation, hospital, tumor stage, duration of the interview, caloric intake, and consumption of coffee, tobacco, and alcohol, except that the included cases were slightly younger.^{1,14} The ethics committees of participating hospitals approved the study protocol, and patients gave informed consent to be included in the study.

Personal Interviews and Information on Smoking

A structured form was used to collect clinicopathologic information from medical records, including details on diagnostic procedures, laboratory results, and follow-up care.^{33,34} More than 88% of the patients were interviewed face-to-face by trained monitors during hospital stay, close to the time of diagnosis. Interviews included questions about clinical history, symptoms, occupation, diet, and coffee, alcohol, and tobacco consumption.^{1,14–16,32} Detailed information was thus obtained on smoking for all periods of life; for example, the number of cigarettes, cigars, or pipes smoked per day was elicited with the corresponding dates of initiation and ending, and so were the type of tobacco (black, blond), cigarettes' brands, and the inhalation pattern for each period of consumption. Pack-years were estimated by multiplying the number of years of smoking by the average number of packs of cigarettes smoked per day. Time between quitting smoking and diagnosis was defined for subjects who reported quitting ≥ 1 year before diagnosis.

Detection of *K-ras* Mutations

Details of laboratory protocols have also been described elsewhere.^{1,14–16,21} Briefly, mutations in codon 12 of *K-ras*

oncogene were studied using DNA extracted from paraffin-embedded tumor tissue. Amplifications were done in 2 steps by nested polymerase chain reaction; an artificial *Bst*NI restriction endonuclease site was introduced to discriminate between wild-type and mutated *K-ras* codon 12 sequences. Products were analyzed by acrylamide gel electrophoresis and ethidium bromide staining. This technique was able to detect 1 homozygous mutated cell in the presence of 10^2 normal cells. To characterize the nucleotide substitution in codon 12, all mutated samples were further analyzed using a similar restriction fragment length polymorphism-based approach. Interpretation of digestion products' electrophoresis was performed independently by 2 investigators to confirm the results.

Data Analysis

In the case-case study,³⁵ we compared the smoking history of the 83 cases of EPC with a *K-ras* mutated tumor and of the 24 cases of EPC whose tumors did not harbor such mutations. To estimate the direction of the case-case association, case-control analyses compared all 107 cases of EPC with the 29 hospital controls.^{1,35} Univariate statistics were computed as customary.^{36–38} In contingency tables, Fisher exact test for homogeneity or independence was applied to assess the relationship between 2 categorical variables. For comparisons between continuous variables, Mann-Whitney *U* test was used. These analyses were performed using Statistical Product and Service Solutions, version 12.0 (SPSS Inc, Chicago, Ill). To estimate the magnitude of the associations, multivariate-adjusted odds ratios (ORs) and their corresponding 95% confidence intervals (CIs) were calculated by unconditional exact logistic regression. Categorical ordinal variables were analyzed for a linear dose-response relation through the multivariate analogue of Mantel extension test; when a linear trend was not apparent, the exact probability test was used.^{35–38} These analyses were conducted with Statistical Analysis Software, version 9.1 (SAS Institute, Inc, Cary, NC). Tobacco and coffee consumption were positively associated.¹⁴ Age, sex, and coffee consumption were included in the models as potential confounders. Allowance for other possible confounding variables as alcohol consumption did not materially alter the estimates. The level of statistical significance was set at 0.05, and all tests are 2-tailed.

RESULTS

Patients with a *K-ras* mutated tumor were nonsignificantly less likely to have been ever smokers than wild-type cases: the age and sex adjusted OR was 0.54 (95% CI, 0.10–2.69; $P = 0.613$); the OR further adjusted by coffee consumption was 0.46 (95% CI, 0.07–2.51; $P = 0.505$) (Table 1). More than 73% of ever smokers had smoked for more than 30 years. As compared with never smokers, the OR for former smokers was 0.79, and for current smokers, 0.36 ($P = 0.193$). Pack-years smoked, years of smoking, and cigarettes smoked per day were also nonsignificantly higher in wild-type cases. When coffee consumption was adjusted for, the vast majority of ORs moved further away from the null value of one (Table 1); this was due to coffee being positively associated with both smoking and *K-ras*

TABLE 1. Main Characteristics of Smoking History Among Cases of EPC With and Without Mutations in Codon 12 of the K-ras Oncogene

	K-ras*			Adjusted OR†			Adjusted OR‡		
	Mutated	Wild-Type	P	OR	(95% CI)	P§	OR	(95% CI)	P§
Smoking status									
Never	37 (44.6)	9 (37.5)	0.719	1.00		0.390	1.00		0.193
Former	16 (19.3)	4 (16.7)		0.73	(0.08–6.23)		0.79	(0.08–7.67)	
Current	30 (36.1)	11 (45.8)		0.49	(0.09–2.54)		0.36	(0.05–2.09)	
Pack-years									
Median	33.3	47.4	0.327¶						
Never pack-years	37 (44.6)	9 (37.5)	0.498	1.00		0.118	1.00		0.047
<28.24 pack-years	16 (19.3)	3 (12.5)		0.83	(0.10–7.99)		0.81	(0.03–8.94)	
28.24–49 pack-years	17 (20.5)	5 (20.8)		0.56	(0.08–3.66)		0.40	(0.05–3.00)	
>49 pack-years	13 (15.7)	7 (29.2)		0.26	(0.03–1.94)		0.18	(0.02–1.59)	
Years of smoking									
Median	38.5	42.0	0.479¶						
Never	37 (44.6)	9 (37.5)	0.799	1.00		0.416	1.00		0.234
≤30 yrs	13 (15.7)	3 (12.5)		0.77	(0.11–6.54)		0.70	(0.09–6.87)	
31–45 yrs	19 (22.9)	8 (33.3)		0.32	(0.03–2.30)		0.21	(0.02–1.87)	
>45 yrs	14 (16.9)	4 (16.7)		0.45	(0.04–4.42)		0.28	(0.02–3.36)	
Age at onset									
Median	16.5	16.0	0.217¶						
Never	37 (44.6)	9 (37.5)	0.735	1.00		0.195	1.00		0.090
≥30 yrs	6 (7.2)	1 (4.2)		1.08	(0.09–57.98)	0.526#	0.83	(0.07–45.94)	0.257#
16–29 yrs	25 (30.1)	7 (29.2)		0.47	(0.05–3.38)		0.41	(0.04–3.42)	
≤15 yrs	15 (18.1)	7 (29.2)		0.29	(0.03–2.18)		0.18	(0.02–1.62)	
Time between quitting smoking and diagnosis									
Median	0.0	0.0	0.547¶						
Never smoker	37 (44.6)	9 (37.5)	0.873	1.00		0.391	1.00		0.174
≥10 yrs before diagnosis	7 (8.5)	2 (8.3)		0.65	(0.05–11.17)	0.815#	0.86	(0.06–16.39)	0.494#
1–10 yrs before diagnosis	9 (10.8)	2 (8.3)		0.77	(0.07–12.38)		0.70	(0.05–12.43)	
Current smoker	30 (36.1)	11 (45.8)		0.50	(0.09–2.55)		0.36	(0.05–2.09)	
Type of tobacco									
Never smoker	37 (44.6)	9 (37.5)	0.871	1.00		0.873#	1.00		0.863#
Only black	25 (30.1)	10 (41.7)		0.54	(0.11–2.57)		0.46	(0.08–2.43)	
Only blond	11 (13.3)	3 (12.5)		0.81	(0.13–6.54)		0.60	(0.08–5.32)	
Ever black	35 (42.2)	12 (50.0)		0.64	(0.13–2.89)		0.53	(0.10–2.63)	
Ever blond	21 (25.3)	5 (20.8)		0.94	(0.17–5.46)		0.70	(0.11–4.40)	
Inhalation pattern									
Never smoker	37 (48.7)	9 (37.5)	0.588	1.00		0.449	1.00		0.296
Mouth/neck	14 (18.4)	5 (20.8)		0.54	(0.08–3.45)	0.707#	0.43	(0.06–3.14)	0.433#
Deep	25 (32.9)	10 (41.7)		0.47	(0.08–2.56)		0.34	(0.05–2.17)	

*Values in parentheses are column percentages except for type of tobacco.

†Age- and sex-adjusted OR.

‡Age-, sex-, and coffee consumption-adjusted OR.

§Unless otherwise specified, P value was derived from the exact multivariate analogue of Mantel extension test for linear trend.

||Fisher exact test.

¶Mann-Whitney U test.

#Exact probability test.

mutations.¹⁴ Unadjusted (crude) proportions are presented in Figure 1 for the 3 variables most illustrative of lifetime smoking. Never smokers were more frequent in mutated cases than in wild-type cases, and current smokers were more frequent among wild-type cases. The distribution of pack-years smoked and years of smoking were also higher in cases without K-ras mutated tumors (Table 1 and Fig. 1). Clearly, hence, smoking was not more common among

patients with mutations in K-ras; trends are rather in the opposite direction.

Patients who started to smoke early in their lives did not show a higher prevalence of K-ras mutations, and neither did cases who quit shortly before the diagnosis of EPC. Smoking black or blond tobacco was also not associated with K-ras. Patients who inhaled deeply were also nonsignificantly less likely to have a mutated tumor (Table 1). Stratifying by age,

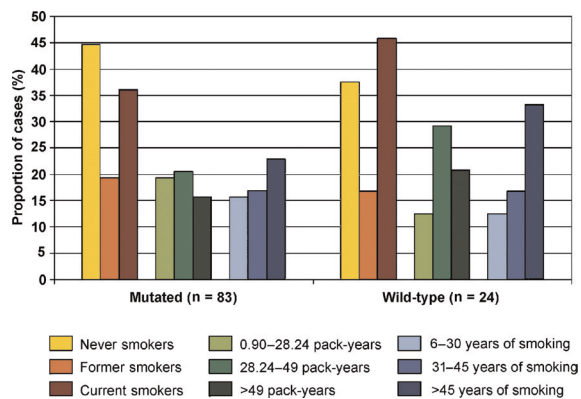


FIGURE 1. Tobacco consumption (smoking status, pack-years and years of smoking) in cases of exocrine pancreatic cancer with and without a mutation in the *K-ras* gene.

sex, and coffee and alcohol consumption did not yield any significant associations (results not shown).

To assess the effect of smoking in the different periods before the diagnosis of EPC, ORs adjusted by sex, coffee consumption, and pack-years smoked in the precedent periods were computed for each 5-year period from 30 years before diagnosis. Taking never smokers as the reference category in each period, ever smokers did not show a significantly higher frequency of *K-ras* mutations in any period: the ORs were 0.77, 1.21, 1.17, 1.29, 1.61, and 0.80 (all $P > 0.05$) for each period from 25 to 30 years to 0 to 5 years before the diagnosis. No significant associations were apparent either with patient's age: the ORs adjusted by sex, coffee consumption, and pack-years smoked in the precedent years were 0.27, 0.36, 1.65, 0.24, 1.56, 5.85, and 1.02 (all $P > 0.05$).

Table 2 shows results for comparisons between hospital controls and EPC cases: first, all cases combined, followed by cases with and without mutations in *K-ras*. As expected, when all cases were compared with the controls (conventional case-control analyses), most ORs evidenced a main effect of tobacco consumption on the risk of EPC. Thus, with respect to never smokers, current smokers were 3.39 times more likely to develop pancreatic cancer ($P = 0.02$); this age- and sex-adjusted OR became 2.36 when further adjusted by coffee (Table 2). The adjustment by confounders and the small size of the control group made most ORs imprecise. However, the purpose of case-control comparisons was just to estimate the direction of case-case analyses, and the message was unequivocal: all EPC cases combined tended to smoke slightly more than controls, wild-type cases smoked clearly more than controls. The OR for current smokers was 1.87 in the mutated case-control comparison and 4.31 in the wild-type case-control comparison (Table 2). The ORs for the upper categories of exposure were all higher for the wild-type case-control comparison than for the mutated case-control comparison. Thus, despite limitations in statistical precision, comparisons with controls indicate that the direction of the case-case association is not that mutated cases smoked less than average but, rather, that wild-type cases tended to smoke more.

DISCUSSION

We did not observe a positive relationship between any feature of the lifetime history of tobacco consumption and the prevalence at diagnosis of mutations in codon 12 of the *K-ras* oncogene. In fact, most analyses suggested weak inverse trends: patients with wild-type *K-ras* tumors tended to smoke slightly more than mutated cases. Moreover, cases who started to smoke earlier in their lives, who smoked more cigarettes and for longer periods, or who tended to inhale deeply did not have increased odds of a *K-ras* mutated tumor either. The mutations were uninfluenced by the period of smoking before diagnosis and by patient's age while smoking.

The results from the case-case study (Table 1) and from the 3 case-control comparisons (Table 2) are mutually coherent. In accordance with previous studies, all pancreatic cancer cases combined smoked more than controls.^{7-9,39-43} Each group of cases (mutated and wild-type) also smoked more than controls. And all ORs for the upper categories of exposure were higher for the wild-type case-control comparison than for the mutated case-control comparison.

There is scarce evidence on a causal relationship between smoking and *K-ras* mutations in EPC.¹⁹⁻²³ In approximately 38 patients, Nagata et al¹⁹ found smoking less common in mutated than in nonmutated cases, with an OR of approximately 0.25 (95% CI, 0.02-3.04, $P = 0.289$); in this study, the source of information on smoking is unstated.¹⁹ Using smoking data from medical records for 82 cases, Hruban et al²⁰ reported an increased probability of *K-ras* mutations in ever smokers versus never smokers (OR, 3.53; 95% CI, 1.07-11.66, $P = 0.047$), but found no association with pack-years ($P = 0.4$); and, as others,^{19,21} they found similar types of mutations in smokers and in nonsmokers.²⁰ In our previous retrospective study²¹ based on 45 cases and also using medical records (which are often unreliable as a data source on smoking), we found no association between the mutations in *K-ras* and tobacco (ever vs never smokers) (OR, 1.50; 95% CI, 0.45-5.04, $P = 0.511$). Berger et al²² retrospectively studied 39 nonneoplastic pancreata from patients who did not die of primary pancreatic ductal adenocarcinoma; the actual diagnoses and criteria to select these autopsy specimens were unspecified, except for the "quality and suitability of the archival tissues"; the source of data on smoking is unclear, and components of the smoking history were estimated (eg, years of smoking).²² Although *K-ras* mutations were detected in 5 of 13 specimens from patients who reportedly had smoked more than 2 packs per day, no mutations were detected in 10 patients who smoked 1 to 2 packs per day or in nonsmoking individuals.²² Finally, until now, there was only 1 study prospectively designed and with smoking information from personal interviews to patients;²³ it analyzed 46 *K-ras* mutated and 15 wild-type cases of EPC and found identical proportions of ever smokers in the 2 groups (OR, 1.04; 95% CI, 0.32-3.41, $P = 1.00$). The number of pack-years and years of smoking was also highly similar in the 2 groups of cases.

Although some of our estimates were statistically imprecise, to date, this is the largest study on smoking and *K-ras* activation in pancreatic cancer (N = 107), and it is only

TABLE 2. Main Characteristics of Smoking History: Comparison of Hospital Controls With All Cases of EPC, With K-ras Mutated Cases, and With K-ras Wild-type Cases

	All Cases	Controls	P	All Cases vs Controls			K-ras Mutated Cases vs Controls			K-ras Wild-Type Cases vs Controls		
				OR*	(95% CI)	P†	OR*	(95% CI)	P†	OR*	(95% CI)	P†
Smoking status												
Never	46 (42.9)	19 (65.5)	0.065‡	1.00		0.306	1.00		0.477	1.00		0.205
Former	20 (18.7)	5 (17.2)		1.72	(0.32–10.13)		1.52	(0.27–9.10)		1.35	(0.11–22.25)	
Current	41 (38.3)	5 (17.2)		2.36	(0.47–12.85)		1.87	(0.39–9.89)		4.31	(0.38–74.69)	
Pack-years												
Median	12.0	0.0	0.046§									
Never	46 (42.9)	19 (67.9)	0.057‡	1.00		0.412	1.00		0.628	1.00		0.300
<28.24	19 (17.8)	3 (10.7)		1.70	(0.27–13.73)	0.424	1.53	(0.23–12.50)	0.513	1.23	(0.07–28.31)	0.553
28.24–49	22 (20.6)	1 (3.6)		5.68	(0.59–294.69)		5.00	(0.51–259.40)		4.24	(0.25–280.56)	
>49	20 (18.7)	5 (17.8)		1.64	(0.29–9.78)		1.21	(0.21–7.40)		2.42	(0.21–38.96)	
Years of smoking												
Median	24.0	0.0	0.059§									
Never	46 (42.9)	19 (65.5)	0.161‡	1.00		0.123	1.00		0.212	1.00		0.191
≤30 yrs	16 (14.9)	4 (13.8)		0.98	(0.17–6.40)		0.89	(0.14–5.90)		0.78	(0.03–18.60)	
31–45 yrs	27 (25.2)	3 (10.3)		2.71	(0.42–21.86)		2.05	(0.32–16.67)		3.75	(0.27–82.30)	
>45 yrs	18 (16.8)	3 (10.3)		3.37	(0.53–27.99)		2.81	(0.43–23.67)		3.31	(0.25–64.21)	
Age at onset												
Median	16.0	16.5	0.685§									
Never	46 (42.9)	19 (65.5)	0.176‡	1.00		0.633	1.00		0.929	1.00		0.402
≥30 yrs	7 (6.5)	0 (0.0)		3.99	(0.49–UH)	0.416	4.10	(0.50–UH)	0.408	0.72	(0.02–UH)	0.680
16–29 yrs	32 (29.9)	6 (20.7)		1.45	(0.28–7.64)		1.20	(0.23–6.30)		1.84	(0.18–26.78)	
≤15 yrs	22 (20.6)	4 (13.8)		1.70	(0.25–12.02)		1.23	(0.18–8.96)		3.58	(0.22–78.57)	
Time between quitting smoking and diagnosis												
Median	9.0	13.0	0.336§			0.180			0.301			0.131
Never	46 (42.9)	19 (65.5)	0.055‡	1.00		0.361	1.00		0.478	1.00		0.385
≥10 yrs	9 (8.4)	4 (13.8)		0.97	(0.14–7.32)		0.81	(0.10–6.50)		0.81	(0.04–18.54)	
1–10 yrs	11 (10.3)	1 (3.4)		4.34	(0.39–242.49)		3.85	(0.34–212.11)		2.65	(0.08–234.30)	
Current	41 (38.3)	5 (17.2)		2.36	(0.47–12.89)		1.84	(0.68–9.78)		3.67	(0.33–60.70)	
Type of tobacco												
Never	46 (42.9)	19 (65.5)	0.045‡	1.00		0.401	1.00		0.422	1.00		0.741
Only black	35 (32.7)	6 (20.7)		1.04	(0.34–3.58)		1.35	(0.28–6.64)		2.19	(0.26–20.61)	
Only blond	14 (13.1)	0 (0.0)		3.90	(0.60–UH)		4.61	(0.61–UH)		2.61	(0.20–UH)	
Ever black	47 (43.9)	9 (31.0)		0.81	(0.30–2.29)		1.20	(0.30–4.86)		1.81	(0.25–14.21)	
Ever blond	26 (24.3)	3 (10.3)		1.46	(0.38–8.24)		2.03	(0.40–14.04)		2.08	(0.19–26.49)	
Inhalation pattern												
Never	46 (46.0)	19 (67.9)	0.112‡	1.00		0.718	1.00		0.977	1.00		0.578
Mouth/neck	19 (19.0)	2 (7.1)		3.00	(0.42–36.96)	0.416	2.39	(0.32–30.16)	0.634	3.03	(0.21–72.76)	0.683
Deep	36 (36.0)	7 (25.0)		1.57	(0.33–7.50)		1.22	(0.26–5.75)		2.49	(0.25–36.16)	

Values in parentheses are percentages, except where otherwise stated.

*Age-, sex-, and coffee consumption-adjusted OR obtained by exact test, except where indicated.

†Unless otherwise specified, P value was derived from the exact multivariate analogue of Mantel extension test for linear trend.

‡Fisher exact test.

§Mann-Whitney U test.

||Exact probability test.

UH indicates unquantifiably high.

1 of 2 based on personal interviews to patients. We achieved a high response rate, and more than 80% of cases were interviewed face-to-face soon around the time of diagnosis. These characteristics of the study strongly support its validity. Other epidemiological studies in pancreatic cancer had response rates of 40% to 60%, even when not including biologic samples and when interviewing patients or relatives

months after diagnosis.^{4,21,44} The proportion of cases with both molecular and smoking data (58%) is also high for EPC. Lack of differences between patients included and excluded further argues against an important selection bias.^{14,34}

A rationale exists in support of the hypothesis that in EPC, the occurrence or the persistence of K-ras mutations might be favored by tobacco constituents. Mutations in K-ras

are highly frequent in pancreatic ductal adenocarcinomas, and smoking is an epidemiologically well-established risk factor for this cancer.^{1-4,39-43} Furthermore, experiments have shown a nicotine-derived carcinogenic nitrosamine, nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), to cause pancreatic adenocarcinomas in laboratory animals.⁶ The NNK and its major metabolite, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol, have been found in pancreatic juice from smokers and are the only pancreatic carcinogens known to be present in tobacco products; experimental studies support their role in smoking-related pancreatic cancer.^{5,45} Besides, *in vitro* transformation studies of pancreatic ductal cells have shown an effect of some tobacco carcinogens (as NNK) in the induction of pancreatic tumors.^{46,47} This pathway might synergize with the cancer-causing effects of mutated *K-ras*. The NNK has genotoxic effects and is metabolized by specific enzymes to yield products that bind to DNA and form adducts, which are associated with activating point mutations in the *K-ras* gene, and mutations in other oncogenes and tumor suppressor genes. The NNK causes pancreatic tumors with *K-ras* mutations in animal models.^{5,6,46,47} In addition, nitrosamines may play an etiologic role in pancreatic adenocarcinomas that do not express a *K-ras* mutation.⁶ The NNK may also have epigenetic effects on pancreatic cells by functioning as an agonist for β -adrenergic receptors. This signaling pathway activates transcription and cell proliferation and is thought to cause pulmonary and pancreatic adenocarcinomas without mutations in *K-ras*.⁶

On the other hand, our finding of no association does not lack a biologic basis either. In animal models, benzopyrene, other polycyclic aromatic hydrocarbons, and other tobacco carcinogens (that are not nitrosamines) cause *K-ras* mutations in several tumors (eg, in lung cancer), but not in pancreatic tumors.^{10,29,48,49} Moreover, pancreatic tissue is not a target organ for these carcinogens, whereas they are present in skin, lung, laryngeal, oral cavity, and liver cancers.⁶ Tobacco carcinogens are also responsible for Tp53 mutations in human cancer.^{5,28,30,50} In human EPC, the relationship between the occurrence of alterations in *K-ras* and Tp53 remains elusive.^{10,11,17,51}

Furthermore, biologic and epidemiological evidences suggest that tobacco acts late in the pancreatic carcinogenic process.^{2-4,39-43} By contrast, *K-ras* mutations occur early and can be detected frequently in pancreatic intraductal neoplasias (pancreatic intraductal neoplasia 1 [PanIN-1] lesions), whose malignant potential is not well established but is likely to be low. Progression of PanINs is dependent on the accumulation of additional genetic abnormalities. There is strong evidence, both from the analysis of patient's tumors and from genetic models of pancreatic adenocarcinoma in mice, that inactivation of INK4A and Tp53 strongly contribute to PanIN progression to invasive tumors.^{11,17,46,52} However, many of these models are flawed by relatively simple linear interpretation of PanIN progression. Because *K-ras* is able to activate a senescence program and to promote tumor development, progression models that integrate all these information need to be developed. Our results support the hypothesis that smoking influences the

risk of EPC through events other than *K-ras* mutations, such as alterations in Tp53, hormonal effects, or epigenetic processes. Moreover, *K-ras* mutations and *K-ras* effectors (ie, Raf, phosphoinositide-3 kinase, guanine-nucleotide exchange factor) may be influenced by other exposures.^{1-5,13-17} There are other tumors as well in which tobacco does not seem to relate to relatively early genetic alterations, such as fibroblast growth factor receptor 3 mutations in bladder cancer.⁵³

Finally, another important causal scenario involves tumor histologies. Although adenocarcinomas are less related to smoking than other histological types,²⁴⁻²⁷ mutations in *K-ras* are more frequent in adenocarcinomas.^{28,29,31} In a strongly smoking-related cancer as lung cancer, adenocarcinoma is the only one of 4 main histological types that is also developed in a significant number of never smokers.^{6,29,30} And although *K-ras* mutations are also common in lung adenocarcinomas, the evidence is weak that they are caused by smoking. The evidence is also weak for other human neoplasias; some studies even suggest that the relationship may be inverse.^{18,29,31} In fact, the pattern of results in our case-case and case-control comparisons is highly similar to the pattern observed by Wark et al¹⁸ in colorectal adenomas: *K-ras* mutated cases had smoked less than wild-type cases, both groups of cases smoked more than controls, and the ORs were higher for the wild-type case-control comparison than for the mutated case-control comparison.

In conclusion, we observed no relationship between any feature of the lifetime history of tobacco consumption and the prevalence at diagnosis of mutations in codon 12 of the *K-ras* oncogene. The findings support the notion that tobacco does not play a major part in the acquisition of *K-ras* mutations in the pancreatic epithelium. Although both smoking and *K-ras* mutations have important roles in the etiopathogenesis of EPC, the 2 processes may act independently.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank David J. MacFarlane, Isabel Egea, Laura Arellano, and Silvia Geeraerd for technical assistance.

REFERENCES

- Porta M, Malats N, Jariod M, et al. Serum concentrations of organochlorine compounds and *K-ras* mutations in exocrine pancreatic cancer. *Lancet*. 1999;354:2125-2129.
- Weiderpass E, Partanen T, Kaaks R, et al. Pancreatic cancer: occurrence, trends, and environmental etiology. A review. *Scand J Work Environ Health*. 1999;24:165-174.
- Ekbom A, Hunter D. Pancreatic cancer. In: Adami HO, Hunter D, Trichopoulos D, eds. *Textbook of Cancer Epidemiology*. New York: Oxford University Press; 2002:233-247.
- Li D, Jiao L, Porta M. Epidemiology. In: von Hoff DD, Evans DB, Hruban RH, eds. *Pancreatic Cancer*. Boston: Jones and Bartlett; 2005:103-117.
- Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:733-744.
- Schuller HM. Mechanisms of smoking-related lung and pancreatic adenocarcinoma development. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:455-463.
- Fernandez E, La vecchia C, Decarli A. Attributable risks for pancreatic cancer in northern Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996;5:23-27.

8. Ferraroni M, Negri E, La Vecchia C, et al. Socioeconomic indicators, tobacco and alcohol in the aetiology of digestive tract neoplasms. *Int J Epidemiol.* 1989;18:556–562.
9. Bonelli L, Aste H, Bovo P, et al. Exocrine pancreatic cancer, cigarette smoking, and diabetes mellitus: a case-control study in northern Italy. *Pancreas.* 2003;27:143–149.
10. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:459–465.
11. Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, et al. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* 2006;20:1218–1249.
12. Shields JM, Pruitt K, McFall A, et al. Understanding ras: “it ain’t over ‘til it’s over”. *Trends Cell Biol.* 2000;10:147–154.
13. Porta M, Ayude D, Alguacil J, et al. Exploring environmental causes of altered ras effects: fragmentation plus integration? *Mol Carcinog.* 2003;36:45–52.
14. Porta M, Malats N, Guarnier L, et al. Association between coffee drinking and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *J Epidemiol Community Health.* 1999;53:702–709.
15. Alguacil J, Porta M, Malats N, et al. Occupational exposure to organic solvents and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *Carcinogenesis.* 2002;23:101–106.
16. Alguacil J, Porta M, Kauppinen T, et al. Occupational exposure to dyes, metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and other agents and K-ras activation in human exocrine pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2003;107:635–641.
17. Real FX. A “catastrophic hypothesis” for pancreas cancer progression. *Gastroenterology.* 2003;124:1958–1964.
18. Wark PA, Van der Kuil W, Ploemacher J, et al. Diet, lifestyle and risk of K-ras mutation-positive and -negative colorectal adenomas. *Int J Cancer.* 2006;119:398–405.
19. Nagata Y, Abe M, Motoshima K, et al. Frequent glycine-to-aspartic acid mutations at codon 12 of c-Ki-ras gene in human pancreatic cancer in Japanese. *Jpn J Cancer Res.* 1990;81:135–140.
20. Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, et al. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol.* 1993;143:545–554.
21. Malats N, Porta M, Corominas JM, et al. Ki-ras mutations in exocrine pancreatic cancer: association with clinico-pathological characteristics and with tobacco and alcohol consumption. *Int J Cancer.* 1997;70:661–667.
22. Berger DH, Chang H, Wood M, et al. Mutational activation of K-ras in nonneoplastic exocrine pancreatic lesions in relation to cigarette smoking status. *Cancer.* 1999;85:326–332.
23. Slebos RJ, Hoppin JA, Tolbert PE, et al. K-ras and p53 in pancreatic cancer: association with medical history, histopathology, and environmental exposures in a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9:1223–1232.
24. Khuder SA. Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer.* 2001;31:139–148.
25. Thun MJ, Lally CA, Flannery JT, et al. Cigarette smoking and changes in the histopathology of lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:1580–1586.
26. Yun YH, Lim MK, Jung KW, et al. Relative and absolute risks of cigarette smoking on major histologic types of lung cancer in Korean men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:2125–2130.
27. Sobue T, Yamamoto S, Hara M, et al. Cigarette smoking and subsequent risk of lung cancer by histologic type in middle-aged Japanese men and women: the JPHC study. *Int J Cancer.* 2002;99:245–251.
28. Gealy R, Zhang L, Siegfried JM, et al. Comparison of mutations in the p53 and K-ras genes in lung carcinomas from smoking and nonsmoking women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8:297–302.
29. Slebos RJ, Hruban RH, Dalesio O, et al. Relationship between K-ras oncogene activation and smoking in adenocarcinoma of the human lung. *J Natl Cancer Inst.* 1991;83:1024–1027.
30. Boffetta P, Trichopoulos D. Cancer of the lung, larynx, and pleura. In: Adami HO, Hunter D, Trichopoulos D, eds. *Textbook of Cancer Epidemiology.* New York: Oxford University Press; 2002: 248–280.
31. Kuper H, Boffetta P, Adami HO. Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. *J Intern Med.* 2002;252:206–224.
32. Porta M, Fabregat X, Malats N, et al. Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol.* 2005;7:189–197.
33. Soler M, Malats N, Porta M, et al. Medical conditions in patients with pancreatic and biliary diseases: validity and agreement between data from questionnaires and medical records. *Dig Dis Sci.* 1999;44:2469–2477.
34. Porta M, Costafreda S, Malats N, et al. Validity of the hospital discharge diagnosis in epidemiologic studies of biliopancreatic pathology. *Eur J Epidemiol.* 2000;16:533–541.
35. Rosenbaum PR. The case-only odds ratio as a causal parameter. *Biometrics.* 2004;60:233–240.
36. Armitage P, Berry G, Matthews JNS. *Statistical Methods in Medical Research.* 4th ed. Oxford: Blackwell, 2002.
37. Kleinbaum DG, Kupper LL, Morgenstern H. *Epidemiologic Research.* Belmont, CA: Lifetime Learning Publications; 1982:320–376, 343, 419–456.
38. Breslow NE, Day NE. *Statistical Methods in Cancer Research. Vol I: The Analysis of Case-Control Studies.* Lyon: IARC Scientific Publications; 1980:149–154.
39. Fuchs CS, Colditz GA, Stampfer MJ, et al. A prospective study of cigarette smoking and the risk of pancreatic cancer. *Arch Intern Med.* 1996;156:2255–2260.
40. Silverman DT, Dunn JA, Hoover RN, et al. Cigarette smoking and pancreas cancer: a case-control study based on direct interviews. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86:1510–1516.
41. Bueno de Mesquita HB, Maisonneuve P, Moerman CJ, et al. Life-time history of smoking and exocrine carcinoma of the pancreas: a population-based case-control study in The Netherlands. *Int J Cancer.* 1991;49:816–822.
42. Boyle P, Maisonneuve P, Bueno de Mesquita B, et al. Cigarette smoking and pancreas cancer: a case control study of the SEARCH programme of the IARC. *Int J Cancer.* 1996;67:63–71.
43. Howe GR, Jain M, Burch JD, et al. Cigarette smoking and cancer of the pancreas: evidence from a population-based case-control study in Toronto, Canada. *Int J Cancer.* 1991;47:323–328.
44. Porta M, Malats N, Corominas JM, et al. Generalizing molecular results arising from incomplete biological samples: expected bias and unexpected findings. *Ann Epidemiol.* 2002;12:7–14.
45. Askari MD, Tsao M, Cekanova M, et al. Ethanol and the tobacco-specific carcinogen, NNK, contribute to signaling in immortalized human pancreatic duct epithelial cells. *Pancreas.* 2006;33:53–62.
46. Baskaran K, Laconi S, Reddy MK. Transformation of hamster pancreatic duct cells by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNK), in vitro. *Carcinogenesis.* 1994;15:2461–2466.
47. Sills RC, Boorman GA, Neal JE, et al. Mutations in ras genes in experimental tumours of rodents. *IARC Sci Publ.* 1999;146:55–86.
48. Ross JA, Nesnow S. Polycyclic aromatic hydrocarbons: correlations between DNA adducts and ras oncogene mutations. *Mutat Res.* 1999;424:155–166.
49. Tretyakova N, Matter B, Jones R, et al. Formation of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts at specific guanines within K-ras and p53 gene sequences: stable isotope-labeling mass spectrometry approach. *Biochemistry.* 2002;41:9535–9544.
50. De Stefani E, Boffetta P, Ronco AL, et al. Squamous and small cell carcinomas of the lung: similarities and differences concerning the role of tobacco smoking. *Lung Cancer.* 2005;47:1–8.
51. Berrozpe G, Schaeffer J, Peinado MA, et al. Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 1994;58:185–191.
52. Deramandt T, Rustgi AK. Mutant KRAS in the initiation of pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1756:97–101.
53. Wallerand H, Bakkar AA, de Medina SG, et al. Mutations in TP53, but not FGFR3, in urothelial cell carcinoma of the bladder are influenced by smoking: contribution of exogenous versus endogenous carcinogens. *Carcinogenesis.* 2005;26:177–184.

4.2. Article 2: Polimorfismes en el gen *CYP1B1* i mutacions en l'oncogèn *K-ras* en pacients amb adenocarcinoma ductal de pàncrees

4.2.1. Resum

No existeix cap estudi que hagi descrit la freqüència dels polimorfismes en el gen *CYP1B1* en pacients amb ADP. Tampoc hi ha estudis sobre la relació entre cap de les variants del gen *CYP1B1* i les mutacions en els gens *Ras* (*K-*, *H-* o *N-ras*) en cap neoplàsia en humans.

Per això, l'objectiu de l'estudi va ser descriure les freqüències dels polimorfismes en el gen *CYP1B1* en pacients amb ADP així com analitzar la relació entre aquests polimorfismes i la prevalença de mutacions en el codó 12 de l'oncogèn *K-ras*.

Es van analitzar dos polimorfismes en el gen *CYP1B1* en 129 casos incidents ADP: el locus m1 (canvi de l'al·lel valina per leucina al codó 432 o V432L) i el locus m2 (canvi de l'al·lel asparagina per serina al codó 453 o A453S). Les freqüències dels al·lells valina (Val) a m1 i asparagina (Asn) a m2 van ser 0,45 i 0,68, respectivament.

Es va observar que els genotips de *CYP1B1* no estan en equilibri de Hardy-Weinberg, degut fonamentalment als casos d'ADP amb mutacions en l'oncogèn *K-ras*. El genotip homozigot per l'al·lel valina (Val/Val) va ser 5 vegades més freqüent en els casos d'ADP amb mutació en l'oncogèn *K-ras* que en els casos sense la mutació (OR=5,25; p=0,121); d'altra banda, no es van detectar diferències entre els pacients amb i sense mutacions en l'oncogèn *K-ras* en relació als genotips del locus m2 (OR=1,14; p=0,797).

Els nostres resultats, a més de ser les primeres anàlisis sobre el paper de les variants de l'enzim metabolitzador de xenobiòtics *CYP1B1* en pacients amb ADP, suggereixen que els polimorfismes en el gen *CYP1B1* podrien estar relacionats amb vies d'activació de l'oncogèn *K-ras* en la carcinogènesi pancreàtica.

4.2.2. Principals troballes

Hem calculat les freqüències de dos polimorfismes en el gen *CYP1B1*, V432L i A453S; ambdós estan localitzats al codó 13 del gen, que coincideix amb el que codifica la regió catalítica d'aquest enzim metabolitzador de carcinògens i estrògens, una zona crítica per al manteniment de la seva funció.

S'han descrit diferències en les freqüències d'ambdós al·lels en poblacions caucàsiques, africanes i asiàtiques; mentre que la prevalença de l'al·lel valina en els pacients d'ADP és de 0,45, similar a la descrita prèviament en altres poblacions caucàsiques, la de l'al·lel asparagina és de 0,68, una mica més baixa que l'observada en la població d'altres estudis.

L'absència d'equilibri de Hardy-Weinberg, que s'observa en el primer locus (m1) del gen *CYP1B1*, reflecteix la possible implicació d'aquest gen en la patogènia de l'ADP, possiblement lligat a la relació amb la prevalença de mutacions en l'oncogèn *K-ras*. Els pacients d'ADP amb el genotip homozigot per l'al·lel valina (Val/Val) en el locus m1 tenen més probabilitat de tenir un tumor *K-ras* mutat; de manera que aquest genotip de *CYP1B1* podria generar una variant menys eficient de l'enzim que, alhora, podria estar associada a una activitat detoxificadora més pobre i en conseqüència a un procés deficient de bioactivació i metabolització dels carcinògens ambientals; al no ser correctament eliminats de l'organisme aquests carcinògens poden ser l'origen de mutacions en l'oncogèn *K-ras*.

Desafortunadament, polimorfismes en aquest gen metabolitzador de xenobiòtics no s'han estudiat prèviament en aquesta patologia.

ARTICLE 2

Crous-Bou M, De Vivo I, Porta M, Pumarega JA, López T, Alguacil J, Morales E, Malats N, Rifà J, Hunter DJ, Real FX for the PANKRAS II Study Group. CYP1B1 polymorphisms and K-ras mutations in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Digestive Diseases and Sciences* 2008; 53: 1417-1421.

CYP1B1 Polymorphisms and *K-ras* Mutations in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma

Marta Crous-Bou · Immaculata De Vivo · Miquel Porta · José A. Pumarega · Tomàs López · Joan Alguacil · Eva Morales · Núria Malats · Juli Rifà · David J. Hunter · Francisco X. Real · For the PANKRAS II Study Group

Received: 20 January 2007 / Accepted: 28 February 2007 / Published online: 18 March 2008
© Springer Science+Business Media, LLC 2008

Abstract The frequency of CYP1B1 polymorphisms in pancreatic cancer has never been reported. There is also no evidence on the relationship between CYP1B1 variants and mutations in *ras* genes (*K-*, *H-* or *N-ras*) in any human neoplasm. We analyzed the following CYP1B1 polymorphisms in 129 incident cases of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA): the m1 allele (Val to Leu at codon

432) and the m2 allele (Asn to Ser at codon 453). The calculated frequencies for the m1 Val and m2 Asn alleles were 0.45 and 0.68, respectively. CYP1B1 genotypes were out of Hardy–Weinberg equilibrium; this was largely due to *K-ras* mutated PDA cases. The Val/Val genotype was over five times more frequent in PDA cases with a *K-ras* mutation than in wild-type cases (OR = 5.25; $P = 0.121$). In PDA, polymorphisms in CYP1B1 might be related with *K-ras* activation pathways.

PANKRAS II study group—Members of the multicenter prospective study on the role of *K-ras* and other genetic alterations in the diagnosis, prognosis and etiology of pancreatic and biliary diseases (PANKRAS II) study group are mentioned in previous publications.

M. Crous-Bou · M. Porta (✉) · J. A. Pumarega · T. López · J. Alguacil · E. Morales · N. Malats · F. X. Real
Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), CIBER de Epidemiologia y Salud Pública (CIBERESP), Carrer del Dr. Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain
e-mail: mporta@imim.es

M. Crous-Bou · M. Porta
School of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

I. De Vivo · D. J. Hunter
Harvard School of Public Health, Boston, MA, USA

I. De Vivo · D. J. Hunter
Channing Laboratory, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA

J. Alguacil
Department of Environmental Biology & Public Health, Universidad de Huelva, Huelva, Spain

J. Rifà
Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca, Spain

F. X. Real
Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

Keywords Pancreatic neoplasms · CYP1B1 polymorphisms · *K-ras* oncogene · *ras* genes

Abbreviations

PANKRAS	Multicenter prospective study on the role of the <i>K-ras</i> and other genetic alterations in the diagnosis, prognosis, and etiology of pancreatic and biliary diseases
PDA	Pancreatic ductal adenocarcinoma
CYP1B1	Cytochrome P450 1B1
PAHs	Polycyclic aromatic hydrocarbons
OR	Odds ratio
CI	Confidence interval

Introduction

The cytochrome P450 gene superfamily participates in the oxidative metabolism of drugs and endogenous substrates, including steroids, and in the metabolic activation of exogenous chemical carcinogens such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), nitroaromatics, and arylamines [1–5]. Cytochrome P4501B1 (CYP1B1) is a carcinogen- and estrogen-metabolizing enzyme with an important role in the bioactivation of some environmental procarcinogens

[6, 7]. CYP1B1 activates PAH, including benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenzo[a]anthracene (DMBA), as well as heterocyclic aromatic amines derived from tobacco smoke and some occupational exposures, which are carcinogens in experimental animals [1, 2]. Moreover, the oxidant steps catalyzed by this enzyme often create more reactive intermediates able to bind with DNA, leading to DNA adduct formation and genetic mutations [8].

CYP1B1 polymorphisms are hypothesized to influence interindividual differences in susceptibility to chemically induced cancers [3, 9, 10]. Two common functional polymorphisms in CYP1B1 have been described: V432L (Val to Leu at codon 432, the m1 allele) and A453S (Asn to Ser at codon 453, the m2 allele) [9, 11]. CYP1B1 polymorphisms have been studied in human cancer, including breast, ovarian, endometrial, lung, and bladder cancers, but their distribution in pancreatic cancer is unknown [1, 3, 6–8, 10, 12–15]. There is also no evidence on the potential relationship between CYP1B1 variants and *K-ras* mutations, the oncogene most frequently mutated in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA).

Exposure to PAH and aromatic amines, mainly through smoking and occupation, has been related with pancreatic carcinogenesis [16–19]. Some studies suggest that lifestyle and environmental factors may influence the occurrence or persistence of *K-ras* mutations [20–25]. Thus, *K-ras* mutated and *K-ras* wild-type PDAs may develop through different pathways, probably involving different gene–environment interactions; however, findings remain inconclusive [22–24, 26].

The main objective of the present study was to analyze the distribution of polymorphisms in the m1 and m2 alleles of CYP1B1 among patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. We also analyzed such polymorphisms by *K-ras* mutational status.

Patients and Methods

Selection of Patients and Interviews

Methods have been previously described in detail [22–24, 26, 27]. Briefly, subject recruitment took place at five general hospitals in the eastern Mediterranean part of Spain, where 185 incident cases of PDA were prospectively identified. Twenty-nine controls were recruited at one of the hospitals; they were admitted for benign, non-digestive disorders unrelated to tobacco and alcohol consumption [24]. The present report is based on 129 PDA patients with m1 and m2 CYP1B1 polymorphisms analyzed and on 87 cases who also had information about *K-ras* status. There were no significant differences between them and the remaining cases according to education,

social class, sex, occupation, hospital, tumor stage, signs and symptoms, duration of the interview, caloric intake, and consumption of coffee, tobacco, and alcohol, except for cases included for *K-ras* analysis who were slightly younger [24, 26]. The ethics committees of the participating hospitals approved the study protocol, and patients gave informed consent to be included in the study. A structured form was used to collect clinicopathological information from medical records. Over 88% of the patients were interviewed face-to-face by trained monitors during hospital stay, close to the time of diagnosis. Interviews included questions about past clinical history, occupation, diet, and coffee, alcohol, and tobacco consumption [22–24, 26, 27].

Identification of CYP1B1 Polymorphisms

Details of laboratory protocols have been described elsewhere [12, 13]. DNA was extracted from buffy coat fractions using the Qiagen QIAamp blood kit (Qiagen, Inc., Chads-worth CA). Genotyping was performed by automated DNA sequencing on the ABI 377X using BigDyeterminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems, Foster City, CA). Two common functional polymorphisms in CYP1B1 were examined: V432L and A453S. Because of the close proximity of m1 to m2, within 60 bp, we were able to amplify both polymorphisms within one amplicon. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of m1 and m2 was generated using the primers 5'-CCAACACCTCTGTCTTGGGA-3' and 5'-GCTCATTTGGGTTGGCCCTG-3'. Heterozygotes were denoted at positions where the secondary peak height was ≥ 45 –50% of the primary peak height in both forward and reverse sequence reads for a subset of the samples. After establishing the criteria for base calling, the forward PCR primer was used for all subsequent sequencing reactions.

Detection of *K-ras* Mutations

Details of laboratory protocols have been described elsewhere [22–24, 26]. Briefly, mutations in codon 12 of *K-ras* oncogene were studied using DNA extracted from paraffin-embedded tumor tissue. Amplifications were done in two steps by nested PCR; an artificial BstNI restriction endonuclease site was introduced to discriminate between wild-type and mutated *K-ras* codon 12 sequences. Products were analyzed by acrylamide gel electrophoresis and ethidium bromide staining. This technique was able to detect one homozygous mutated cell in the presence of 102 normal cells. To characterize the nucleotide substitution in codon 12, all mutated samples were further analyzed using a similar restriction fragment-length polymorphism (RFLP)-based

approach. Interpretation of digestion products' electrophoresis was performed independently by two investigators to confirm the results.

Data Analysis

Allele frequencies and Hardy–Weinberg equilibrium were calculated for the m1 and m2 polymorphisms in the 129 patients with PDA and in the 19 hospital controls. We also compared the m1 and m2 genotypes of the 65 cases of PDA with a *K-ras* mutated tumor and the 22 cases of PDA whose tumors did not harbor such mutations. In the analyses of CYP1B1 by *K-ras* status, Val/Leu and Leu/Leu were combined in one group, and Asn/Ser and Ser/Ser were also combined. Univariate statistics were computed as customary [28, 29]. In contingency tables, Fisher's exact test was applied to assess the relationship between two categorical variables. To estimate the magnitude of the associations, multivariate-adjusted odds ratios and their corresponding 95% confidence intervals (CI) were calculated by unconditional logistic regression. These analyses were performed using SPSS, version 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) [28, 29]. Age, sex, tobacco, and alcohol and coffee consumption were assessed in the models as potential confounders. The level of statistical significance was set at 0.05, and all tests were two-tailed.

Results

In the 129 patients with PDA the frequencies for m1 Val and Leu alleles were 0.45 and 0.55, respectively, and among controls they were 0.50 and 0.50, respectively. For m2 Asn and Ser alleles the frequencies were 0.68 and 0.32 in cases and 0.73 and 0.27 in controls, respectively (Table 1).

Table 1 Genotype frequencies of the m1 and m2 alleles among cases of pancreatic ductal adenocarcinoma with and without mutations in codon 12 of the *K-ras* oncogene, and among hospital controls

CYP1B1	All PDA cases	<i>K-ras</i> mutated PDA cases	<i>K-ras</i> wild-type PDA cases	Controls
m1 (codon 432)	<i>N</i> = 129	<i>N</i> = 65	<i>N</i> = 22	<i>N</i> = 19
Val/Val	19 (14.7)	13 (20.0)	1 (4.6)	4 (21.1)
Val/Leu	79 (61.3)	40 (61.5)	16 (72.7)	11 (57.8)
Leu/Leu	31 (24.0)	12 (18.5)	5 (22.7)	4 (21.1)
m2 (codon 453)	<i>N</i> = 126	<i>N</i> = 63	<i>N</i> = 21	<i>N</i> = 18
Asn/Asn	54 (42.9)	25 (39.7)	9 (42.9)	9 (50.0)
Asn/Ser	64 (50.8)	33 (52.4)	11 (52.4)	8 (44.4)
Ser/Ser	8 (6.3)	5 (7.9)	1 (4.7)	1 (5.6)

Note: Values in parentheses are column percentages

Genotype frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium among controls (*P* = 0.500 and 0.722 for m1 and m2, respectively). They were out of Hardy–Weinberg equilibrium in PDA cases: clearly so for m1 (*P* = 0.007) and probably so for m2 (*P* = 0.053).

In the m1 allele, the Val/Val genotype was slightly less frequent in PDA cases than in controls (14.7% versus 21.1%); accordingly, heterozygotes, and homozygotes for Leu were more frequent in cases than controls. For the m2 allele, the proportion of Asn homozygotes was slightly lower in PDA cases than in controls (42.9 versus 50.0), while Ser genotypes were slightly more frequent in PDA cases than in controls (Table 1).

K-ras mutated cases were more likely to be homozygous for Val/Val in m1 than *K-ras* wild-type cases (crude OR = 5.25; *P* = 0.121). When age, sex, tobacco, and coffee and alcohol consumption were adjusted for, the corresponding OR was 6.41 (*P* = 0.111) (Table 2).

Table 2 Relationship between m1 and m2 polymorphisms in CYP1B1 and the frequency of *K-ras* mutations in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma

	<i>K-ras</i>		Unadjusted OR			Adjusted OR ^a		
	Mutated (<i>N</i> = 65)	Wild type (<i>N</i> = 22)	OR	(95% CI)	<i>P</i> ^b	OR	(95% CI)	<i>P</i> ^b
m1 (codon 432)								
Any Leu	52 (80.0)	21 (95.5)	1.00		0.121	1.00		0.111
Val/Val	13 (20.0)	1 (4.5)	5.25	(0.65–42.71)		6.41	(0.65–63.01)	
m2 (codon 453)								
Asn/Asn	25 (39.7)	9 (42.9)	1.00		0.797	1.00		0.624
Any Ser	38 (60.3)	12 (57.1)	1.14	(0.42–3.10)		1.35	(0.41–4.51)	

Note: values in parentheses are column percentages, except where otherwise stated

The first category of each variable is the reference category (odds ratio [OR] = 1.00). CI: confidence interval

^a Odds ratio adjusted by age, sex, tobacco, and coffee and alcohol consumption

^b *P*-value derived from Wald's test

Genotype frequencies in the m2 allele did not differ among PDA patients with and without mutations in *K-ras*.

Discussion

We analyzed two CYP1B1 polymorphisms in 129 patients with PDA, Val432Leu and Asn453Ser, both in exon 3, a critical region for the catalytic function of the enzyme [9, 11, 15]. The observed frequencies of Val and Asn alleles were 0.45 and 0.68, respectively. The prevalence of the m1 Val allele was similar to that previously described in Caucasian populations; the prevalence of the m2 Asn allele was lower than in other reports [12, 13]. Different allele frequencies have been observed in Caucasian, African, and Asian populations [6, 10–15].

The absence of Hardy–Weinberg equilibrium of the m1 polymorphism might reflect that CYP1B1 is involved in the pathogenesis of pancreatic cancer. Unfortunately, CYP1B1 polymorphisms have not been studied before in pancreatic cancer. Furthermore, to our knowledge no reports are available on the relationship between CYP1B1 variants and mutations in *ras* genes (*K-*, *H-* or *N-ras*) in any human neoplasm.

Our results raise the possibility that, as compared to patients with any Leu genotype in m1, individuals with the Val/Val genotype might have a higher probability of a *K-ras* mutated PDA than of a *K-ras* wild-type tumor. However, our sample size was low for the case–case and case–control comparisons and hence independent studies are required to refute or replicate the findings. CYP1B1 is related to PAHs metabolism and smoking is a well-established risk factor for PDA [8, 18, 20]. The Val/Val genotype might be associated with poor detoxification activity and, consequently, with an impaired elimination of some environmental factors such as tobacco smoke or occupational exposures. Some of these compounds may be oxidized to electrophilic metabolites that can react with DNA to form stable adducts, which may favor mutations in *K-ras* and other oncogenes [1, 2, 8, 30].

In conclusion, our results provide the first analysis of CYP1B1 variants in pancreatic cancer, and suggest a possible relationship between the m1 locus of CYP1B1 and *K-ras* mutations in patients with PDA. Further studies are warranted to elucidate the role of CYP1B1 variants in pancreatic cancer and their relation with *K-ras* activation pathways.

Acknowledgments Supported by research grants from Red temática de investigación cooperativa de centros en Cáncer (C03/10), Red temática de investigación cooperativa de centros en Epidemiología y salud pública (C03/09), and CIBER de epidemiología y salud pública, Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Health, Madrid. The authors gratefully acknowledge scientific and technical assistance provided by

David J. MacFarlane, Isabel Egea, Elisa Puigdomenech, and Silvia Geeraerd.

References

- Buters JT, Sakai S, Richter T, Pineau T, Alexander DL, Savas U, Doehmer J, Ward JM, Jefcoate CR, Gonzalez FJ (1999) Cytochrome P450 CYP1B1 determines susceptibility to 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1977–1982
- Badawi AF, Cavalieri EL, Rogan EG (2000) Effect of chlorinated hydrocarbons on expression of cytochrome P450 1A1, 1A2 and 1B1 and 2- and 4-hydroxylation of 17beta-estradiol in female Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* 21:1593–1599
- Agundez JA (2004) Cytochrome P450 gene polymorphism and cancer. *Curr Drug Metab* 5:211–224
- Belous AR, Hachey DL, Dawling S, Roodi N, Parl FF (2007) Cytochrome P450 1B1-mediated estrogen metabolism results in estrogen-deoxyribonucleoside adduct formation. *Cancer Res* 67:812–817
- Nebert DW, Dalton TP (2006) The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 6:947–960
- Zheng W, Xie DW, Jin F, Cheng JR, Dai Q, Wen WQ, Shu XO, Gao YT (2000) Genetic polymorphism of cytochrome P450-1B1 and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:147–150
- Hung RJ, Boffetta P, Brennan P, Malaveille C, Hautefeuille A, Donato F, Gelatti U, Spaliviero M, Placidi D, Carta A, Scotto di Carlo A, Porru S (2004) GST, NAT, SULT1A1, CYP1B1 genetic polymorphisms, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk in a high-risk population. *Int J Cancer* 110:598–604
- Wenzlaff AS, Cote ML, Bock CH, Land SJ, Santer SK, Schwartz DR, Schwartz AG (2005) CYP1A1 and CYP1B1 polymorphisms and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study. *Carcinogenesis* 26:2207–2212
- Han W, Pentecost BT, Spivack SD (2003) Functional evaluation of novel single nucleotide polymorphisms and haplotypes in the promoter regions of CYP1B1 and CYP1A1 genes. *Mol Carcinog* 37:158–169
- Paracchini V, Raimondi S, Gram IT, Kang D, Kocabas NA, Kristensen VN, Li D, Parl FF, Rylander-Rudqvist T, Soucek P, Zheng W, Wedren S, Taioli E (2007) Meta- and pooled analyses of the cytochrome P-450 1B1 Val432Leu polymorphism and breast cancer: a HuGE-GSEC review. *Am J Epidemiol* 165:115–125
- Aklillu E, Oscarson M, Hidestrand M, Leidvik B, Otter C, Ingelman-Sundberg M (2002) Functional analysis of six different polymorphic CYP1B1 enzyme variants found in an Ethiopian population. *Mol Pharmacol* 61:586–594
- De Vivo I, Hankinson SE, Li L, Colditz GA, Hunter DJ (2002) Association of CYP1B1 polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 489–492
- McGrath M, Hankinson SE, Arbeitman L, Colditz GA, Hunter DJ, De Vivo I (2004) Cytochrome P450 1B1 and catechol-O-methyltransferase polymorphisms and endometrial cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 25:559–565
- Rylander-Rudqvist T, Wedren S, Jonassdottir G, Ahlberg S, Weiderpass E, Persson I, Ingelman-Sundberg M (2004) Cytochrome P450 1B1 gene polymorphisms and postmenopausal endometrial cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:1515–1520

15. Bailey L, Roodi N, Dupont W, Parl F (1998) Association of cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) polymorphisms with steroid receptor status in breast cancer. *Cancer Res* 58:5038–5041
16. Weiderpass E, Partanen T, Kaaks R, Vainio H, Porta M, Kauppinen T et al (1999) Pancreatic cancer: occurrence, trends, and environmental etiology. A review. *Scand J Work Environ Health* 24:165–174
17. Ekblom A, Hunter D (2002) Pancreatic cancer. In: Adami HO, Hunter D, Trichopoulos D (eds) *Textbook of cancer epidemiology*. Oxford University Press, New York, pp 233–247
18. Hecht SS (2003) Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 3:733–744
19. Li D, Jiao L, Porta M (2005) Epidemiology. In: von Hoff DD, Evans DB, Hruban RH (eds) *Pancreatic cancer*. Jones & Bartlett, Boston, pp 103–117
20. Schuller HM (2002) Mechanisms of smoking-related lung and pancreatic adenocarcinoma development. *Nat Rev Cancer* 2:455–463
21. Soliman AS, Bondy M, Webb CR et al (2006) Differing molecular pathology of pancreatic adenocarcinoma in Egyptian and United States patients. *Int J Cancer* 119:1455–1461
22. Alguacil J, Porta M, Malats N, Kauppinen T, Kogevinas M, Benavides FG et al (2002) Occupational exposure to organic solvents and *K-ras* mutations in exocrine pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 23:101–106
23. Alguacil J, Porta M, Kauppinen T, Malats N, Kogevinas M, Carrato A (2003) Occupational exposure to dyes, metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and other agents and *K-ras* activation in human exocrine pancreatic cancer. *Int J Cancer* 107:635–641
24. Porta M, Malats N, Jarid M, Grimalt JO, Rifà J, Carrato A et al (1999) Serum concentrations of organochlorine compounds and *K-ras* mutations in exocrine pancreatic cancer. *Lancet* 354: 2125–2129
25. Wark PA, Van der Kuil W, Ploemacher J, Van Muijen GN, Mulder CJ, Weijnenberg MP et al (2006) Diet, lifestyle and risk of *K-ras* mutation-positive and -negative colorectal adenomas. *Int J Cancer* 119:398–405
26. Porta M, Malats N, Guarner L, Carrato A, Rifà J, Salas A et al (1999) Association between coffee drinking and *K-ras* mutations in exocrine pancreatic cancer. *J Epidemiol Community Health* 53:702–709
27. Porta M, Fabregat X, Malats N, Guarner L, Carrato A, de Miguel A et al (2005) Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol* 7:189–197
28. Armitage P, Berry G, Matthews JNS (2002) *Statistical methods in medical research*, 4th edn. Blackwell, Oxford
29. Kleinbaum DG, Kupper LL, Morgenstern H (1982) *Epidemiologic research*. Lifetime Learning Publications, Belmont, CA, pp 320–376, 343, 419–456
30. Li D, Firozi PF, Zhang W, Shen J, DiGiovanni J, Lau S, Evans D, Friess H, Hassan M, Abbruzzese JL (2002) DNA adducts, genetic polymorphisms, and *K-ras* mutation in human pancreatic cancer. *Mutat Res* 513:37–48

4.3. Article 3: Antecedents patològics i mutacions en l'oncogèn K-*ras* en pacients amb adenocarcinoma ductal de pàncrees

4.3.1. Resum

Hi ha pocs estudis que hagin analitzat el paper etiopatogènic dels antecedents patològics en la prevalença de mutacions en l'oncogèn K-*ras* en l'ADP. Ens vam centrar en les mutacions activadores en l'oncogèn K-*ras* perquè són un esdeveniment fonamental i sobretot, perquè tenen lloc en un moment molt inicial en el procés de carcinogènesi pancreàtica. A més, aquestes mutacions són presents en el teixit de pacients amb pancreatitis o diabetis, patologies que es consideren possibles factors de risc per a l'ADP.

L'objectiu d'aquest estudi va ser analitzar la relació entre els antecedents patològics de diabetis i pancreatitis, entre d'altres, i la prevalença al diagnòstic de mutacions al codó 12 de l'oncogèn K-*ras* en pacients amb ADP.

Es van entrevistar personalment els casos d'ADP; els qüestionaris incloïen preguntes sobre els estils de vida i la història mèdica dels pacients, entre altres factors. Es preguntava per la història familiar de càncer i els antecedents patològics de diabetis mellitus, pancreatitis crònica i aguda, colelitiasis, colecistitis, úlcera pèptica i al·lèrgies. A més, a partir de la història clínica dels pacients, es va recollir informació detallada sobre els símptomes, l'examen físic al moment de l'ingrés, les proves complementàries, els resultats del laboratori i els antecedents patològics dels pacients per complementar i contrastar la informació obtinguda a partir de les entrevistes. Es van comparar els casos d'ADP (N=120) amb i sense mutacions en l'oncogèn K-*ras* mitjançant regressió logística, en un estudi cas-cas.

Els pacients sense mutacions en l'oncogèn K-*ras* tenien més probabilitat d'haver estat diagnosticats prèviament de pancreatitis (OR=6,11; $p=0,041$). Els antecedents patològics de DM-2 eren més freqüents, tot i que de manera no significativa, entre els casos sense la mutació (OR=1,47; $p=0,544$); quan la durada de la diabetis prèvia al diagnòstic de l'ADP era superior a 6 anys l'OR era de 4,54 ($p=0,397$). Els pacients sense mutacions en l'oncogèn K-*ras* tenien també més probabilitat d'haver patit una úlcera pèptica tractada quirúrgicament (OR=9,03; $p=0,027$). La probabilitat de tenir un tumor sense mutacions en l'oncogèn K-*ras* augmentava amb el nombre d'antecedents patològics del pacient (la p de tendència va ser de 0,012).

Diagnòstics previs de pancreatitis i d'úlcer a pèptica eren més comuns en casos d'ADP amb tumors sense mutacions en l'oncogèn K-ras; per tant, aquests dos antecedents patològics estarien afavorint la carcinogènesi pancreàtica a través de vies independents a l'activació de l'oncogèn K-ras.

4.3.2. Principals troballes

Antecedents patològics de pancreatitis, així com d'úlcer a pèptica tractada amb cirurgia, són més freqüents en els casos d'ADP sense mutacions en l'oncogèn K-ras que en els casos amb mutacions.

La prevalença de la DM-2, en canvi, és similar en els pacients amb i sense les mutacions en el gen K-ras, com ja havien descrit altres estudis; de tota manera, la DM-2 prèvia al diagnòstic del càncer és més llarga i el tractament amb hipoglicèmics orals més comú en els casos sense mutacions en l'oncogèn K-ras, tot i que les diferències no són estadísticament significatives.

Ni els antecedents de patologies pancreàtiques benignes (colecistitis i colelitiasis), ni les al·lèrgies influencien la freqüència de mutacions en l'oncogèn K-ras en els pacients d'ADP.

Els antecedents familiars de càncer tampoc influencien el risc de mutacions en l'oncogèn K-ras: els casos d'ADP amb tumors amb mutacions en el gen K-ras no tenen més familiars amb càncer que els pacients sense mutacions en aquest oncogèn. Dels 98 pacients d'ADP amb aquesta informació, 33 tenien algun familiar amb càncer, d'entre els quals només 2 tenien antecedents familiars de càncer de pàncrees: un pacient presentava mutacions en l'oncogèn K-ras i l'altre no.

Tant els antecedents de pancreatitis com els de DM-2, ambdós considerats factors de risc per a l'ADP, semblen estar associats amb alteracions al teixit pancreàtic independents de les vies d'activació de l'oncogèn K-ras.

ARTICLE 3

Crous-Bou M, Porta M, Morales E, López T, Carrato A, Puigdomènech E, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Past medical conditions and K-ras mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Causes and Control* 2009; 20 (en premsa).

Past medical conditions and *K-ras* mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma: a hypothesis-generating study

Marta Crous-Bou · Miquel Porta · Eva Morales ·
Tomàs López · Alfredo Carrato · Elisa Puigdomènech ·
Francisco X. Real · PANKRAS II Study Group

Received: 6 June 2008 / Accepted: 7 November 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract

Background In pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) evidence on the etiopathogenic role of past medical conditions in the occurrence and persistence of *K-ras* mutations is scant.

Methods Incident cases of PDA were interviewed face-to-face about past medical history and other factors. Logistic regression was used to compare PDA cases

($n = 120$) with wild-type and mutated *K-ras* tumors (case–case study).

Results Patients with wild-type *K-ras* tumors were more likely to have a prior diagnosis of pancreatitis (Odds ratio [OR] = 6.11, $p = 0.041$). Diabetes mellitus (DM) was non-significantly more common among cases with a *K-ras* wild-type tumor, and the OR for DM of >6 years of duration was 4.54 ($p = 0.39$). Patients with wild-type *K-ras* were significantly more likely to have had a surgically treated peptic ulcer (OR = 9.03, $p = 0.027$). The probability of having a *K-ras* wild-type tumor increased with the number of medical conditions (p for trend = 0.012); the corresponding OR for two or more medical conditions was 4.46 (95% CI: 1.37–14.50).

Conclusions Results raise the hypothesis that pancreatitis and possibly peptic ulcer might influence pancreatic carcinogenesis through pathways independent of *K-ras* mutation, perhaps related to growth factors or mediators of the inflammatory response. Large unselected studies should be conducted to refute or replicate our findings.

PANKRAS II Study Group—Members of the Multicenter Prospective Study on the Role of *K-ras* and other Genetic Alterations in the Diagnosis, Prognosis and Etiology of Pancreatic and Biliary Diseases (PANKRAS II) Study Group are mentioned in previous publications.

M. Crous-Bou · M. Porta (✉) · E. Morales · T. López ·
E. Puigdomènech · F. X. Real

Clinical & Molecular Epidemiology of Cancer Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Universitat Autònoma de Barcelona, Carrer del Dr. Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain
e-mail: mporta@imim.es

M. Crous-Bou · M. Porta · E. Puigdomènech
Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona,
Barcelona, Spain

M. Crous-Bou · M. Porta · T. López · E. Puigdomènech
CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP),
Barcelona, Spain

A. Carrato
Hospital Universitario de Elche, Universidad Miguel Hernández,
Alacant, Spain

F. X. Real
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Spain

F. X. Real
Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

Keywords Medical conditions · Diabetes mellitus ·
Pancreatitis · Peptic ulcer ·
Pancreatic ductal adenocarcinoma · Pancreatic neoplasms ·
Etiology · *K-ras* oncogene

Abbreviations

PDA Pancreatic ductal adenocarcinoma
OR Odds ratio
CI Confidence interval
SD Standard deviation
DM Diabetes mellitus
CP Chronic pancreatitis
PanIN Pancreatic intraductal neoplasia

Introduction

Firmly established risk factors for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) include age, male sex and tobacco smoking [1–4]. Medical conditions with strong evidence as risk factors for PDA include diabetes mellitus (DM) [5] and chronic pancreatitis (CP) [6]. The role of other disorders, such as peptic ulcer, cholecystitis, gallstones or allergies remains inconclusive [1–3, 7, 8]. Familial aggregation of pancreatic cancer and hereditary chronic pancreatitis has been reported in 5–10% of cases [1, 2, 9–11].

K-ras mutations and genetic inactivation of *INK4A/p16*, *Tp53*, and *Smad4* are the most common molecular alterations associated with PDA. Over the past few years, studies have shown that these genetic changes may be identified in precursor lesions occurring in ducts (pancreatic intraductal neoplasias, PanINs) [12]. Activating point mutations in the *K-ras* oncogene are a fundamental genetic event leading to PDA; their prevalence at the time of PDA diagnosis is about 80% [2, 12–14]. *K-ras* mutations have been also detected in pancreatic preneoplastic lesions as PanIN-1, PanIN-2 and PanIN-3 [13, 15]. Oncogenic *K-ras* activation can result in a wide variety of effects, from activation of a senescence program to increased cell proliferation and inhibition of apoptosis, depending on the cellular and molecular context [1, 13–17]. In addition, evidence from molecular pathology and epidemiology suggests that wild-type and mutated *K-ras* PDA may develop through pathways involving different host–gene–environment interactions [2, 17, 18]. There is accumulating evidence—mainly from mouse models of human PDA—that acinar cells may contribute to the development of PDA; this process may be particularly relevant for patients with chronic pancreatitis [13, 14]. Therefore, it is plausible that different genetic pathways may be associated with PDA occurring in patients with different medical conditions.

Molecular changes occurring in the pancreas of patients with certain diseases, both of this organ and others of systemic nature, might influence the pathways through which PDA develops [13, 14]. Yet, current evidence on the etiopathogenic role of medical conditions in the occurrence and persistence of *K-ras* mutations in PDA is surprisingly scant: only three studies are available. Slebos et al. [19] found a history of diabetes significantly more common in PDA cases with wild-type *K-ras* than in cases with *K-ras* mutated tumors ($p = 0.002$). A history of diabetes was also observed to be more common in pancreatic cancer patients without *K-ras* codon 12 mutations by Fryzek et al. [20]. Finally, Jiao et al. [21] did not find any association between *K-ras* mutations and past medical history of type II diabetes or pancreatitis in pancreatic cancer patients.

Pancreatic tissue of patients with diabetes or pancreatitis is under cellular stress, which may modify the expression of key genes involved in tumor cell growth, invasiveness, programmed cell death and neovascularization, thus contributing to the establishment of a pro-tumorigenic host environment. Chronic inflammation of the pancreas can stimulate pancreatic cell growth by deregulation of the inflammatory response [22]. These cellular effects are mediated through signalling pathways of genes that act as activators or inhibitors of cell cycle progression (such as cyclins, p27 and Ras proteins), cytokines and growth factors (e.g., IL-1, α TGF-, bFGF) [23, 24]. Moreover, in diabetic patients insulin-like growth factors may facilitate pancreatic tumor growth and invasion [25, 26].

The aim of the present study was to analyze the association between selected medical conditions and the prevalence at diagnosis of mutations in the *K-ras* oncogene in patients with PDA.

Patients and methods

Selection of patients

Methods of the PANKRAS II study have been described in detail [17, 27–36]. In Brief, subject recruitment took place between 1992 and 1995 at five general hospitals in the eastern Mediterranean part of Spain, where 185 incident cases of PDA were prospectively identified. All the cases were independently reviewed by the study reference pathologists, who were unaware of the original diagnosis [27, 33]. The present report is based on 120 PDA patients with information on *K-ras* status and past medical history. There were no differences between them and the remaining cases in a broad range of sociodemographic and clinical variables (including prior diagnoses of pancreatitis, diabetes, gallstones, cholecystitis and peptic ulcer), except that the included cases (mean age: 64.4 years) were slightly younger [17]. The Ethics Committees of participating hospitals approved the study protocol, and patients gave informed consent to be included in the study.

Clinicopathological information and personal interviews

More than 89% of the 120 patients were interviewed face-to-face by trained monitors during hospital stay, close to the time of diagnosis. The respondent was the patient himself in 95.3% of the cases and a relative alone in 4.7%. The questionnaire included sections on lifestyle, occupation, family history of cancer, and medical history of diabetes mellitus, chronic and acute pancreatitis, gallstones, cholecystitis, peptic ulcer, and allergic disorders

which their response was requested. The age of onset, the dates of diagnosis or occurrence and the type of treatment received for each condition were also registered [17, 30, 32–34]. A structured form was used by study physicians to abstract information from medical records on presenting symptoms, physical exam at admission, ancillary procedures, laboratory results, and the past medical conditions included in the interview [33]. All items concerning medical conditions were further reviewed by study physicians and checked for consistency [29, 31, 33, 35]. The tumor's clinical stage at diagnosis was classified according to the tumor-node-metastasis (TNM) system. All cases were independently reviewed by the study reference pathologists, who were unaware of the original diagnosis. Histological type was classified according to the International Classification of Diseases for Oncology. A patient's relative was subsequently contacted by telephone to confirm the information available on family history of cancer and on pancreas-related diseases [31]. Information on family history of cancer was obtained from 98 of the 120 PDA patients with information on *K-ras* status and medical history. Thirty-three of the 98 patients had a family history of cancer in a first-degree relative, and 65 did not. Of the 33 patients, 25 had only one, 6 had two, and 2 reported three-first-degree relatives with cancer. The most common tumors were stomach, breast, colorectal, lung, abdomen (not-specified), liver and pancreas.

Detection of *K-ras* mutations

Details of laboratory protocols have also been described elsewhere [17, 28, 30]. In brief, mutations in codon 12 of *K-ras* oncogene were studied using DNA extracted from paraffin-embedded tumor tissue. Amplifications were done in two steps by nested PCR; an artificial BstNI restriction endonuclease site was introduced to discriminate between wild-type and mutated *K-ras* codon 12 sequences. Products were analyzed by acrylamide gel electrophoresis and ethidium bromide staining. This technique was able to detect one homozygous mutated cell in the presence of 10^2 normal cells. To characterize the nucleotide substitution in codon 12, all mutated samples were further analyzed using a similar RFLP-based approach. Interpretation of digestion products' electrophoresis was performed independently by two investigators to confirm the results.

Statistical analysis

In this case–case study [37] we compared the medical history of 27 cases of PDA whose tumors did not harbour a *K-ras* mutation and 93 cases with a *K-ras* mutated tumor. There were no differences between the two types of cases

in age at diagnosis of PDA, sex, education, tumor stage, time from first symptom to diagnosis, signs and symptoms at presentation, study site, and duration of the interview. Univariate statistics were computed as customary [38, 39]. For comparisons between continuous variables Student's *t*-test or Mann–Whitney's *U* test were used to analyze normally and non-normally distributed quantitative variables, respectively. In contingency tables, Fisher's exact test for homogeneity was applied to assess the relationship between two categorical variables. To estimate the magnitude of the associations, multivariate-adjusted odds ratios (ORs) and their corresponding 95% confidence intervals (CI) were calculated by unconditional logistic regression. In all analyses the reference category was patients with mutated *K-ras*. Categorical ordinal variables were analyzed for a linear dose–response relation through the multivariate analogue of Mantel's extension test; when a linear trend was not apparent, Wald's test was used [40]. The main effects of all predictors were independently explored in base models. Age and sex were assessed in all models as potential confounders or were forced in specific models of interest. Other possible confounding variables were retained in the models when they materially altered the estimates; such confounders include tobacco smoking, alcohol drinking, and coffee consumption [28, 36]. Final models were chosen coherently with the nature of the variables and the study objectives. The level of statistical significance was set at 0.05, and all tests are two-tailed. Analyses were performed using SPSS, version 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Results

Pancreatic diseases

The prevalence of pancreatitis was slightly higher in wild-type cases (15%) than in mutated cases (3%) ($p = 0.045$). Patients with a *K-ras* wild-type tumor appeared more than five times more likely to have a prior diagnosis of chronic or acute pancreatitis (OR = 5.58, $p = 0.038$). The OR further adjusted by alcohol consumption was 7.10 ($p = 0.021$). Estimates were slightly weaker for patients with a history of acute pancreatitis than for cases with chronic pancreatitis (Table 1).

The prevalence of diabetes mellitus (DM) in our PDA cases was 21%, with no major differences between mutated and wild-type cases (OR = 1.47, $p = 0.544$). Wild-type cases were more likely to have a DM treated with oral hypoglycemics (OR = 2.96, $p = 0.157$) (Table 2). Requirement for insulin treatment did not seem associated with *K-ras* status in cases with a prior diagnosis of diabetes. Figure 1 shows the duration of DM in cases with and without

Table 1 Past medical history of pancreatitis in PDA patients with and without mutations in the *K-ras* oncogene

	All cases (<i>n</i> = 120)	<i>K-ras</i>			Multivariate OR ^a		Multivariate OR ^b		Multivariate OR ^c	
		Wild-type (<i>n</i> = 27)	Mutated (<i>n</i> = 93)	<i>p</i> ^d	OR (95% CI)	<i>p</i> ^e	OR (95% CI)	<i>p</i> ^e	OR (95% CI)	<i>p</i> ^e
Chronic pancreatitis										
No	117 (97.5)	25 (92.6)	92 (98.9)	0.127	1.00	0.118	1.00	0.085	1.00	0.055
Yes	3 (2.5)	2 (7.4)	1 (1.1)		7.38 (0.60–90.40)		9.31 (0.74–117.40)		12.24 (0.94–158.97)	
Acute pancreatitis										
No	114 (95.8)	23 (88.5)	91 (97.8)	0.069	1.00	0.052	1.00	0.041	1.00	0.097
Yes	5 (4.2)	3 (11.5)	2 (2.2)		6.54 (0.98–43.66)		7.37 (1.08–50.26)		5.49 (0.73–41.09)	
All pancreatitis										
No	113 (94.2)	23 (85.2)	90 (96.8)	0.045	1.00	0.038	1.00	0.021	1.00	0.041
Yes	7 (5.8)	4 (14.8)	3 (3.2)		5.58 (1.10–28.44)		7.10 (1.34–37.67)		6.11 (1.08–34.70)	

Cases with *K-ras* mutated tumors are the reference category in all comparisons

^a Odds ratio adjusted by age and sex

^b Odds ratio adjusted by age, sex and alcohol

^c Odds ratio adjusted by age, sex and alcohol, tobacco smoking and coffee consumption

^d Fisher exact test

^e Wald test

K-ras mutations. Curves appear to diverge about 12 years prior to the diagnosis of PDA, with diabetes being more common in patients with wild-type *K-ras* after that time. The duration of diabetes was non-significantly longer for patients with wild-type *K-ras* (median: 11 years) than for mutated patients (5.4 years). A diabetes longer than 6 years was also non-significantly more common in cases with wild-type *K-ras* tumors (OR = 4.54, *p* = 0.397) (Table 2).

Other medical conditions

There were no statistically significant differences between *K-ras* mutated and wild-type PDA cases with respect to benign biliary pathology (gallstones and cholecystitis) (Table 3). By contrast, a history of peptic ulcer was more common in wild-type cases than in mutated-cases (OR = 3.41, *p* = 0.078). Furthermore, patients who had received surgical treatment for peptic ulcer were more than nine times more likely to have a *K-ras* wild-type tumor (*p* = 0.027). The overall frequency of allergic disorders was similar in the two groups of cases.

Fifty percent of PDA patients had at least one of the past medical conditions included in the study (DM, pancreatitis, benign biliary pathology, peptic ulcer or allergic disorders), and 16% had two or more conditions. The probability of having a *K-ras* wild-type tumor increased with the number of medical conditions (*p* for trend = 0.034); the corresponding OR for two or more medical conditions was 4.23 (*p* < 0.05) (Table 3).

Family history of cancer

Of 98 patients with information on family history of cancer, 33 reported one or more relatives with cancer. Patients with mutated *K-ras* were not more likely to have a relative with cancer than patients with wild-type *K-ras* (multivariate OR = 1.47, 95% CI: 0.47–4.58, *p* = 0.511). There were only two cases with family history of pancreatic cancer, one with a *K-ras* mutated tumor, and one wild-type.

Discussion

A medical history of pancreatitis was more common in patients with PDA whose tumors did not harbor *K-ras* mutations than in patients with *K-ras* mutated tumors. The prevalence of diabetes was similar in PDA patients with and without *K-ras* mutations; however, in cases without mutations the duration of DM was slightly longer and treatment with oral hypoglycemics non-significantly more common. A prior diagnosis of peptic ulcer increased the probability of a *K-ras* wild-type tumor, particularly if the ulcer was surgically treated. The study analyzed *K-ras* activating mutations because they are a fundamental and early event in the PDA process, and because knowledge on this genetic alteration is firmer than on any other alteration involved in PDA [12–14]. Results support the hypothesis that different genetic pathways operate in PDA patients with different previous medical conditions.

Table 2 History of diabetes mellitus in pancreatic ductal adenocarcinoma cases with and without mutations in the K-*ras* oncogene

	All cases (<i>n</i> = 120)		K- <i>ras</i>		Multivariate OR ^a		Multivariate OR ^b		Multivariate OR ^c	
	Wild-type (<i>n</i> = 27)	Mutated (<i>n</i> = 93)	<i>p</i> ^d	OR (95% CI)	<i>p</i> ^e	OR (95% CI)	<i>p</i> ^e	OR (95% CI)	<i>p</i> ^e	OR (95% CI)
Diabetes mellitus										
No	20 (74.1)	75 (80.6)	0.435	1.00	0.392	1.00	0.341	1.00	0.544	
Yes	7 (25.9)	18 (19.4)		1.57 (0.56–4.44)		1.73 (0.56–5.37)		1.47 (0.43–5.04)		
Treatment ^f										
No diabetes	20 (74.1)	75 (80.6)	0.319	1.00		1.00		1.00		
Oral hypoglycemics	5 (83.3)	8 (47.0)		2.43 (0.68–8.66)		3.38 (0.86–13.36)		2.96 (0.66–13.34)		0.157
Insulin	1 (16.7)	7 (41.1)		0.69 (0.08–6.19)		1.11 (0.11–11.07)		1.00 (0.22–7.33)		0.798
Insulin and/or OH	6 (30.0)	12 (66.7)		2.05 (0.65–6.45)		3.46 (0.98–12.19)		3.03 (0.76–12.09)		0.117
Duration of DM prior to diagnosis of PDA	7 (100)	15 (83.3)								
Mean ± SD (years)	10.7 ± 11.3	9.8 ± 11.7	0.606 ^g							
Median (years)	8.4	5.4	0.407 ^h							
No diabetes				1.00	0.299	1.00	0.264	1.00	0.397	
<2 years	7 (31.8)	6 (40.0)	0.289	0.69 (0.08–6.18)	0.092 ⁱ	0.88 (0.09–8.35)	0.071 ⁱ	1.03 (0.10–10.35)	0.163 ⁱ	
2–6 years	4 (18.2)	3 (20.0)		1.20 (0.12–12.27)		1.31 (0.13–13.54)		0.70 (0.05–10.84)		
>6 years	11 (50.0)	6 (40.0)		3.48 (0.92–13.22)		4.92 (0.99–24.25)		4.54 (0.78–26.62)		

Cases with K-*ras* mutated tumors are the reference category in all comparisons

PDA Pancreatic ductal adenocarcinoma, DM diabetes mellitus, OH oral hypoglycemics

^a Odds ratio adjusted by age and sex

^b Odds ratio adjusted by age, sex and tobacco smoking

^c Odds ratio adjusted by age, sex and alcohol, tobacco smoking and coffee consumption

^d Unless otherwise indicated, *p* values derived from Fisher exact test

^e Wald test

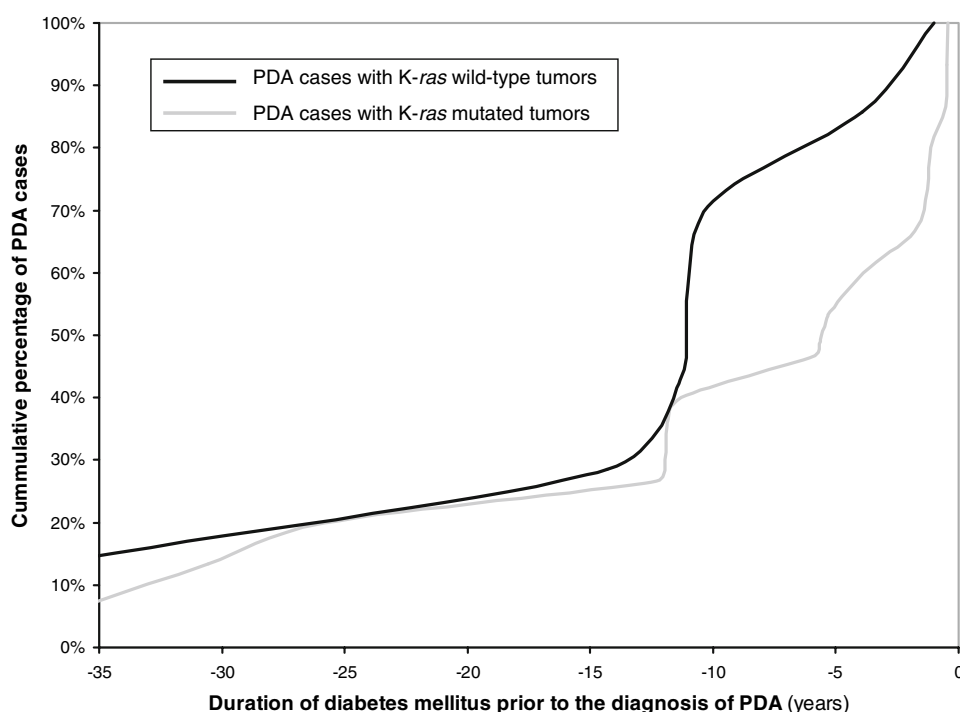
^f One subject may have had more than one treatment. Four patients were treated with a hypocaloric diet only

^g Student's *t*-test

^h Mann–Whitney *U* test

ⁱ Mantel–Haenszel's χ^2 for linear trend

Fig. 1 Duration of diabetes mellitus prior to the diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) in cases with *K-ras* wild-type tumors and cases with *K-ras* mutated tumors



Our results are partly in accordance with the other three studies that contributed some data on the effect of a prior diagnosis of diabetes on *K-ras* mutational status in PDA patients [19–21]: Slebos et al. analyzed tumor tissue of 15 wild-type and 46 *K-ras* mutated patients with PDA, of whom eight (six wild-type [40%] and two mutated [4%]) reported a history of diabetes for more than 1 year prior to the cancer diagnosis; diabetes was hence substantially more common in cases with *K-ras* wild-type tumors (OR = 14.7, $p = 0.002$). The mean time between diagnoses of diabetes and pancreatic cancer was longer for *K-ras* wild-type than for *K-ras* mutated cases (10.8 vs. 4 years, respectively) [19]. Fryzek et al. obtained tumor tissue from 51 of 245 PDA patients (21%); of the 51, 30 (59%) had *K-ras* mutations [20]. Of the 17 patients who reported past medical history of diabetes, nine had a *K-ras* mutated tumor, and eight did not; diabetes was slightly and nonsignificantly more common in cases with *K-ras* wild-type tumors (OR = 1.44, $p = 0.55$) [20]. In plasma DNA from 83 patients with primary PDA, Jiao et al. [21] detected *K-ras* mutations in only 32.5% of patients; mutations were not associated with self-reported diagnoses of pancreatitis (OR = 0.95, $p = 0.92$) and type II diabetes (OR = 1.56, $p = 0.53$). Because the prevalence of *K-ras* mutations in plasma DNA is lower than in tumor tissue, the significance of these results is limited and a comparison with studies based on the molecular analysis of tumor tissue DNA is problematic.

Diabetes was substantially more common in our patients with *K-ras* wild-type tumors about 12 years prior to

diagnosis of PDA, a period that is probably critical for *K-ras* mutation occurrence or for cells with such mutations to gain a proliferative advantage [13, 14]. This finding suggests that diabetes might influence or be associated with pathological changes in pancreatic tissue unrelated to the *K-ras* activation pathway. There is no evidence on *K-ras* activation among diabetics who are otherwise healthy. It has been suggested that insulin and its precursors, pro- and pre-insulin, have some homology to the insulin-like growth factors, and affinity to bind to receptors of the tumor growth factor. Hence, a biological basis exists for a relationship between diabetes, hyperinsulinemia and pancreatic carcinogenesis independent of *K-ras* [25, 26].

No previous studies analyzed whether the prevalence of *K-ras* mutations in PDA is influenced by a prior diagnosis of pancreatitis. The only available evidence concerns the prevalence of *K-ras* mutations in PDA and in chronic pancreatitis (i.e., in the two diseases separately) [41–44]. In the study by Ren et al. [41] the prevalence of *K-ras* mutations was 79% in tissue specimens of patients with pancreatic carcinoma; such figure was significantly higher in patients with chronic pancreatitis (33%). In pancreatic tissue of 80 patients with chronic pancreatitis examined by Gansauge et al. [42], no *K-ras* mutation was detected. Luttges et al. [43] found *K-ras* mutations in 26% of 429 ductal lesions of patients with chronic pancreatitis; mutations were not associated with any type of pancreatitis or with duration of the disease. These studies suggested that pancreatitis may not determine the occurrence of *K-ras* mutations in pancreatic carcinogenesis. However, a note of

Table 3 Medical history of digestive diseases and allergies in PDA patients with and without mutations in the *K-ras* oncogene

	All cases (<i>n</i> = 120)	<i>K-ras</i>		<i>p</i> ^c	Multivariate OR ^a		Multivariate OR ^b		
		Wild-type (<i>n</i> = 27)	Mutated (<i>n</i> = 93)		OR (95% CI)	<i>p</i> ^d	OR (95% CI)	<i>p</i> ^d	
Gallstones									
No	104 (86.7)	24 (88.9)	80 (86.0)	1.000	1.00	0.738	1.00	0.867	
Yes	16 (13.3)	3 (11.1)	13 (14.0)		0.79 (0.20–3.12)		0.88 (0.21–3.72)		
Cholecystitis									
No	117 (97.5)	26 (96.3)	91 (96.8)	0.538	1.00	0.663	1.00	0.819	
Yes	3 (2.5)	1 (3.7)	2 (2.1)		1.72 (0.15–19.78)		1.36 (0.10–18.75)		
Gallstones and/or cholecystitis									
No	103 (85.8)	23 (85.2)	80 (86.0)	1.000	1.00	0.867	1.00	0.681	
Yes	17 (14.2)	4 (14.8)	13 (14.0)		1.11 (0.32–3.85)		1.32 (0.35–4.92)		
Cholecystectomy	10 (8.8)	3 (11.1)	7 (8.0)	0.699	1.50 (0.34–6.51)	0.591	1.93 (0.40–9.36)	0.413	
Peptic ulcer									
No	107 (89.2)	22 (81.5)	85 (91.4)	0.165	1.00	0.159	1.00	0.078	
Yes	13 (10.8)	5 (18.5)	8 (8.6)		2.45 (0.71–8.48)		3.41 (0.87–13.34)		
Pharmacologic treatment	6 (5.1)	1 (3.8)	5 (5.4)		0.77 (0.08–7.20)	0.819	0.85 (0.08–8.88)	0.890	
Surgical treatment	5 (4.2)	3 (11.5)	2 (2.2)		5.77 (0.91–36.77)	0.063	9.03 (1.29–63.32)	0.027	
Allergic disorders									
No	89 (83.2)	19 (76.0)	70 (85.4)	0.359	1.00	0.256	1.00	0.972	
Yes	18 (16.8)	6 (24.0)	12 (14.6)		1.93 (0.62–5.97)		0.98 (0.25–3.88)		
Allergy to antibiotics	13 (12.7)	6 (24.0)	7 (9.1)	0.080	3.56 (1.01–12.56)	0.049	1.66 (0.36–7.58)	0.512	
Medical conditions^e									
No	60 (50.0)	9 (33.3)	51 (54.8)	0.052	1.00	0.044 ^d	1.00	0.100 ^d	
1 medical condition	41 (34.2)	10 (37.0)	31 (33.3)		2.10 (0.73–6.08)	0.012 ^f	1.85 (0.56–6.06)	0.034 ^f	
≥2 medical conditions	19 (15.8)	8 (29.6)	11 (11.8)		4.46 (1.37–14.50)		4.23 (1.13–15.86)		

Cases with *K-ras* mutated tumors are the reference category in all comparisons

^a Odds ratio adjusted by age and sex

^b Odds ratio adjusted by age, sex and alcohol, tobacco smoking and coffee consumption

^c Fisher exact test

^d Wald test

^e Any medical condition mentioned in Tables 1–3 was included

^f Mantel–Haenszel's χ^2 for linear trend

caution is required: an underestimation of the occurrence of *K-ras* mutations in chronic pancreatitis tissue is possible because—due to limitations in the sensitivity of the technique to detect mutations—their prevalence may be dependent on sample selection. Unfortunately, there is not an assay allowing detection of *K-ras* mutations at the single cell level in tissue sections.

Experiments with mice in which a *K-ras* oncogenic knock-in allele is activated at will in the pancreas have suggested that chronic pancreatitis may be essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma [45]. Other authors have suggested that, in addition to the somatic activation of the *K-ras* oncogene, development of human pancreatic cancer may require other genetic and non-genetic events involving tissue damage and/or an

inflammatory response. There is ample evidence on a functional relationship between inflammation and the development of cancer [46, 47], including pancreatic cancer [22]; however, the exact molecular mechanisms have not been elucidated. Our results suggest that pancreatitis may be more related to *K-ras* wild-type pancreatic ductal adenocarcinoma. Chronic inflammation during pancreatitis causes a gradual damage of pancreatic tissue that might contribute to create a microenvironment that favours carcinogenic transformation of acinar pancreatic cells through molecular alterations not involving *K-ras* oncogene mutation. In pancreatic cancer, mediators of the inflammatory response, including NF- κ B, cyclo-oxygenase-2, and TNF α , are known to facilitate genetic damage, tumor cell growth, and metastasis [22–24, 46, 47]. Through these pathways, it

is conceivable that physiological *K-ras* activation and downstream signalling events (e.g., MAPK pathway activation) may contribute to tumor development even in the absence of gene mutation. Similar findings have been reported using transgenic mouse models of PDA [48]. No previous studies analyzed whether the occurrence of *K-ras* mutations is influenced by peptic ulcer.

Our sample size was small and some of our estimates were statistically imprecise. Clearly, larger studies are needed. However, to date this is the largest and less selected study on medical history and *K-ras* mutations in pancreatic cancer. Given that there were no clinical differences between PDA cases with and without *K-ras* mutations, memory efforts were likely similar in the two types of cases, and (differential) recall bias is unlikely. Self-reported prior diagnoses were checked against medical records by study physicians. This approach has limitations as compared to studies specifically designed to assess only a few medical conditions, and with respect to prospective studies. The latter, however, have often been unable to avoid selection biases caused by low retrieval of tumor specimens [20, 49]. Indeed, PDA is the tumor with the lowest histo-cytological confirmation rate, and an increasing proportion of patients is diagnosed using cytology rather than histology, partly because of the low resectability rate [50].

Each association we assessed has a substantial body of knowledge suggesting that each medical condition is or may be a risk factor for PDA. Hence, our analyses did not need to statistically correct for the number of statistical tests: the context of the study is radically different from “omics” studies that explore hundreds of potential associations with no a priori hypotheses. In spite of the low statistical power to detect weak associations, our data did have enough power to detect associations of substantial magnitude. Findings hence deserve to encourage further studies with larger sample sizes, high retrieval of tumor specimens, and more detailed information on past medical conditions.

Though scarce, previous studies suggest that lifestyle and environmental factors may favor *K-ras* mutated PDA [1–4, 17, 28]; by contrast, present results raise the hypothesis that pancreatitis and possibly peptic ulcer might influence pancreatic carcinogenesis through pathways independent of *K-ras* mutation, perhaps related to growth factors or mediators of the inflammatory response. Large unselected studies should be conducted to refute or replicate our findings.

Acknowledgments Supported by research grants from Generalitat de Catalunya (CIRIT SGR 0241, SGR 0078); “Red temática de investigación cooperativa de centros en Cáncer” (C03/10), “Red temática de investigación cooperativa de centros en Epidemiología y salud pública” (C03/09), and CIBER de Epidemiología, Instituto de

Salud Carlos III, Ministry of Health, Spain; the U.S. National Cancer Institute project “Use of the Serum Proteome on the Early Diagnosis of Malignant Biliary-Pancreatic Disease, Follow-up of the PANK-RAS II Sub-cohort with Benign Pathology” (04-C-N272). The authors gratefully acknowledge technical and scientific assistance provided by the study hospital monitors, laboratory technicians, Jose A. Pumarega and Silvia Geeraerd.

References

- Ekblom A, Hunter D (2002) Pancreatic cancer. In: Adami HO, Hunter D, Trichopoulos D (eds) Textbook of cancer epidemiology. Oxford University Press, New York, pp 233–247
- Li D, Jiao L, Porta M (2005) Epidemiology. In: von Hoff DD, Evans DB, Hruban RH (eds) Pancreatic cancer. Jones & Bartlett, Boston, pp 103–117
- Hassan MM, Bondy ML, Wolff RA et al (2007) Risk factors for pancreatic cancer: case-control study. *Am J Gastroenterol* 102:2696–2707
- Lo AC, Soliman AS, El-Ghawalby N et al (2007) Lifestyle, occupational, and reproductive factors in relation to pancreatic cancer risk. *Pancreas* 35:120–129. doi:10.1097/mpa.0b013e318053e7d3
- Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de Gonzalez A, Barzi F, Woodward M (2005) Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer* 92:2076–2083. doi:10.1038/sj.bjc.6602619
- Otsuki M, Tashiro M (2007) Chronic pancreatitis and pancreatic cancer, lifestyle-related diseases. *Intern Med* 46:109–113. doi:10.2169/internalmedicine.46.1787
- Luo J, Nordenvall C, Nyrén O, Adami HO, Permert J, Ye W (2007) The risk of pancreatic cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. *Int J Cancer* 120:368–372. doi:10.1002/ijc.22123
- Gandini S, Lowenfels AB, Jaffee EM, Armstrong TD, Maisonneuve P (2005) Allergies and the risk of pancreatic cancer: a meta-analysis with review of epidemiology and biological mechanisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1908–1916. doi:10.1158/1055-9965.EPI-05-0119
- Silverman DT, Schiffman M, Everhart J et al (1999) Diabetes mellitus, other medical conditions and familial history of cancer as risk factors for pancreatic cancer. *Br J Cancer* 80:1830–1837. doi:10.1038/sj.bjc.6690607
- Efthimiou E, Crnogorac-Jurcevic T, Lemoine NR, Brentnall TA (2001) Inherited predisposition to pancreatic cancer. *Gut* 48:143–147
- Lowenfels AB, Maisonneuve P (2006) Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 20:197–209. doi:10.1016/j.bpg.2005.10.001
- Real FX, Cibrián-Uhalte E, Martinelli P (2008) Pancreatic cancer development and progression: remodeling the model. *Gastroenterology* 135:724–728. doi:10.1053/j.gastro.2008.07.033
- Bardeesy N, DePinho RA (2002) Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2:897–909
- Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA (2006) Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 20:1218–1249. doi:10.1101/gad.1415606
- Maitra A, Adsay NV, Argani P et al (2003) Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol* 16:902–912. doi:10.1097/01.MP.0000086072.56290.FB
- Malumbres M, Barbacid M (2003) RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3:459–465. doi:10.1038/nrc1097

17. Porta M, Malats N, Jariod M et al (1999) Serum concentrations of organochlorine compounds and *K-ras* mutations in exocrine pancreatic cancer. *Lancet* 354:2125–2129. doi:[10.1016/S0140-6736\(99\)04232-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)04232-4)
18. Soliman AS, Bondy M, Webb CR et al (2006) Differing molecular pathology of pancreatic adenocarcinoma in Egyptian and United States patients. *Int J Cancer* 119:1455–1461. doi:[10.1002/ijc.21986](https://doi.org/10.1002/ijc.21986)
19. Slebos RJ, Hoppin JA, Tolbert PE et al (2000) *K-ras* and p53 in pancreatic cancer: association with medical history, histopathology, and environmental exposures in a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:1223–1232
20. Fryzek JP, Garabrant DH, Schenk M, Kinnard M, Greenson JK, Sarkar FH (2006) The association between selected risk factors for pancreatic cancer and the expression of p53 and *K-ras* codon 12 mutations. *Int J Gastrointest Cancer* 37:139–145
21. Jiao L, Zhu J, Hassan MM, Evans DB, Abbruzzese JL, Li D (2007) *K-ras* mutation and p16 and preproenkephalin promoter hypermethylation in plasma DNA of pancreatic cancer patients: in relation to cigarette smoking. *Pancreas* 34:55–62. doi:[10.1097/01.mpa.0000246665.68869.d4](https://doi.org/10.1097/01.mpa.0000246665.68869.d4)
22. Farrow B, Sugiyama Y, Chen A, Uffort E, Nealon W, Evers BM (2004) Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development. *Ann Surg* 239:763–771. doi:[10.1097/01.sla.0000128681.76786.07](https://doi.org/10.1097/01.sla.0000128681.76786.07)
23. Karin M (2005) Inflammation and cancer: the long reach of *Ras*. *Nat Med* 11:20–21. doi:[10.1038/nm0105-20](https://doi.org/10.1038/nm0105-20)
24. Sparmann A, Bar-Sagi D (2005) *Ras* oncogene and inflammation: partners in crime. *Cell Cycle* 4:735–736
25. Schiel R, Beltschikow W, Steiner T, Stein G (2006) Diabetes, insulin, and risk of cancer. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 28:169–175. doi:[10.1358/mf.2006.28.3.985230](https://doi.org/10.1358/mf.2006.28.3.985230)
26. Basso D, Plebani M, Fogar P et al (1995) Insulin-like growth factor-I, interleukin-1 alpha and beta in pancreatic cancer: role in tumor invasiveness and associated diabetes. *Int J Clin Lab Res* 25:40–43. doi:[10.1007/BF02592575](https://doi.org/10.1007/BF02592575)
27. Porta M, Costafreda S, Malats N et al (2000) Validity of the hospital discharge diagnosis in epidemiologic studies of biliary-pancreatic pathology. *Eur J Epidemiol* 16:533–541. doi:[10.1023/A:1007692408457](https://doi.org/10.1023/A:1007692408457)
28. Porta M, Malats N, Guarner L et al (1999) Association between coffee drinking and *K-ras* mutations in exocrine pancreatic cancer. *J Epidemiol Community Health* 53:702–709
29. Malats N, Casals T, Porta M, Guarner L, Estivill X, Real FX (2001) The cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) Δ F508 mutation and 5T allele in patients with chronic pancreatitis and exocrine pancreas cancer. *Gut* 48:70–74
30. Alguacil J, Porta M, Malats N et al (2002) Occupational exposure to organic solvents and *K-ras* mutations in exocrine pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 23:101–106
31. Real FX, Malats N, Lesca G et al (2002) Family history of cancer and germline BRCA2 mutations in sporadic exocrine pancreas cancer. *Gut* 50:653–657
32. Porta M, Fabregat X, Malats N et al (2005) Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol* 7:189–197
33. Soler M, Malats N, Porta M et al (1999) Medical conditions in patients with pancreatic and biliary diseases: validity and agreement between data from questionnaires and medical records. *Dig Dis Sci* 44:2469–2477
34. Soler M, Porta M, Malats N et al (1998) Learning from case-reports: diagnostic issues in an epidemiologic study of pancreatic cancer. *J Clin Epidemiol* 51:1215–1221
35. Gavaldà L, Porta M, Malats N et al (1995) Agreement between information supplied by the patient and a family member on medical history, consumption of tobacco, alcohol and coffee and diet in cancer of the exocrine pancreas and extrahepatic biliary tract. *Gac Sanit* 9:334–342
36. Crous-Bou M, Porta M, López T et al (2007) Lifetime history of tobacco consumption and *K-ras* mutations in exocrine pancreatic cancer. *Pancreas* 35:135–141. doi:[10.1097/mpa.0b013e31805d8fa4](https://doi.org/10.1097/mpa.0b013e31805d8fa4)
37. Rosenbaum PR (2004) The case-only odds ratio as a causal parameter. *Biometrics* 60:233–240. doi:[10.1111/j.0006-341X.2004.00154.x](https://doi.org/10.1111/j.0006-341X.2004.00154.x)
38. Armitage P, Berry G, Matthews JNS (2002) *Statistical methods in medical research*, 4th edn. Blackwell, Oxford
39. Rothman KJ, Greenland S, Lash TL (eds) (2008) *Modern epidemiology*, 3rd edn. Lippincott-Raven, Philadelphia
40. Bland M (1987) *An introduction to medical statistics*. Oxford Medical Publications, Oxford, pp 241–265
41. Ren YX, Xu GM, Li ZS, Song YG (2004) Detection of point mutation in *K-ras* oncogene at codon 12 in pancreatic diseases. *World J Gastroenterol* 10:881–884
42. Gansauge S, Schmid RM, Muller J, Adler G, Mattfeldt T, Beger HG (1998) Genetic alterations in chronic pancreatitis: evidence for early occurrence of p53 but not *K-ras* mutations. *Br J Surg* 85:337–340
43. Luttges J, Diederichs A, Menke MA, Vogel I, Kremer B, Kloppel G (2000) Ductal lesions in patients with chronic pancreatitis show *K-ras* mutations in a frequency similar to that in the normal pancreas and lack nuclear immunoreactivity for p53. *Cancer* 88:2495–2504
44. Löhr M, Kloppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Luttges J (2005) Frequency of *K-ras* mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia* 7:17–23. doi:[10.1593/neo.04445](https://doi.org/10.1593/neo.04445)
45. Guerra C, Schuhmacher AJ, Canamero M et al (2007) Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by *K-ras* oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 11:291–302. doi:[10.1016/j.ccr.2007.01.012](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.01.012)
46. Lu H, Ouyang W, Huang C (2006) Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 4:221–233. doi:[10.1158/1541-7786.MCR-05-0261](https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0261)
47. Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420:860–867. doi:[10.1038/nature01322](https://doi.org/10.1038/nature01322)
48. Hanahan D, Wagner EF, Palmeter RD (2007) The origins of oncomice: a history of the first transgenic mice genetically engineered to develop cancer. *Genes Dev* 21:2258–2270. doi:[10.1101/gad.1583307](https://doi.org/10.1101/gad.1583307)
49. Porta M, Malats N, Vioque J et al (2002) Incomplete overlapping of biological, clinical and environmental information in molecular epidemiologic studies: a variety of causes and a cascade of consequences. *J Epidemiol Community Health* 56:734–738. doi:[10.1136/jech.56.10.734](https://doi.org/10.1136/jech.56.10.734)
50. Porta M, Malats N, Piñol JL, Rifà J, Andreu M, Real FX (1994) Diagnostic certainty and potential for misclassification in exocrine pancreatic cancer. *J Clin Epidemiol* 47:1069–1079. doi:[10.1016/0895-4356\(94\)90123-6](https://doi.org/10.1016/0895-4356(94)90123-6)

4.4. Article 4: Consum d'alcohol i mutacions en l'oncogèn K-*ras* en pacients amb adenocarcinoma ductal de pàncrees

4.4.1. Resum

Gairebé no hi ha estudis sobre la relació entre el consum d'alcohol i la presència de mutacions en l'oncogèn K-*ras* en les diferents neoplàsies en humans; a més, tot i que l'alcohol es considera un factor causal de la pancreatitis crònica, no està ben establert quin és el paper que juga l'alcohol en la carcinogènesi pancreàtica, ja que els resultats dels diferents estudis epidemiològics són inconsistents.

L'objectiu d'aquest estudi va ser analitzar la relació entre el consum d'alcohol al llarg de la vida i la prevalença de mutacions al codó 12 de l'oncogèn K-*ras* en pacients amb ADP.

Es van identificar prospectivament els casos d'ADP, que van ser entrevistats durant el seu ingrés hospitalari; els qüestionaris incloïen preguntes sobre el consum d'alcohol al llarg de la vida dels pacients (la quantitat i el tipus d'alcohol que consumia l'individu per setmana, amb les corresponents dates d'inici i fi), entre d'altres factors com la dieta, el consum de cafè i tabac, els antecedents patològics o l'ocupació. Els casos d'ADP amb i sense mutacions en l'oncogèn K-*ras* (N=107) es van comparar mitjançant regressió logística en un estudi cas-cas.

Els casos d'ADP amb mutacions en l'oncogèn K-*ras* havien estat bevedors moderats i intensos amb més freqüència que els casos sense mutacions: l'OR ajustada per edat i sexe va ser de 2,84 (IC 95%: 0,93-8,68; p=0,066). L'OR ajustada a més per consum de tabac i per antecedents patològics de pancreatitis va ser de 3,18 (IC 95%: 1,02-9,93; p=0,046). Els anys de consum d'alcohol van ser també superiors en els casos d'ADP amb mutacions en l'oncogèn K-*ras* que en els casos sense mutacions en aquest oncogèn.

El consum d'alcohol estaria doncs lleugerament associat amb la presència de mutacions en el codó 12 de l'oncogèn K-*ras* en els pacients d'ADP. L'alcohol podria jugar un paper important en l'adquisició de mutacions en l'oncogèn K-*ras* en l'epiteli pancreàtic a causa dels potencials efectes carcinogènics de l'etanol i del seu principal metabòlit, l'acetaldehid; de tota manera calen estudis epidemiològics més amplis per confirmar o refutar aquesta hipòtesi.

4.4.2. Principals troballes

Hem observat una lleugera associació positiva entre el consum d'alcohol al llarg de la vida i la prevalença al diagnòstic de les mutacions al codó 12 de l'oncogèn K-ras en pacients amb ADP: el consum d'alcohol és superior en els casos d'ADP amb mutacions en l'oncogèn K-ras que en els casos sense mutacions. Els pacients d'ADP que presenten mutacions en aquest oncogèn són consumidors d'alcohol moderats i intensos amb més freqüència que els no mutats; també els anys de bevedor són lleugerament superiors en els pacients d'ADP amb mutacions en l'oncogèn K-ras respecte als pacients sense aquestes mutacions. Els casos d'ADP que van començar a beure després dels 18 anys tenen mutacions en l'oncogèn K-ras amb més freqüència que els pacients en els quals l'edat d'inici del consum d'alcohol és anterior a aquesta edat; en canvi, no s'observen diferències entre els casos d'ADP amb i sense mutacions en l'oncogèn K-ras en relació a la dependència del consum d'alcohol.

Les associacions entre el consum d'alcohol i la prevalença de mutacions en l'oncogèn K-ras són més evidents en el cas del consum de vi que en el consum de cervesa i begudes destil·lades. El consum de vi moderat i intens, i durant més anys, és lleugerament superior en els casos d'ADP amb mutacions en l'oncogèn K-ras que en els casos sense aquestes mutacions. Alhora, els consumidors de vi són els casos d'ADP que consumeixen més grams d'alcohol al llarg de tota la seva vida.

El consum d'alcohol moderat i intens en períodes llunyans al diagnòstic de la malaltia, així com el consum d'alcohol entre els 40 i els 60 anys d'edat del pacient, s'associen positivament a la prevalença de mutacions en l'oncogèn K-ras en els pacients d'ADP.

Els resultats obtinguts donen suport a la hipòtesi que els carcinògens derivats del consum d'alcohol poden estar implicats en l'aparició i persistència de les mutacions en l'oncogèn K-ras en els pacients amb ADP.

ARTICLE 4

Crous-Bou M, Porta M, López T, Jariod M, Malats N, Morales E, Guarner L, Rifà J, Carrato A, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Lifetime history of alcohol consumption and K-ras mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2009; 50 (en premsa).

EMM-08-0167 – Revised version – 24 December 2008

Lifetime history of alcohol consumption and K-*ras* mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma

Marta Crous-Bou^{1,3}, Miquel Porta^{1,3}, Tomàs López^{1,3}, Manel Jariod⁴, Núria Malats^{1,5},
Eva Morales^{1,3}, Luisa Guarnier^{2,6}, Juli Rifà⁷, Alfredo Carrato⁸, Francisco X. Real^{1,5,9}
for the PANKRAS II Study Group***

¹ Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Barcelona, Spain

² Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

³ CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Spain

⁴ Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain

⁵ Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid, Spain

⁶ Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

⁷ Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca, Spain

⁸ Hospital Universitario de Elche, Universidad Miguel Hernández, Alicante, Spain

⁹ Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

** Members of the Multicenter Prospective Study on the Role of K-*ras* and other Genetic Alterations in the Diagnosis, Prognosis and Etiology of Pancreatic and Biliary Diseases (PANKRAS II) Study Group are mentioned in previous publications.

***Correspondence:**

Miquel Porta, MD
Clinical & Molecular Epidemiology of Cancer Unit
Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM)
Universitat Autònoma de Barcelona
Carrer del Dr. Aiguader 88
E-08003 Barcelona, Catalonia, Spain
Phone: +34 93 316 0700 and +34 93 316 0790
Fax: +34 93 316 0410
Email: mporta@imim.es

Total number of:

Tables: 2.

Figures: 2.

Words, abstract: 248.

Words, main text: 2,639.

References: 56.

Running title: Alcohol and *K-ras* mutations in pancreatic cancer.

Acknowledgments

Supported by research grants from Generalitat de Catalunya (CIRIT SGR 0241, SGR 0078); “Red temática de investigación cooperativa de centros en Cáncer” (C03/10), “Red temática de investigación cooperativa de centros en Epidemiología y salud pública” (C03/09), and CIBER de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Health, Spain; and the U.S. National Cancer Institute project “Use of the Serum Proteome on the Early Diagnosis of Malignant Biliary-Pancreatic Disease, Follow-up of the PANKRAS II Sub-cohort with Benign Pathology” (04-C-N272). The authors gratefully acknowledge technical and scientific assistance provided by the study hospital monitors, laboratory technicians and Silvia Geeraerd.

ABSTRACT

Background: In pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) evidence on the etiopathogenic role of alcohol consumption in the occurrence of *K-ras* mutations is scant, and the role of alcohol in pancreatic carcinogenesis is not well established. We analyzed the relation between lifetime consumption of alcohol and mutations in codon 12 of the *K-ras* oncogene in patients with PDA.

Methods: Incident cases of PDA were prospectively identified and interviewed face-to-face during hospital admission about lifetime alcohol consumption and other lifestyle factors. Logistic regression was used to compare PDA cases (N=107) with mutated and wild-type *K-ras* tumors (case-case study).

Results: Mutated cases were moderate or heavy drinkers more frequently than wild-type cases: the odds ratio adjusted by age, sex, smoking and history of pancreatitis (ORa) was 3.18 (95% confidence interval: 1.02-9.93; p=0.046). Total grams of alcohol and years of consumption were higher in mutated than in wild-type cases: the ORa for lifetime alcohol consumption over 507,499 grams was 3.35 (95% CI: 0.81-13.88); and for more than 40 years of alcohol consumption it was 4.47 (95% CI: 1.05-19.02). Age at onset of alcohol consumption and years of abstinence were also associated with the presence of *K-ras* mutations. There were no significant differences in alcohol dependency.

Conclusions: Alcohol consumption is associated with an increased risk of having a *K-ras* mutated PDA. To confirm or to refute the hypothesis that ethanol, acetaldehyde or other alcohol-related substances might influence the acquisition or persistence of *K-ras* mutations in the pancreatic epithelium large and unselected studies are warranted.

Key words: pancreatic ductal adenocarcinoma; pancreatic neoplasm, etiology; alcohol drinking; alcoholic beverages; *Ras* genes.

Abbreviations: PANKRAS II, Multicentre prospective study on the role of *K-ras* and other genetic alterations in the diagnosis, prognosis and etiology of pancreatic and biliary diseases; PDA, Pancreatic ductal adenocarcinoma; IARC, International Agency for Research on Cancer; OR, Odds ratio; CI, Confidence interval; SD, Standard deviation; PanIN, Pancreatic intraductal neoplasia; CRC, Colorectal cancer.

INTRODUCTION

Firmly established risk factors for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) include age, male sex and tobacco smoking [1- 4]. While some studies have suggested that consumption of alcoholic beverages is associated with an increased risk of pancreatic cancer, the role of alcohol in pancreatic carcinogenesis remains inconclusive; moreover, results differ among different types of alcoholic beverages and the amount of alcohol consumed [5- 12].

Activating point mutations in the *K-ras* oncogene are a fundamental genetic event leading to PDA, and are the most common molecular alteration in PDA; their prevalence at the time of diagnosis is about 80% [2, 13- 15]. Over the past few years, studies have shown that these genetic changes may be identified in precursor lesions occurring in ducts, the pancreatic intraductal neoplasias (PanINs) [13,14, 16, 17]. Oncogenic *K-ras* activation can result in a wide variety of effects, from activation of a senescence program to increased cell proliferation and inhibition of apoptosis [1,13,14, 18]. In addition, evidence from molecular pathology and epidemiology suggests that wild-type and mutated *K-ras* PDA may develop through pathways involving different host-gene-environment interactions [2, 19,20].

Evidence on the etiopathogenic role of alcohol consumption in the occurrence and persistence of *K-ras* mutations is surprisingly scant. In 1997 our group first reported that moderate and heavy alcohol consumption may be positively associated to *K-ras* mutations, but findings were based on a small retrospective study [21]. Only 2 additional studies are available on the association between alcohol consumption and *K-ras* mutations, both in patients with colon and rectal cancer [22,23]; they observed no association, and concluded that alcohol is not involved in predisposing to colorectal cancer through mutations in the *K-ras* gene.

There is sufficient evidence for the carcinogenicity of ethanol in experimental animals, and it is also considered carcinogenic to humans (IARC Group1) [24-26]. Moreover, there is increasing evidence that acetaldehyde, a cytotoxic, mutagenic, and carcinogenic metabolite of ethanol, is responsible for tumor enhancing effects leading to aberrant cell proliferation. Acetaldehyde can also bind to DNA, leading to the formation of stable DNA adducts that may cause replication errors and mutations in oncogenes and tumor suppressor genes [22,27-30].

The aim of the present study was to analyze the relation between lifetime consumption of alcohol and the prevalence at diagnosis of mutations in the *K-ras* oncogene in patients with PDA.

PATIENTS AND METHODS

Selection of patients

Methods and strategies of analysis of the PANKRAS II study have been described in detail [19,31- 44]. Briefly, subject recruitment took place between 1992 and 1995 at five general hospitals in the eastern Mediterranean part of Spain, where 185 incident cases of PDA were prospectively identified. The present report is based on 107 PDA patients with known *K-ras* status and with information on consumption of alcoholic beverages [32,42,43]. There were no differences between them and the remaining cases in a broad range of sociodemographic and clinical variables (including sex, education, social class, occupation, hospital of admission, duration of the interview, caloric intake and consumption of coffee, tobacco and alcohol), except that the included cases (mean age: 64.2 years) were slightly younger [19,32]. There were two independent sources of information on all past medical conditions: medical records and patient interviews; a structured form was used by the study physicians to collect clinicopathological information from medical records, including details on diagnostic procedures, laboratory results and follow-up care. Pathology results, discharge diagnoses, and the tumour's clinical stage at diagnosis were also recorded in this form [19,31,38-40,44]. At diagnosis, the tumour's clinical stage of the 107 patients was: 18.7%, stage I; 17.8%, stage II; 13.1%; stage III, and 50.5%; stage IV. All cases were independently reviewed by the study reference pathologists, unaware of the original diagnosis. Furthermore, a panel of clinical and surgical experts in gastrointestinal diseases reviewed hospital discharge diagnoses of all patients and, based on all clinical and pathological information available, including follow-up, achieved a consensual clinicopathological diagnosis [31,38-40,45]. The Ethics Committees of participating hospitals approved the study protocol, and patients gave informed consent to be included in the study.

Personal interviews and information on alcohol consumption

Over 89% of the 185 PDA patients and all 107 were interviewed face-to-face by trained monitors during hospital stay, near the time of diagnosis. The respondent was the patient himself in 95.3% of the cases, and a relative alone in 4.7%. The questionnaire included sections on medical history, symptoms, occupation, diet, and coffee, tobacco, and alcohol consumption [19,32,35,36,38-40]. Detailed information was thus obtained on alcohol consumption for all periods of life; the types and amount of alcoholic beverages consumed per week were elicited with the corresponding dates of initiation and ending. Alcoholic beverages included beer, wine and distilled beverages, covering the most frequent types of alcohol consumed in Spain; grams of alcohol were estimated from each type of alcoholic beverage independently. Alcohol consumption was registered in 4 categories: no drinkers

(no consumption of alcoholic beverages), occasional drinkers (low, no quantifiable consumption of alcoholic beverages), moderate drinkers (consumption under 560 or 280 grams of alcohol per week in men and women, respectively), and heavy drinkers (consumption ≥ 560 or ≥ 280 grams of alcohol per week in men and women, respectively). Lifetime alcohol consumption was dichotomized based on the median among drinkers. Years of abstinence were calculated as the difference between the age at hospital admission and the age at ending of alcohol consumption. Alcohol dependency was defined based on the amount of alcohol consumed (grams per week), the duration of alcohol consumption (years), and patient sex, and categorized as follows: no dependency/abstainers (consumption of < 70 grams per week in women and < 140 grams per week in men), intermediate dependency (consumption of > 70 grams per week in women and > 140 grams per week in men for a period shorter than 10 years), and chronic dependency (consumption of > 70 grams per week in women and > 140 grams per week in men for a period longer than 10 years).

Detection of K-*ras* mutations

Details of laboratory protocols have also been described elsewhere [19,21,32]. Briefly, mutations in codon 12 of K-*ras* oncogene were studied using DNA extracted from paraffin-embedded tumor tissue. Amplifications were done in two steps by nested PCR; an artificial BstNI restriction endonuclease site was introduced to discriminate between wild-type and mutated K-*ras* codon 12 sequences. Products were analyzed by acrylamide gel electrophoresis and ethidium bromide staining. This technique was able to detect one homozygous mutated cell in the presence of 10^2 normal cells. To characterize the nucleotide substitution in codon 12, all mutated samples were further analyzed using a similar RFLP-based approach. Interpretation of digestion products' electrophoresis was performed independently by two investigators to confirm the results.

Statistical analysis

In this case-case study [46] we compared the alcohol consumption of the 83 cases of PDA with a K-*ras* mutated tumor and of the 24 cases of PDA whose tumors did not harbor such mutations (wild-type cases). There were no differences between the two types of cases in age at diagnosis of PDA, sex, education, tumor stage, time from first symptom to diagnosis, symptoms at presentation, study site, and duration of the interview. Univariate statistics were computed as customary [47,48]. In contingency tables, Fisher's exact test for homogeneity was applied to assess the relationship between two categorical variables. For comparisons between continuous variables Student's *t* test or Mann-Whitney's *U* test were used to analyze normally and non-normally distributed quantitative variables, respectively. To estimate the magnitude of the associations multivariate-adjusted odds ratios (OR) and their

corresponding 95% confidence intervals (CI) were calculated by unconditional logistic regression. Categorical ordinal variables were analyzed for a linear dose-response relation through the multivariate analogue of Mantel's extension test; when a linear trend was not apparent, Wald's test was used [46,49]. The main effects of all predictors were independently explored in base models. Age and sex were assessed in all models as potential confounders or were forced in specific models of interest. Other possible confounding variables were retained in the models when they materially altered the estimates; such confounders include tobacco smoking, coffee consumption, and history of pancreatitis [43]. Final models were chosen coherently with the nature of the variables and the study objectives. The level of statistical significance was set at 0.05, and all tests are two-tailed. Analyses were performed using SPSS, version 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

RESULTS

The lifetime prevalence of alcohol consumption was slightly higher in cases with PDA bearing mutated *K-ras* (83%) than in wild-type cases (67%) ($p=0.091$). Patients with a *K-ras* mutated tumor were more likely to have been moderate or heavy drinkers than wild-type cases: the odds ratio adjusted by age, sex, tobacco and pancreatitis (ORa) was 3.18 ($p=0.046$) (Table I). Compared to non-drinkers and occasional drinkers, the ORa for moderate drinkers was 3.26 (95% CI: 1.00-10.67); and for heavy drinkers, 2.95 (95% CI: 0.66-13.23). Lifetime grams of alcohol consumption was non-significantly higher in mutated cases ($p=0.679$). The ORa for lifetime consumption over 507,499 grams of alcohol was 3.35 (95% CI: 0.81-13.88). Years of drinking were similar in mutated (37 years) than in wild-type (33 years) cases ($p=0.624$); as compared to non-drinkers and occasional drinkers, the ORa for 1-20, 21-40, and >40 years of alcohol consumption were 1.72, 2.92 and 4.47, respectively (p for trend=0.03). Patients who started to drink older than 18 years showed a higher prevalence of *K-ras* mutations: ORa = 5.39 (95% CI: 1.20-18.19), and a linear trend was apparent ($p=0.018$) (Table I). There were no statistically significant differences between *K-ras* mutated and wild-type PDA cases with respect to alcohol dependency ($p=0.517$).

Compared to non-drinkers and occasional drinkers of wine, the ORa for moderate and heavy drinkers of wine was 3.20 ($p=0.042$) (Table II). Compared to non-drinkers and occasional drinkers, the ORa for a lifetime consumption of less than 349.4 grams of alcohol was 4.91, and for >349.4 grams it was 2.50 ($p = 0.07$). Years of drinking wine were also slightly higher in mutated than in wild-type cases. Other types of alcoholic beverages were not associated at all with *K-ras* (Table II).

To assess the effect of alcohol consumption in different periods before the diagnosis of PDA, ORa were computed for each 10-year period from 40 years before the diagnosis.

Considering non-drinkers and occasional drinkers as the reference category in each period, moderate and heavy drinkers showed a significant higher frequency of *K-ras* mutations in the 2 more distant periods from diagnosis: the ORa were 1.68 ($p=0.321$), 2.20 ($p=0.137$), 3.67 ($p=0.023$) and 2.77 ($p=0.047$) in each period (Figure 1).

Significant associations were also apparent by patient's age: the ORa were 0.89 ($p=0.824$), 1.90 ($p=0.236$), 2.33 ($p=0.126$), 5.33 ($p=0.004$), 3.72 ($p=0.028$), 1.59 ($p=0.456$) and 1.00 ($p=1.000$) at the age intervals shown in Figure 2.

DISCUSSION

We observed some positive relationships between lifetime history of alcohol consumption and the prevalence at diagnosis of mutations in codon 12 of the *K-ras* oncogene in PDA cases. Patients bearing mutated *K-ras* were more likely to have been moderate or heavy drinkers, and to have drunk more years, than patients bearing wild-type *K-ras*. Other variables were similar in the two groups of cases. The prevalence of wine consumption was higher in mutated than in wild-type cases; no significant differences were apparent in consumption of beer and distilled beverages. Alcohol drinking in distant periods from the diagnosis of PDA, and drinking between 40 and 60 years of age were also positively associated with a *K-ras* mutated PDA.

The study analyzed *K-ras* activating mutations because they are a fundamental and early event in the PDA process; knowledge on this acquired genetic alteration is firmer than on any other alteration relevant in PDA [13,14,16]. Results support only weakly the hypothesis that carcinogens derived from alcohol consumption might be involved in the occurrence and persistence of *K-ras* mutations in tumors from PDA patients.

There is scarce evidence on a causal relationship between alcohol drinking and *K-ras* mutations in cancer [21-23]. Two studies analyzed the association in colon and rectal cancer [22,23], and one in PDA [21]. In our previous retrospective study [21], based on tumor tissue from 45 PDA patients (17 wild-type and 28 *K-ras* mutated), we found a non-significant association (OR=3.02, 95% CI: 0.86-10.05, p=0.079). Bongaerts et al. [22] analyzed tumor tissue of 648 colorectal cancer (CRC) cases, 417 with wild-type *K-ras* and 231 with mutated *K-ras*; as compared to abstaining, the OR for consumption of less than 30 grams of alcohol per day was 0.93 (95% CI: 0.63-1.36), and for ≥ 30 grams / day was 0.98 (95% CI: 0.55-1.73); there were no differences in type of alcoholic beverages between mutated and wild-type *K-ras* cases [22]. Slattery et al. [23] reported no association between total alcohol consumption and *K-ras* mutations in their population-based case-control study on sporadic colon cancer, which included 454 *K-ras* mutated and 966 *K-ras* wild type cases; alcohol consumption above 10 g/day was not associated with *K-ras* mutations (OR: 0.8; 95% CI: 0.6-1.0).

Ethanol is considered as carcinogen in experimental animals, and a causal relationship has been established between exposure to ethanol and human cancer; it is classified as a Group1 carcinogenic agent by IARC [24,25]. Under certain conditions ethanol might also function as a co-carcinogen or promoter [26-28]. Ethanol is metabolized to acetaldehyde by

alcohol dehydrogenase, which is a known carcinogen and mutagen in experimental animals (classified in Group 2B by IARC) [10,24-26,28]. Acetaldehyde interferes with DNA synthesis and repair, causes cytogenetic abnormalities in eukaryotic cells, point mutations in specific genes, and induces chromosomal aberrations; furthermore, acetaldehyde binds directly to DNA, forming stable DNA adducts that have been found in alcohol drinkers, and that may cause replication errors and mutations in tumor suppressor genes and oncogenes [10,28,50-53]. Acetaldehyde may be an important cancer-causing agent in the upper and lower gastrointestinal tract, as acetaldehyde concentrations in saliva and the large intestine are high enough to enable it to act as a carcinogen [28,52,54]. Acetaldehyde is also known to directly injure pancreatic tissue [7,10].

Our sample size was undoubtedly small, and estimates were often statistically imprecise or non-significant. However, to date this is the largest study on alcohol consumption and *K-ras* mutations in pancreatic cancer. In spite of the low power to detect weak associations, our data did have enough power to detect associations of substantial magnitude. A substantial number of comparisons were done, with the ensuing risks of multiple comparisons. Findings hence deserve to encourage further studies with larger sample sizes and more detailed information on lifetime alcohol consumption. Though scarce, previous studies suggest that lifestyle and environmental factors may favor *K-ras* mutated PDA [1-4,19,35,55]. We achieved a high response rate, and over 80% of cases were interviewed face-to-face soon around the time of diagnosis. Other epidemiologic studies in pancreatic cancer had response rates of 40% - 60%, even when not including biological samples and when interviewing patients or relatives months after diagnosis [2,21,45,55,56]. The proportion of cases with molecular and alcohol drinking data (58%) is also high for PDA. Lack of differences between patients included and excluded further argues against important selection bias [31,32]. Given that there were no clinical differences between PDA cases with and without *K-ras* mutations, memory efforts were likely similar in the two types of cases, and (differential) recall bias is unlikely. We had excellent information on smoking, which is less common among *K-ras* mutated cases than among *K-ras* wild-type cases [43]. Thus, our analyses addressed thoroughly the possibility of confounding by smoking, and residual confounding is unlikely; any residual confounding would tend to strengthen the association between alcohol and *K-ras* mutations.

In conclusion, results suggest that lifetime alcohol consumption is only weakly associated with an increased risk of having a *K-ras* mutated PDA. To confirm or to refute the hypothesis that ethanol and acetaldehyde play a role in the acquisition of *K-ras* mutations in the pancreatic epithelium large molecular epidemiologic studies are warranted.

REFERENCES

1. Ekblom A, Hunter D. 2002. Pancreatic cancer. In: Adami HO, Hunter D, Trichopoulos D, eds. *Textbook of Cancer Epidemiology*. New York: Oxford University Press. p 233-247.
2. Li D, Jiao L. 2005. Epidemiology. In: von Hoff DD, Evans DB, Hruban RH, editors. *Pancreatic Cancer*. Boston: Jones & Bartlett. p 103-117.
3. Hassan MM, Bondy ML, Wolff RA, Abbruzzese JL, Vauthey JN, Pisters PW, Evans DB, Khan R, Chou TH, Lenzi R, Jiao L, Li D. 2007. Risk factors for pancreatic cancer: case-control study. *Am J Gastroenterol* 102:2696-2707.
4. Lo AC, Soliman AS, El-Ghawalby N, Abdel-Wahab M, Fathy O, Khaled HM, Omar S, Hamilton SR, Greenson JK, Abbruzzese JL. 2007. Lifestyle, occupational, and reproductive factors in relation to pancreatic cancer risk. *Pancreas* 35:120-129.
5. Weiderpass E, Partanen T, Kaaks R, Vainio H, Porta M, Kauppinen T, Ojajärvi A, Boffetta P, Malats N. 1998. Occurrence, trends and environment etiology of pancreatic cancer. *Scand J Work Environ Health* 24:165-174.
6. Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Fuchs CS. 2001. Coffee and alcohol consumption and the risk of pancreatic cancer in two prospective United States cohorts. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:429-437.
7. Go VL, Gukovskaya A, Pandol SJ. 2005. Alcohol and pancreatic cancer. *Alcohol* 35:205-211.
8. Yang AL, Vadhavkar S, Singh G, Omary MB. 2008. Epidemiology of alcohol-related liver and pancreatic disease in the United States. *Arch Intern Med* 168:649-656.
9. Ye W, Lagergren J, Weiderpass E, Nyrén O, Adami HO, Ekblom A. 2002. Alcohol abuse and the risk of pancreatic cancer. *Gut* 51:236-239.
10. Welsch T, Kleeff J, Seitz HK, Büchler P, Friess H, Büchler MW. 2006. Update on pancreatic cancer and alcohol-associated risk. *J Gastroenterol Hepatol* 21:69-75.
11. Lowenfels AB, Maisonneuve P. 2006. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 20:197-209.
12. Otsuki M, Tashiro M. 2007. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer, lifestyle-related diseases. *Intern Med* 46:109-113.
13. Bardeesy N, DePinho RA. 2002. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2:897-909.
14. Blanck HM, Tolbert PE, Hoppin JA. 1999. Patterns of genetic alterations in pancreatic cancer: A pooled analysis. *Environ Molec Mutagenesis* 33:111-122.
15. Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA. 2006. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 20:1218-1249.
16. Real FX, Cibrián-Uhalte E, Martinelli P. 2008. Pancreatic cancer development and progression: remodeling the model. *Gastroenterology* 135:724-728.
17. Maitra A, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH. 2003. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol* 16:902-912.
18. Malumbres M, Barbacid M. 2003. *RAS* oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 3:459-465.
19. Porta M, Malats N, Jarrod M, Grimalt JO, Rifà J, Carrato A, Guarnier L, Salas A, Santiago-Silva M, Corominas JM, Andreu M, Real FX. 1999. Serum concentrations of organochlorine compounds and *K-ras* mutations in exocrine pancreatic cancer. *Lancet* 354:2125-2129.
20. Soliman AS, Bondy M, Webb CR, Schottenfeld D, Bonner J, El-Ghawalby N, Sulttan A, Abdel-Wahab M, Fathy O, Ebidi G, Zhang Q, Greenson JK, Abbruzzese JL, Hamilton SR. 2006. Differing molecular pathology of pancreatic adenocarcinoma in Egyptian and United States patients. *Int J Cancer* 119:1455-1461.

21. Malats N, Porta M, Corominas JM, Piñol JL, Rifà J, Real FX. 1997. *Ki-ras* mutations in exocrine pancreatic cancer: association with clinico-pathological characteristics and with tobacco and alcohol consumption. PANK-*ras* I Project Investigators. *Int J Cancer* 70:661-667.
22. Bongaerts BW, de Goeij AF, van den Brandt PA, Weijnenberg MP. 2006. Alcohol and the risk of colon and rectal cancer with mutations in the *K-ras* gene. *Alcohol* 38:147-154.
23. Slattery ML, Curtin K, Anderson K, Ma KN, Edwards S, Leppert M, Potter J, Schaffer D, Samowitz WS. 2000. Associations between dietary intake and *Ki-ras* mutations in colon tumors: a population-based study. *Cancer Res* 60:6935-6941.
24. Alcohol drinking. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1988. Vol 44. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
25. Consumption of alcoholic beverages. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. In press. Vol 96. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
26. Boffetta P, Hashibe M. 2006. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol* 7:149-156.
27. Simanowski UA, Homann N, Knühl M, Arce L, Waldherr R, Conradt C, Bosch FX, Seitz HK. 2001. Increased rectal cell proliferation following alcohol abuse. *Gut* 49:418-422.
28. Seitz HK, Stickel F. 2007. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 7:599-612.
29. Seitz HK, Matsuzaki S, Yokoyama A, Homann N, Väkeväinen S, Wang XD. 2001. Alcohol and cancer. *Alcohol Clin Exp Res* 25:137-143.
30. Salaspuro MP. 2003. Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17:679-694.
31. Porta M, Costafreda S, Malats N, Guarner L, Soler M, Gubern JM, García-Olivares E, Andreu M, Salas A, Corominas JM, Alguacil J, Carrato A, Rifà J, Real FX. 2000. Validity of the hospital discharge diagnosis in epidemiologic studies of biliopancreatic pathology. *Eur J Epidemiol* 16:533-541.
32. Porta M, Malats N, Guarner L, Carrato A, Rifà J, Salas A, Corominas JM, Andreu M, Real FX. 1999. Association between coffee drinking and *K-ras* mutations in exocrine pancreatic cancer. *J Epidemiol Community Health* 53:702-709.
33. Porta M, Malats N, Alguacil J, Ruiz L, Jarrod M, Carrato A, Guarner L. 2000. Coffee, pancreatic cancer, and *K-ras* mutations: updating the research agenda. *J Epidemiol Community Health* 54: 656-659.
34. Malats N, Casals T, Porta M, Guarner L, Estivill X, Real FX. 2001. The cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) Δ F508 mutation and 5T allele in patients with chronic pancreatitis and exocrine pancreas cancer. *Gut* 48:70-74.
35. Alguacil J, Porta M, Malats, Kauppinen T, Kogevinas M, Benavides FG, Partanen T, Carrato A. 2002. Occupational exposure to organic solvents and *K-ras* mutations in exocrine pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 23:101-106.
36. Alguacil J, Porta M, Kauppinen T, Malats N, Kogevinas M, Carrato A; PANKRAS II Study Group. 2003. Occupational exposure to dyes, metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and other agents and *K-ras* activation in human exocrine pancreatic cancer. *Int J Cancer* 107:635-641.
37. Real FX, Malats N, Lesca G, Porta M, Chopin S, Lenoir GM, Siniinikova O. 2002. Family history of cancer and germline BRCA2 mutations in sporadic exocrine pancreas cancer. *Gut* 50:653-657.
38. Porta M, Fabregat X, Malats N, Guarner L, Carrato A, de Miguel A, Ruiz L, Jarrod M, Costafreda S, Coll S, Alguacil J, Corominas JM, Solà R, Salas A, Real FX. 2005. Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol* 7:189-197.
39. Soler M, Malats N, Porta M, Fernandez E, Guarner L, Maguire A, Piñol JL, Rifà J, Carrato A. 1999. Medical conditions in patients with pancreatic and biliary diseases: validity and agreement between data from questionnaires and medical records. *Dig Dis Sci* 44:2469-2477.

40. Soler M, Porta M, Malats N, Guarner L, Costafreda S, Gubern JM, García-Olivares E, Andreu M, Real FX. 1998. Learning from case-reports: Diagnostic issues in an epidemiologic study of pancreatic cancer. *J Clin Epidemiol* 51:1215-1221.
41. Gavaldà L, Porta M, Malats N, Piñol JL, Fernandez E, Maguire A, Cortès I, Carrillo E, Marrugat M, Rifà J. 1995. Agreement between information supplied by the patient and a family member on medical history, consumption of tobacco, alcohol and coffee and diet in cancer of the exocrine pancreas and extrahepatic biliary tract. *Gac Sanit* 9:334-342.
42. Morales E, Porta M, Vioque J, López T, Mendez MA, Pumarega JA, Malats N, Crous-Bou M, Ngo J, Rifà J, Carrato A, Guarner L, Corominas JM, Real FX, for the PANKRAS II Study Group. 2007. Food and nutrient intakes and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *J Epidemiol Community Health* 61:641-649.
43. Crous-Bou M, Porta M, López T, Jariod M, Malats N, Alguacil J, Morales E, Fernandez E, Corominas JM, Carrato A, Guarner L, Real FX. 2007. Lifetime history of tobacco consumption and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *Pancreas* 35:135-141.
44. Crous-Bou M, Porta M, Morales E, López T, Carrato A, Puigdomènech E, Real FX. 2009. Past medical conditions and K-ras mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma: a hypothesis-generating study. *Cancer Causes Control* 20 (in press). PMID: 19083106.
45. Porta M, Malats N, Piñol JL, Rifà J, Andreu M, Real FX. 1994. Diagnostic certainty and potential for misclassification in exocrine pancreatic cancer. *J Clin Epidemiol* 47: 1069-1079.
46. Rosenbaum PR. 2004. The case-only odds ratio as a causal parameter. *Biometrics* 60:233-240.
47. Armitage P, Berry G, Matthews JNS. 2002. *Statistical methods in medical research*. 4th edition. Oxford: Blackwell.
48. Rothman KJ, Greenland S, Lash TL. 2008. *Modern epidemiology*. 3rd edition. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins.
49. Bland M. 1987. *An Introduction to Medical Statistics*. Oxford: Oxford Medical Publications. p 241-265.
50. Wang M, Yu N, Chen L, Villalta PW, Hochalter JB, Hecht SS. 2006. Identification of an acetaldehyde adduct in human liver DNA and quantitation as N2-ethyldeoxyguanosine. *Chem Res Toxicol* 19:319-324.
51. Pöschl G, Stickel F, Wang XD, Seitz HK. 2004. Alcohol and cancer: genetic and nutritional aspects. *Proc Nutr Soc* 63:65-71.
52. Seitz HK, Simanowski UA, Garzon FT, Rideout JM, Peters TJ, Koch A, Berger MR, Einecke H, Maiwald M. 1990. Possible role of acetaldehyde in ethanol-related rectal cocarcinogenesis in the rat. *Gastroenterology* 98:406-413.
53. Simanowski UA, Suter P, Russell RM, Heller M, Waldherr R, Ward R, Peters TJ, Smith D, Seitz HK. 1994. Enhancement of ethanol induced rectal mucosal hyper regeneration with age in F344 rats. *Gut* 35:1102-1106.
54. Sarkola T, Iles MR, Kohlenberg-Mueller K, Eriksson CJ. 2002. Ethanol, acetaldehyde, acetate, and lactate levels after alcohol intake in white men and women: effect of 4-methylpyrazole. *Alcohol Clin Exp Res* 26:239-245.
55. Vineis P, Malats N, Porta M, Real FX. 1999. Human cancer, carcinogenic exposures and mutation spectra. *Mutat Res* 436: 185-194.
56. Porta M, Malats N, Corominas JM, Rifà J, Piñol JL, Real FX; Pankras I Project Investigators. 2002. Generalizing molecular results arising from incomplete biological samples: expected bias and unexpected findings. *Ann Epidemiol* 12:7-14.

Table I. Main characteristics of drinking habits among cases of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) with and without mutations in codon 12 of the K-*ras* oncogene.

	K- <i>ras</i> *				OR†			OR‡		
	All cases (N=107)	Mutated (N=83)	Wild-type (N=24)	p ¹	OR	(95% CI)	p ²	OR	(95% CI)	p ²
Alcohol consumption										
No & Occasional	22 (20.6)	14 (16.9)	8 (33.3)	0.091	1.00		0.066	1.00		0.046
Moderate & Heavy	85 (79.4)	69 (83.1)	16 (66.7)		2.84	(0.93-8.68)		3.18	(1.02-9.93)	
Lifetime alcohol consumption (grams) §										
Median	434.3	437.1	412.9	0.679 ³						
No & Occasional	22 (21.4)	14 (17.5)	8 (34.8)	0.185	1.00		0.191	1.00		0.146
<507,499 g	42 (40.8)	35 (43.8)	7 (30.4)		2.93	(0.86-9.99)		3.05	(0.88-10.52)	0.096 ⁴
≥507,499 g	39 (37.9)	31 (38.8)	8 (34.8)		2.61	(0.70-9.73)		3.35	(0.81-13.88)	
Years of drinking										
Median	35.0	37.0	33.0	0.624 ³						
No & Occasional	22 (21.4)	14 (17.5)	8 (34.8)	0.197	1.00		0.209	1.00		0.206
1-20 years	10 (9.7)	7 (8.8)	3 (13.0)		1.36	(0.26-7.09)	0.033 ⁴	1.72	(0.30-9.87)	0.034 ⁴
21-40 years	40 (38.8)	32 (40.0)	8 (34.8)		2.51	(0.68-9.34)		2.92	(0.73-11.62)	
>40 years	31 (30.1)	27 (33.8)	4 (17.4)		4.26	(1.04-17.46)		4.47	(1.05-19.02)	
Age at onset										
Median	20.0	20.0	18.0	0.823 ³						
No & Occasional	22 (20.6)	14 (16.9)	13 (14.0)	0.092	1.00		0.084	1.00		0.063
≤18 years	45 (42.1)	34 (41.0)	7 (8.0)		2.04	(0.62-6.68)	0.025 ⁴	2.23	(0.66-7.49)	0.018 ⁴
>18 years	40 (37.4)	35 (42.2)	7 (8.0)		4.67	(1.20-18.19)		5.39	(1.32-21.99)	
Years of abstinence										
Median	0.0	0.0	0.0	0.890 ³						
No & Occasional	22 (20.8)	14 (17.1)	8 (33.3)	0.405	1.00		0.327	1.00		0.265
>4 years	14 (13.2)	11 (13.4)	3 (12.5)		2.27	(0.46-11.36)	0.084 ⁴	3.30	(0.59-18.52)	0.096 ⁴
1-4 years	15 (14.2)	12 (14.6)	3 (12.5)		2.58	(0.53-12.49)		2.77	(0.55-14.02)	
Current drinkers	55 (51.9)	45 (54.9)	10 (41.7)		3.13	(0.91-10.71)		3.25	(0.94-11.30)	
Alcohol dependency										
Abstainers & non-dependents	42 (39.3)	32 (38.6)	10 (41.7)	0.529	1.00		0.517	1.00		0.818
Intermediate depend.	41 (38.3)	34 (41.0)	7 (29.2)		1.51	(0.51-4.53)		1.40	(0.45-4.33)	
Chronic dependency	24 (22.4)	17 (20.5)	7 (29.2)		0.75	(0.23-2.46)		1.01	(0.28-3.65)	

*Values in parentheses are column percentages, except otherwise stated.

§ Lifetime alcohol consumption was dichotomized based on the median only among drinkers.

†Odds ratio adjusted by age and sex.

‡Odds ratio adjusted by age, sex, tobacco smoking, and history of pancreatitis.

¹Unless otherwise indicated Fisher exact test are used.

²Unless otherwise indicated Wald test are used.

³Mann-Whitney's U test. ⁴p-trend.

Table II. Type of alcohol consumption in PDA patients with and without mutations in the K-ras oncogene.

	All cases** (N=107)	K-ras*		p ¹	OR [†]			OR [‡]		
		Mutated (N=83)	Wild-type (N=24)		OR	(95% CI)	p ²	OR	(95% CI)	p ²
Wine consumption										
No & Occasional	35 (32.7)	23 (27.7)	12 (50.0)	0.050	1.00		0.028	1.00		0.042
Moderate & Heavy	72 (67.3)	60 (72.3)	12 (50.0)		3.23	(1.13-9.20)		3.20	(1.05-9.77)	
Lifetime wine consumption[§]										
Median	131.0	144.5	0.0	0.153 ³						
No & Occasional	35 (34.0)	23 (28.8)	12 (52.2)	0.074	1.00		0.069	1.00		0.067
≤349,440 g	35 (34.0)	31 (38.8)	4 (17.4)		4.85	(1.23-19.16)		4.91	(1.23-19.54)	
>349,440 g	33 (32.0)	26 (32.5)	7 (30.4)		2.42	(0.70-8.37)		2.50	(0.71-8.81)	
Years of drinking wine										
Median	29.0	32.0	0.0	0.055 ³						
No & Occasional	35 (34.0)	23 (28.8)	12 (52.2)		1.00		0.089	1.00		0.141
≤40 years	41 (39.8)	34 (42.5)	7 (30.4)		3.31	(0.94-11.67)	0.053 ⁴	3.02	(0.83-10.97)	0.079 ⁴
>40 years	27 (26.2)	23 (28.8)	4 (17.4)	0.139	3.44	(0.87-13.56)		3.21	(0.78-13.25)	
Beer consumption										
No & Occasional	62 (57.9)	46 (55.4)	16 (66.7)	0.358	1.00		0.206	1.00		0.346
Moderate & Heavy	45 (42.1)	37 (44.6)	8 (33.3)		2.10	(0.66-6.65)		1.78	(0.54-5.92)	
Lifetime beer consumption[§]										
Median	0.0	0.0	0.0	0.352 ³						
No & Occasional	62 (59.0)	46 (56.1)	16 (69.6)	0.185	1.00		0.254	1.00		0.250
≤372,372 g	24 (22.9)	22 (26.8)	2 (8.7)		4.15	(0.77-22.45)		4.20	(0.77-22.77)	
>372,372 g	19 (18.1)	14 (17.1)	5 (21.7)		1.28	(0.30-5.51)		1.37	(0.31-6.12)	
Years of drinking beer										
Median	0.0	1.5	0.0	0.161 ³						
No & Occasional	56 (53.3)	41 (50.0)	15 (65.2)	0.240	1.00		0.265	1.00		0.315
≤33 years	27 (25.7)	21 (25.6)	6 (26.1)		1.51	(0.38-5.97)	0.101 ⁴	1.45	(0.35-5.98)	0.130 ⁴
>33 years	22 (21.0)	20 (24.4)	2 (8.7)		4.11	(0.75-22.56)		4.01	(0.67-24.02)	
Distilled beverages consumption										
No & Occasional	59 (55.1)	46 (55.4)	13 (54.2)	1.000	1.00		0.772	1.00		0.653
Moderate & Heavy	48 (44.9)	37 (44.6)	11 (45.8)		1.19	(0.37-3.75)		0.75	(0.22-2.60)	
Lifetime distilled beverages consumption[§]										
Median	0.0	0.0	0.0	0.693 ³						
No & Occasional	59 (56.2)	46 (56.8)	13 (54.2)	0.666	1.00		0.809	1.00		0.306
≤51,480 g	22 (21.0)	18 (22.2)	4 (16.7)		1.26	(0.32-5.07)		1.42	(0.31-6.54)	
>51,480 g	24 (22.9)	17 (21.0)	7 (29.2)		0.76	(0.18-3.24)		0.36	(0.06-2.03)	
Years of drinking distilled beverages										
Median	0.0	0.0	2.0	0.837 ³						
No & Occasional	56 (52.3)	44 (53.0)	12 (50.0)	0.453	1.00		0.445	1.00		0.731
≤28 years	30 (28.0)	21 (25.3)	9 (37.5)		0.55	(0.15-2.03)		0.58	(0.14-2.44)	
>28 years	21 (19.6)	18 (21.7)	3 (12.5)		1.46	(0.34-6.36)		0.95	(0.18-5.09)	

*Values in parentheses are column percentages, except otherwise stated; [§]Lifetime wine, beer or distilled alcohol consumption was dichotomized based on the median only among drinkers. [†]Odds ratio adjusted by age, sex, tobacco smoking, and history of pancreatitis; [‡]Odds ratio adjusted by age, sex, tobacco smoking, history of pancreatitis, and the other two types of alcohol consumption (beer, wine or distilled beverages consumption as convenience). ¹Unless otherwise indicated Fisher exact test are used. ²Unless otherwise indicated Wald test are used. ³Mann-Whitney's U test. ⁴p-trend.

Figure 1. Association between alcohol consumption and K-ras mutations in different lifetime periods before the diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA).

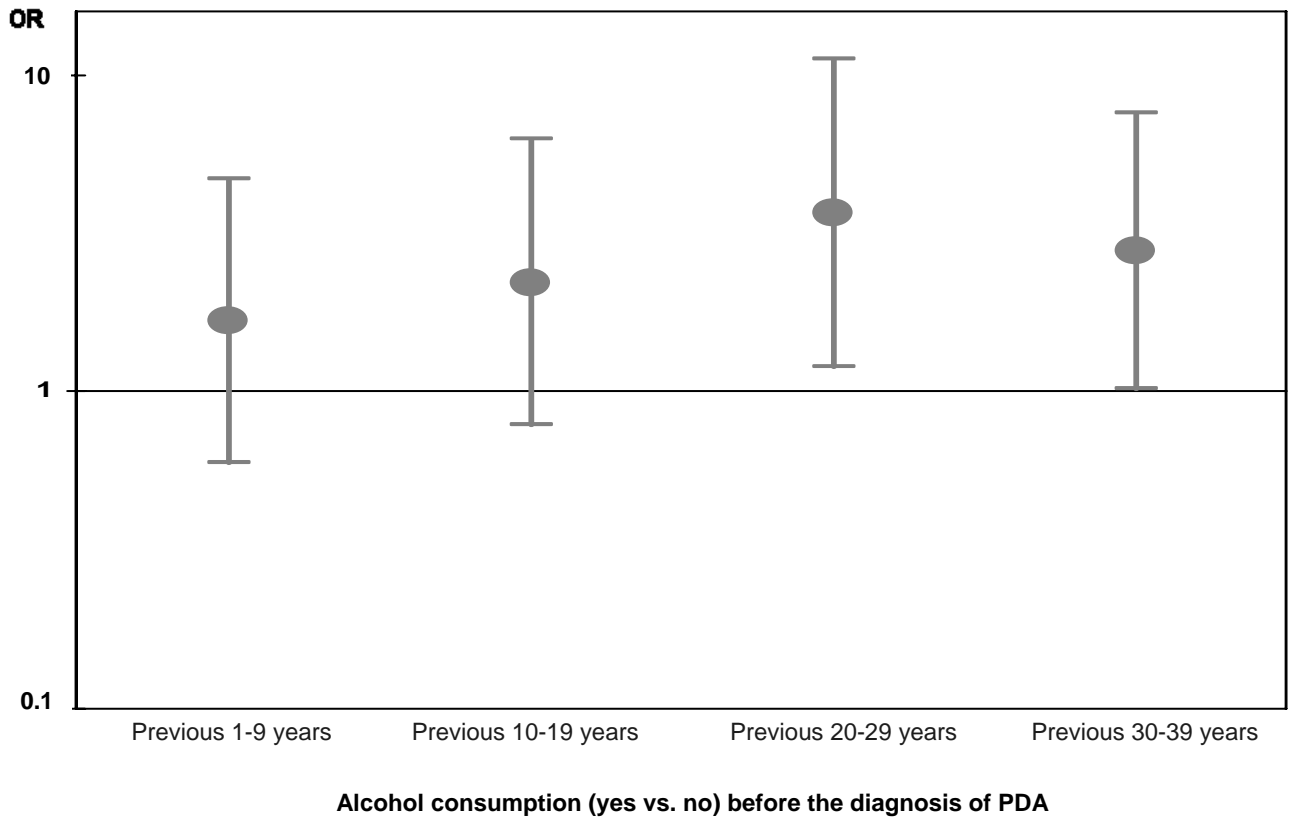
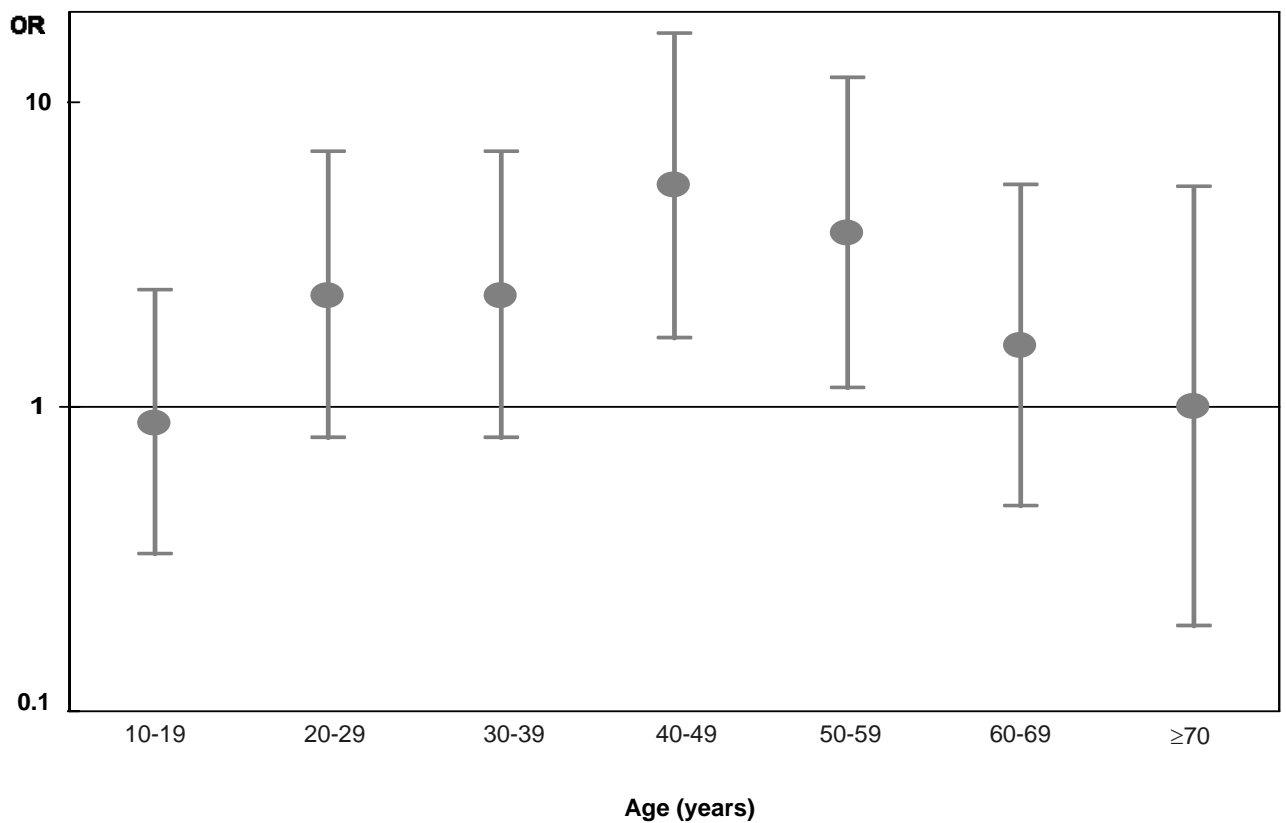


Figure 2. Association between alcohol consumption and K-ras mutations in PDA patients, by patients' age.



5. DISCUSSIÓ GENERAL

Cadascun dels articles que formen el nucli de la tesi inclou un apartat de discussió on s'han descrit amb detall les principals troballes, la consistència o no amb els altres estudis disponibles i els mecanismes biològics que poden explicar els nostres resultats. Per això, en aquest apartat ampliarem breument alguns aspectes poc comentats en les discussions dels articles que formen el nucli de la tesi; presentem un resum de les troballes en relació a la hipòtesi que ens plantejàvem a l'inici i la plausibilitat biològica de les explicacions que hem donat als resultats. Presentem també les principals limitacions i les dificultats que hem trobat al llarg del desenvolupament dels diferents estudis.

La **Taula 2** (apartat 1.2 de la **Introducció general**) recull les principals característiques dels altres estudis que han analitzat la relació entre la prevalença de les mutacions en l'oncogèn *K-ras* i els diferents factors clínics i ambientals que són objecte d'estudi d'aquesta tesi (consum de tabac, consum d'alcohol i antecedents patològics), en pacients amb ADP i que citem a les discussions dels articles corresponents.

5.1. Principals troballes

Tot i que la hipòtesi que proposa el consum de tabac com a agent causal de les mutacions en l'oncogèn *K-ras*, és biològica i epidemiològicament plausible [14,18,19,120,163-167], els nostres resultats mostren que el consum de tabac no és més freqüent en els casos d'ADP amb mutacions en l'oncogèn *K-ras* que en els casos sense mutacions en aquest oncogèn i, per tant, no es confirma la hipòtesi operativa 1; de manera que els nostres resultats suggereixen que els carcinògens del tabac actuen en la carcinogènesi pancreàtica per vies alternatives a l'activació de l'oncogèn *K-ras*.

Si bé és cert que hi ha estudis experimentals que mostren que alguns carcinògens del tabac, com les nitrosamines, són presents en el teixit pancreàtic i alhora tenen efectes citotòxics i mutagènics [45,46,168-170], les mateixes nitrosamines poden tenir també un paper en l'etiologia de l'ADP per vies alternatives en l'oncogèn *K-ras*; concretament, aquestes nitrosamines tenen efectes epigenètics en les cèl·lules pancreàtiques ja que actuen com a agonistes dels receptors β -adrenèrgics en una via de senyalització cel·lular que activa la transcripció i la proliferació cel·lular [45,171]. Per aquesta via, les

nitrosamines serien les responsables del desenvolupament de tumors pancreàtics sense mutacions en l'oncogèn K-*ras*. També cal tenir en compte que, en experiments en animals, altres carcinògens del tabac com els HAP, semblen ser els responsables de mutacions en l'oncogèn K-*ras* en tumors com el de pulmó, de laringe, de la cavitat oral o de pell, per exemple; però el pàncrees, en canvi, no és un dels teixits diana d'aquests carcinògens [45,106,172-174].

El tabac podria tenir un paper causal en l'aparició i persistència de les mutacions en l'oncogèn K-*ras* específic en funció del teixit diana i del tipus histològic de tumor. Tot i que l'adenocarcinoma és el tipus histològic menys relacionat amb el consum de tabac, les mutacions en l'oncogèn K-*ras* són més freqüents en adenocarcinomes que en altres tipus histològics [172,175-181]. En el càncer de pulmó, indiscutiblement relacionat amb el consum de tabac, l'adenocarcinoma és l'únic dels 3 tipus histològics principals que existeixen en aquesta localització que es desenvolupa en els no fumadors i, alhora, l'associació amb el consum de tabac és més dèbil amb l'adenocarcinoma que amb la resta de tipus histològics [46,172,175,180-182]. Les mutacions en l'oncogèn K-*ras* són presents només en l'adenocarcinoma de pulmó (i no en els altres tipus histològics), encara que amb prevalences inferiors i amb un espectre de mutacions diferent del que observem en l'adenocarcinoma pancreàtic [172,181,183].

A més, l'evidència biològica i epidemiològica suggereix que el tabac actua en estadis tardans en el procés de carcinogènesi pancreàtica, ja que deixar de fumar té un efecte positiu en la reducció del risc d'ADP [14,18,19,163-167]; les mutacions en l'oncogèn K-*ras*, en canvi, es produeixen molt aviat en el procés carcinogènic, i són presents ja en lesions pancreàtiques prèvies al desenvolupament del càncer [92,95,98,99,169,184]. Aquest fet ens fa pensar que les alteracions en el gen K-*ras* es produeixen abans que el tabac tingui el seu efecte i que, per tant, en tot cas, els carcinògens del tabac contribueixen en la progressió del càncer (mitjançant l'acumulació d'altres alteracions genètiques i epigenètiques necessàries) i no en la seva etiologia.

Els nostres resultats, juntament amb els coneixements existents, suggereixen que els carcinògens del tabac presents en el teixit pancreàtic actuen en la carcinogènesi pancreàtica per vies alternatives a l'activació de l'oncogèn K-*ras*, ja sigui a través de l'activació per mutacions d'altres oncogens o de mecanismes epigenètics de modificació de l'expressió d'altres gens (per exemple, silenciant gens supressors de tumors), entre d'altres.

La segona hipòtesi que ens plantejàvem tenia relació amb el fet que els agents químics ambientals són biotransformats i metabolitzats dins l'organisme, prèviament a la seva eliminació, mitjançant enzims específics com els de la família CYP, generant intermediaris capaços d'unir-se al DNA formant adductes i que, si no són correctament eliminats, poden ser els responsables de les mutacions activadores en l'oncogèn *K-ras*. Els polimorfismes en el gen *CYP1B1* generen variants de l'enzim amb diferent eficiència en l'activació i la metabolització dels carcinògens, de manera que els pacients d'ADP portadors de diferents variants del gen *CYP1B1*, és a dir, amb diferents genotips, poden tenir diferent risc de mutacions en l'oncogèn *K-ras* [45,46,185,186].

Així doncs, té sentit biològic hipotetitzar que els genotips de *CYP1B1* dels pacients d'ADP poden ser diferents en els casos amb i sense mutacions en l'oncogèn *K-ras*. Els resultats mostren que es confirma la hipòtesi operativa 2 només en el cas de les variants en el locus m1 del gen *CYP1B1*: els genotips per al locus m1 del gen *CYP1B1* són diferents en els casos amb i sense mutacions en l'oncogèn *K-ras*, mentre que no s'observen diferències pel que fa als genotips del locus m2 del gen *CYP1B1*. El genotip homozigot per l'al·lel valina al locus m1 és més freqüent en els casos d'ADP amb mutacions en l'oncogèn *K-ras* que en els casos sense mutacions en aquest oncogèn; aquest genotip podria estar associat a una activitat detoxificadora més baixa i en conseqüència a un procés deficient de biotransformació, metabolització i eliminació de carcinògens ambientals de l'organisme, que poden ser l'origen de mutacions en l'oncogèn *K-ras* [59,187-189]. Alguns d'aquests carcinògens ambientals podrien ser, per exemple, els hidrocarburs aromàtics policíclics i les amines aromàtiques heterocícliques derivades del fum del tabac i d'algunes exposicions laborals, o tots aquells que poden actuar com a disruptors endocrins, com les dioxines, els bifenils policlorats o els hexaclorobifenils. Per tant les diferents variants de l'enzim poden fer més susceptibles als pacients d'ADP exposats a carcinògens ambientals, com els que hem comentat anteriorment, a tenir tumors amb mutacions en l'oncogèn *K-ras*.

Les nostres són les primeres anàlisis de la relació entre els polimorfismes en el gen *CYP1B1* i la prevalença de mutacions en l'oncogèn *K-ras*, de manera que calen nous estudis per aclarir quin és el paper de les variants del gen *CYP1B1* en la carcinogènesi pancreàtica i la seva relació amb les vies d'activació de l'oncogèn *K-ras*.

No hem identificat estudis que ens permetin ser més concrets en el plantejament de la hipòtesi operativa 2, tant pel que fa referència als diferents genotips de *CYP1B1*, com en relació als carcinògens ambientals que són

metabolitzats per aquests enzims i que per tant poden ser l'origen de les mutacions en l'oncogèn K-ras. D'altra banda, amb els coneixements existents sabem que és improbable que *CYP1B1* sigui l'únic gen que actua en biotransformació, metabolització i eliminació de carcinògens ambientals implicats en l'aparició i persistència de mutacions en l'oncogèn K-ras; el més probable és que actuï en col·laboració amb altres gens implicats en aquests processos com els que comentàvem en l'apartat 1.1 de la introducció general, les *GST*, les *NAT*, o altres gens de la família dels *CYP*, entre d'altres.

Com ja hem comentat, les mutacions en l'oncogèn K-ras són presents en més d'un 80% dels casos amb ADP; a més, s'observen en lesions precursorses, tot i que amb prevalences inferiors. La freqüència d'aquestes alteracions genètiques va augmentant a mesura que augmenta el grau de displàsia de les lesions que originaran l'adenocarcinoma (**Figura 2**). De la mateixa manera, mutacions en l'oncogèn K-ras són presents en els teixits de pacients amb pancreatitis o DM-2, totes dues malalties es consideren possibles factors de risc per a l'ADP [49,59,60,190,191].

Aquests coneixements ens fan hipotetitzar que els antecedents patològics de pancreatitis, DM-2, o altres patologies pancreàtiques, que hagin patit els mateixos pacients d'ADP abans del diagnòstic del càncer, poden haver generat en aquest òrgan determinades alteracions fisiològiques, cel·lulars i moleculars que afavoreixin la prevalença de mutacions en l'oncogèn K-ras.

Els nostres resultats mostren com els antecedents de pancreatitis i d'úlceres pèptiques són més freqüents en els casos d'ADP sense mutacions en l'oncogèn K-ras que en els casos d'ADP amb mutacions en aquest oncogèn, mentre que no s'observen diferències en la prevalença de mutacions pel que fa als antecedents de DM-2 i, per tant, no es confirma la hipòtesi operativa 3 per cap dels antecedents patològics inclosos en l'estudi. Així doncs, els nostres resultats donen suport a la hipòtesi alternativa que hi ha diferents grups d'alteracions genètiques implicades en el procés carcinogènic en funció dels antecedents patològics dels pacients d'ADP; i que els antecedents de pancreatitis, de DM-2, i d'úlceres pèptiques poden estar associats amb vies d'activació de la carcinogènesi pancreàtica independents de les mutacions activadores en l'oncogèn K-ras.

No hem observat relació entre els antecedents patològics de pancreatitis i la prevalença de mutacions en l'oncogèn K-ras en pacients amb ADP; en tot cas, els antecedents de pancreatitis són més freqüents en els casos d'ADP sense

mutacions en el gen *K-ras* que en els casos amb aquestes mutacions. Hi ha estudis experimentals que mostren que l'activació de l'oncogèn *K-ras* en pacients amb pancreatitis sembla essencial per a la inducció de l'ADP [192]; però alhora, altres autors suggereixen que, a més d'aquestes mutacions, cal l'acumulació d'altres esdeveniments genètics i epigenètics relacionats, tant amb el dany al teixit, com amb la resposta inflamatòria. Hi ha evidència biològica que relaciona la inflamació i el càncer, incloent el càncer de pàncrees, tot i que no es coneixen els mecanismes exactes d'aquesta associació [73-75]. D'aquesta manera, la inflamació crònica del pàncrees que té lloc en els pacients amb pancreatitis, podria causar un dany gradual al teixit pancreàtic, creant un microambient que afavoreixi el procés de transformació de les cèl·lules accinars del pàncrees. Aquest procés tindria lloc a través de l'activació de vies moleculars alternatives a les mutacions activadores en l'oncogèn *K-ras*, relacionades per exemple amb mediadors de la resposta inflamatòria (com el *TNF*, *NFκB2* o la ciclo-oxigenasa-2 *PTGS2*) que poden facilitar el dany al material genètic, el creixement de les cèl·lules tumorals i la metàstasi [73,193-197].

Tampoc hem trobat relació entre els antecedents patològics de DM-2 i la prevalença de mutacions en l'oncogèn *K-ras* al teixit pancreàtic de pacients amb ADP; han d'existir vies alternatives a l'activació d'aquest oncogèn. Aquests mecanismes biològics alternatius podrien estar relacionats amb l'homologia que presenten la insulina i els seus precursors amb determinats factors de creixement, de manera que poden tenir afinitat per unir-se als receptors de factors de creixement tumorals específics (com el TGF o el TNF, per exemple) i induir la proliferació cel·lular [198,199]. Existeix, doncs, una base biològica que relaciona la diabetis, la hiperinsulinèmia i la carcinogènesi pancreàtica, independentment de l'activació de l'oncogèn *K-ras*. Alhora, els mecanismes relacionats amb la resposta inflamatòria que comentàvem anteriorment podrien estar jugant també un paper important en el desenvolupament de la carcinogènesi pancreàtica en pacients amb antecedents de DM-2 [200].

Els antecedents d'úlcer a pèptica, especialment la tractada amb cirurgia, no es relacionen amb la prevalença de mutacions en l'oncogèn *K-ras* en pacients amb ADP; en tot cas, són més freqüents en els casos d'ADP sense mutacions en l'oncogèn *K-ras* que en els casos amb aquestes mutacions. La literatura és escassa pel que fa a la relació entre els antecedents d'úlcer a pèptica i el risc d'ADP, però ambdues patologies comparteixen les infeccions per *Helicobacter pylori* com a possible agent etiològic [201-203]. Aquestes infeccions poden cronificar-se i provocar d'aquesta manera la inflamació contínua del pàncrees,

que pot ser el mecanisme que afavoreixi la progressió tumoral de les cèl·lules pancreàtiques, independentment de l'activació de l'oncogèn K-ras.

Finalment, plantejàvem quin és el paper del consum d'alcohol en l'aparició i persistència de les mutacions en l'oncogèn K-ras. Tot i ser un factor de risc controvertit per a l'ADP, està clar que juga un paper important en la inducció de la pancreatitis crònica, un dels factors de risc establerts per aquesta neoplàsia.

D'altra banda, l'etanol és un carcinogen reconegut, de manera que la hipòtesi inicial rau en el fet que l'etanol, o els seus metabòlits, poden ser un dels agents causals de les mutacions activadores en l'oncogèn K-ras en els pacients amb ADP.

Els nostres resultats confirmen la hipòtesi operativa 4: tant la quantitat i la durada, com la intensitat del consum d'alcohol, és lleugerament superior en aquells pacients d'ADP que presenten mutacions en l'oncogèn K-ras que en els pacients sense mutacions en aquest oncogèn. Aquesta associació s'observa especialment en els consumidors de vi, que a més, són els pacients d'ADP amb els consums d'alcohol al llarg de la vida més elevats.

A més, consums moderats i intensos d'alcohol en períodes llunyans al diagnòstic de la malaltia, així com el consum d'alcohol entre els 40 i els 60 anys d'edat del pacient, s'associen positivament amb la prevalença d'aquestes mutacions. El fet que les mutacions en l'oncogèn K-ras es donin en un estadi molt inicial del procés de carcinogènesi pancreàtica concorda amb aquests patrons temporals d'augment de risc d'ADP amb mutacions relacionat amb el consum d'alcohol en un període concret, més aviat distant del moment del diagnòstic de la malaltia; és el contrari del que observàvem amb el consum de tabac, els efectes del qual tenen lloc en estadis més tardans del desenvolupament de l'ADP i per això es pot relacionar amb diferents patrons d'alteracions genètiques.

Hi ha suficient evidència biològica dels efectes carcinogènics de l'etanol en experiments en animals, i a més, està considerat com a carcinogen per als humans (classificat per l'Agència Internacional per a la Recerca en Càncer – IARC dins el Grup 1 dels agents carcinogènics) [54-56,168]. A més, l'etanol deshidrogenasa metabolitza l'etanol a acetaldehid, un metabòlit que està reconegut com a carcinogen i mutagen (classificat per la IARC dins el Grup 2B dels agents carcinogènics) [54-57,204] i del que cada cop més es coneixen els efectes nocius per la cèl·lula. L'acetaldehid interfereix en la síntesi i la reparació

del DNA, causa anomalies citogenètiques a les cèl·lules eucariotes i mutacions puntuals a determinats gens, i indueix aberracions cromosòmiques; però, a més, és capaç d'unir-se directament al DNA i formar adductes estables (observats al DNA de consumidors habituals d'alcohol) que poden conduir a errors en la replicació i, per tant, a mutacions, tant en oncogens com en gens supressors de tumors [57,58,205-211]. S'han detectat concentracions d'acetaldehid a la saliva i al llarg de tot l'intestí i, fins i tot, es coneix que causa danys al teixit pancreàtic, de manera que hi ha suficients raons per considerar-lo un carcinogen potencial per tot el tracte digestiu [57,204,209,212,213].

Tot aquest coneixement dóna suficient plausibilitat biològica als resultats observats i, per tant, dóna suport a la hipòtesi operativa que ens plantejàvem i és que el consum d'alcohol pot ser un dels factors etiològics de l'ADP a través de mutacions activadores a l'oncogèn *K-ras*; és a dir, que tant l'etanol, com d'altres carcinògens derivats del consum d'alcohol, poden ser els responsables de les mutacions activadores en l'oncogèn *K-ras*, i intervenir així en els processos de carcinogènesi pancreàtica.

Per aclarir i entendre els mecanismes biològics que expliquin els resultats que hem observat es requereixen, sens dubte, nous estudis moleculars, genètics, experimentals, clínics i epidemiològics. Alhora, és fonamental que altres estudis repliquin o refutin les nostres troballes.

Hem de seguir treballant, doncs, per poder aportar coneixement sobre quins són els factors, o les exposicions, que poden influir en l'aparició i la persistència de les mutacions en l'oncogèn *K-ras*. El que és evident, després de tot, és que no es tracta d'un procés senzill, d'un procés lineal amb una causa i una conseqüència, sinó que estem davant d'un procés d'acumulació, tant d'exposicions com d'alteracions (genètiques o epigenètiques, heretades o adquirides, etc.) on intervenen múltiples factors i alhora amb un ampli ventall de conseqüències [24]. Si busquem una explicació senzilla al problema no la trobarem, per això cal ampliar l'horitzó i ser capaços d'integrar el coneixement provinent de diferents disciplines; només amb aquest enfocament multidisciplinari podrem fer front al desconeixement que hi ha en relació a l'etiologia d'aquesta malaltia.

5.2. Fortaleses i limitacions de l'estudi

Els resultats que presentem en aquesta tesi deriven del que, fins avui i després de més de vint anys de recerca, és l'estudi amb un nombre més gran de pacients inclosos sobre la relació entre factors clínics i ambientals i la prevalença de les mutacions en l'oncogèn K-ras en pacients amb ADP. A més, és un dels dos únics estudis a nivell mundial que recull la informació mitjançant entrevistes personals als pacients; la taxa de resposta per part del propi pacient va ser molt alta (més del 80%) i les entrevistes es van produir en un moment molt proper al diagnòstic de la malaltia. La informació sociodemogràfica i epidemiològica es va obtenir mitjançant aquestes entrevistes als propis pacients i, a més, per comprovar la fiabilitat de les respostes, es va entrevistar a un grup de familiars propers dels pacients; l'acord entre les respostes dels pacients i dels familiars va ser alt [141]. La informació clínica es recollia a partir d'un imprès de dades clíniques que omplien els metges de referència de l'estudi i es completava, a més, a través de la de les històries clíniques dels pacients; la informació era revisada per oncòlegs amb experiència, la qual cosa dóna suport a la validesa de les dades. Es disposa, a més, d'un banc de mostres biològiques molt ampli que multiplica les possibilitats d'anàlisi de l'estudi. En altres treballs derivats de l'estudi s'han comentat amb detall les fortaleses i les limitacions del mateix; cal dir però, que el conjunt de característiques de l'estudi (els criteris d'inclusió dels pacients, la recol·lecció de mostres biològiques, el percentatge d'entrevistes contestades pels propis pacients, entre d'altres) donen suport a la seva validesa [114,120-123,137-141,214].

Tot i això, som conscients que algunes de les nostres estimacions són estadísticament imprecises, principalment a causa de què la mida de la mostra és molt limitada, però aquest fet deriva de les característiques clíniques i biològiques de la pròpia malaltia; l'ADP és una malaltia molt agressiva, tot i que la incidència del càncer de pàncrees és baixa, alhora presenta una elevada mortalitat, i aquest fet dificulta d'una manera important la inclusió de casos en els estudis relacionats amb aquesta patologia.

Hem considerat també la possibilitat de biaixos de selecció; per això hem comparat, en tot moment, les característiques entre els pacients inclosos i exclosos en cadascuna de les anàlisis; i hem comprovat que no existeixen diferències significatives entre ambdós grups (veure **Annex 3**). L'única excepció rellevant és que els pacients amb mutacions en l'oncogèn K-ras determinades són una mica més joves; això es deu al fet que els pacients més joves eren sotmesos amb més freqüència a proves invasives i és en aquests casos on es

va poder obtenir mostra histològica i/o citològica del tumor amb més facilitat. Les mostres biològiques que l'estudi requeria es recollien en funció de les proves diagnòstiques a les que el pacient era sotmès; per la determinació de mutacions en l'oncogèn *K-ras* es requeria una mostra histològica o citològica que es recollia d'aquells casos als quals es realitzava una laparoscòpia o una laparotomia o bé d'aquells casos als quals se'ls realitzava una punció-aspiració amb agulla fina, respectivament. Els casos sotmesos a proves invasives per establir el diagnòstic o l'estat de la malaltia eren més joves, és per això que observem aquestes diferències entre els casos amb les mutacions en l'oncogèn *K-ras* determinades i els casos amb aquestes mutacions no determinades. De tota manera, la proporció de casos amb mostra cito-histològica és molt elevada comparada amb altres estudis, es va recuperar mostra del tumor de més del 60% dels casos d'ADP, una proporció prou elevada tenint en compte les característiques clíniques i biològiques d'aquesta malaltia.

Cadascuna de les associacions que hem analitzat està recolzada per suficient coneixement: tots els factors que hem estudiat (clínic, ambientals o genètics) són candidats a influir el risc d'ADP i alhora estan potencialment implicats en l'activació per mutacions de l'oncogèn *K-ras*, tot i que no estan clars els mecanismes pel qual tenen lloc aquestes influències.

L'avenç en la recerca de l'etiologia d'aquest tumor, així com la confirmació (o refutació) de les nostres troballes, passa forçosament per la realització d'estudis més grans: cal augmentar el nombre de casos inclosos per incrementar el poder estadístic de les estimacions. De la mateixa manera seria molt útil poder incorporar un grup control que permeti establir la direcció de les associacions.

Les anàlisis realitzades es basen en el disseny cas-cas, que és una eina vàlida i molt eficient per explorar i avaluar interaccions gen-ambient [151,153-155], però moltes vegades es requereixen estudis cas-cas-control per confirmar les troballes dels estudis cas-cas, i el grup control és necessari per establir la direcció de les associacions i contextualitzar les hipòtesis de partida [215,216]. Una de les principals avantatges del disseny cas-cas, que requereix només individus malalts, és que permet l'estimació de múltiples interaccions entre factors que se sap que són independents entre ells en la població d'estudi. Una interacció gen-ambient es pot estimar d'una manera vàlida i més precisa en els estudis cas-cas que en els estudis de cohorts o en els estudis cas-control; amb el mateix nombre de casos, els estudis cas-cas poden ser més eficients i potents que la resta de dissenys [154]. El disseny cas-cas, a més, és una aproximació útil per estudiar alteracions genètiques molt prevalents, com és el cas de les mutacions activadores en l'oncogèn *K-ras* i, alhora, en malalties poc

freqüents, com és el cas del càncer de pàncrees. Les avantatges del disseny cas-cas són majors quan es disposa de més informació empírica sobre l'associació gen-ambient objecte d'estudi, i quan la selecció d'un grup control adequat és molt difícil o impossible. Una de les limitacions del disseny cas-cas és que, quan no es compleixen els requisits d'independència entre l'exposició ambiental i l'alteració genètica, la probabilitat de cometre errors tipus I, és a dir, de detectar falsos positius, és més alta. Per això, aquest disseny és molt útil per fer estudis preliminars, per explorar quines interaccions gen-ambient poden ser importants i, per tant, són susceptibles de ser confirmades per posteriors estudis cas-control o de cohorts. No obstant, el disseny cas-cas sol tenir poc poder per detectar interaccions gen-ambient quan l'associació entre el factor ambiental i l'alteració genètica va en sentit contrari [155]. Així doncs, el disseny cas-cas és molt útil per detectar interaccions gen-ambient quan hi ha suficient coneixement empíric que demostra la independència entre l'exposició ambiental i el marcador genètic d'interès, però les estimacions, les proves i els intervals de confiança s'han d'interpretar amb cura si no es disposa d'aquest coneixement [215].

Tot i les limitacions i les mancances de l'estudi que hem comentat anteriorment, es tracta, com dèiem, de l'estudi més complet sobre la relació entre factors clínics i ambientals i la prevalença de les mutacions en l'oncogèn K-ras en pacients amb càncer de pàncrees. Calen nous estudis, amb més pacients i que, com aquest, integrin el coneixement provinent de diferents disciplines per poder aportar coneixement sobre l'etiologia d'aquesta malaltia.

6. CONCLUSIONS

En aquesta tesi hem analitzat la relació, tant positiva com negativa, entre determinats factors clínics, ambientals i genètics, i la prevalença de mutacions al diagnòstic en el codó 12 de l'oncogèn *K-ras* en pacients amb ADP. Els resultats suggereixen l'existència d'algunes relacions sobre les quals la literatura prèvia era molt limitada; alhora, els nostres resultats confirmen la falta d'associació en altres casos en els quals els estudis anteriors presentaven resultats inconsistents.

Les conclusions s'exposen en resposta a cadascun dels objectius específics que ens plantejàvem a l'inici de la tesi.

- Relació entre el consum de tabac al llarg de la vida i la prevalença de mutacions en l'oncogèn K-ras en pacients amb ADP.

El consum de tabac no es relaciona amb la prevalença de mutacions en l'oncogèn *K-ras* en els pacients amb ADP: els fumadors no tenen més risc de presentar un tumor amb mutacions que els no fumadors; ni la quantitat de tabac fumat, ni el temps de consum de tabac són superiors en els casos d'ADP amb mutacions en l'oncogèn *K-ras*. Tot i que tant el tabac com les mutacions en l'oncogèn *K-ras* tenen rols importants en l'etiopatogènia de l'ADP, els nostres resultats indiquen que els dos processos actuen independentment.

- Distribució i freqüència dels polimorfismes en els loci m1 i m2 del gen CYP1B1 en pacients amb ADP.

La prevalença de l'al·lel valina en els pacients amb ADP és 0,45, similar a la descrita prèviament en altres poblacions caucàsiques, mentre que la de l'al·lel asparagina és 0,68, una mica inferior a l'observada en altres estudis.

- Relació entre els polimorfismes en els loci m1 i m2 del gen CYP1B1 i la prevalença de les mutacions en l'oncogèn K-ras en pacients amb ADP.

Només els polimorfismes en el locus m1 del gen *CYP1B1* estan relacionats amb l'activació de l'oncogèn *K-ras* en l'ADP: en els pacients amb el genotip homozigot per l'al·lel valina s'observa una probabilitat més alta de tenir un ADP

amb mutacions en l'oncogèn K-ras que en els pacients amb altres genotips. Els nostres resultats suggereixen que aquest genotip de *CYP1B1* estaria relacionat amb una activitat detoxificadora més pobre de l'enzim i, en conseqüència, amb un procés deficient de biotransformació, metabolització i eliminació de carcinògens de l'organisme, els quals podrien influir en l'origen o en la persistència de mutacions en l'oncogèn K-ras en els pacients amb ADP.

- Relació entre els antecedents patològics i la prevalença al diagnòstic de les mutacions en l'oncogèn K-ras en pacients amb ADP.

Els antecedents patològics de pancreatitis i d'úlcera pèptica es relacionen, de manera inversa, amb la prevalença de mutacions en l'oncogèn K-ras en els pacients amb ADP: els antecedents de pancreatitis, així com d'úlcera pèptica tractada amb cirurgia, són més freqüents en els casos d'ADP sense mutacions en l'oncogèn K-ras que en els casos amb aquestes mutacions. D'altra banda, els antecedents patològics de DM-2 no es relacionen amb la prevalença de mutacions en l'oncogèn K-ras en els pacients amb ADP: la freqüència dels antecedents de DM-2 és similar en els pacients d'ADP amb i sense les mutacions en el gen K-ras. Els nostres resultats mostren que, tot i que els antecedents de pancreatitis i DM-2 es consideren factors de risc consistents per a l'ADP, aquests antecedents patològics podrien intervenir en la carcinogènesi pancreàtica a través de vies alternatives a l'activació de l'oncogèn K-ras.

- Relació entre el consum d'alcohol al llarg de la vida i la prevalença de mutacions en l'oncogèn K-ras en pacients amb ADP.

El consum d'alcohol es relaciona amb la prevalença de mutacions en l'oncogèn K-ras en els pacients amb ADP: els bevedors moderats i intensos tenen més probabilitat de presentar un tumor amb mutacions que els no bevedors i els bevedors ocasionals; aquesta associació augmenta amb la quantitat i la durada del consum de begudes alcohòliques. Tot i que el consum d'alcohol és un factor de risc inconsistent per a l'ADP, els nostres resultats suggereixen que el potencial efecte carcinogènic i mutagènic de l'etanol i l'acetaldehid podria jugar un paper important en l'adquisició de mutacions en l'oncogèn K-ras en l'epiteli pancreàtic.

7. BIBLIOGRAFIA

1. International Agency for Research on Cancer. Disponible a : <http://www-dep.iarc.fr> [últim accés 26 de novembre de 2008].
2. Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program. US National Institutes of Health. National Cancer Institute. Disponible a : <http://seer.cancer.gov> [últim accés 26 de novembre de 2008].
3. Borràs JM, Borràs J, Gispert R, Izquierdo A. El impacto del cáncer en Cataluña. Introducción. Med Clin 2008; 131: 2-3.
4. Marcos-Gragera R, Cardó X, Galceran J, Ribes J, Izquierdo A, Borràs J. Incidencia del cáncer en Cataluña, 1998-2002. Med Clin 2008; 131: 4-10.
5. Borràs J, Ameijide A, Vilardell L, Valls J, Marcos-Gragera R, Izquierdo A. Evolución de la incidencia del cáncer en Cataluña, 1985-2002. Med Clin 2008; 131: 11-18.
6. Galceran J, Puigdefàbregas A, Ribas G, Izquierdo A, Pareja L, Marcos-Gragera R. Evolución de la supervivencia del cáncer en Cataluña y comparación con Europa. Med Clin 2008; 131: 19-24.
7. Gispert R, Clèries R, Puigdefàbregas A, Freitas A, Esteban L, Ribes J. Tendencia de mortalidad por cáncer en Cataluña, 1985-2004. Med Clin 2008; 131: 25-31.
8. Ribes J, Clèries R, Buxó M, Ameijide A, Valls J, Gispert R. Proyección de la incidencia y la mortalidad del cáncer en Cataluña hasta el año 2015 mediante un modelo bayesiano. Med Clin 2008; 131: 32-41.
9. Hruban RH, Syed ZA. Pathology of the exocrine pancreas. In: von Hoff DD, Evans DB, Hruban RH, editors. Pancreatic cancer. Boston: Jones & Bartlett; 2005: 15-30.
10. Porta M. Genética y salud pública. En: Sierra A, Sáenz MC, Gómez LI, editores. Medicina preventiva y salud pública. Barcelona: Elsevier Masson; 2008: 939-948.
11. Porta M, Malats N, Alguacil J, Ruiz L, Jarrod M, Carrato A, Guarnier L. Coffee, pancreatic cancer, and K-ras mutations: updating the research agenda. J Epidemiol Community Health 2000; 54: 656-659.
12. Porta M. La secuencia del genoma es una partitura de jazz. Claves de razón práctica 2005; 158: 71-74.
13. Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. Lancet 2004; 363: 1049-1057.
14. Weiderpass E, Partanen T, Kaaks R, Vainio H, Porta M, Kauppinen T, Ojajärvi A, Boffetta P, Malats N. Pancreatic cancer: Occurrence, trends, and environmental etiology. A review. Scand J Work Environ Health 1999; 24: 165-174.
15. Lowenfels AB, Maisonneuve P. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2006; 20: 197-209.
16. Anderson KE, Mack TM, Silverman DT. Cancer of the pancreas. In: Schottenfeld D & Fraumeni JF Jr, editors. Cancer epidemiology and prevention. New York: Oxford University Press 2006: 674-696; 721-762.

17. Maitra A, Hruban RH. Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 157-188.
18. Li D, Jiao L. Epidemiology. In: von Hoff DD, Evans DB, Hruban RH, editors. *Pancreatic cancer*. Boston: Jones & Bartlett 2005: 103-117.
19. Ekbom A, Trichopoulos D. Pancreatic cancer. In: Adami HO, Hunter D, Trichopoulos D, editors. *Textbook of cancer epidemiology*. 2nd edition. New York: Oxford University Press 2008: 333-348.
20. Klein AP, Hruban RH, Brune KA, Petersen GM, Goggins M. Familial pancreatic cancer. *Cancer J* 2001; 7: 266-273.
21. Lynch HT, Smyrk T, Kern SE, Hruban RH, Lightdale CJ, Lemon SJ, Lynch JF, Fusaro LR, Fusaro RM, Ghadirian P. Familial pancreatic cancer: a review. *Semin Oncol* 1996; 23: 251-275.
22. Lumadue JA, Griffin CA, Osman M, Hruban RH. Familial pancreatic cancer and the genetics of pancreatic cancer. *Surg Clin North Am* 1995; 75: 845-855.
23. Tersmette AC, Petersen GM, Offerhaus GJ, Falatko FC, Brune KA, Goggins M, Rozenblum E, Wilentz RE, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH. Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 738-744.
24. Porta M, Crous M. La acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas: un proceso causal clave entre el medio ambiente y las enfermedades de etiología compleja. *Gac Sanit* 2005; 19: 273-276.
25. Li D. Molecular epidemiology of pancreatic cancer. *Cancer J* 2001; 7: 259-265.
26. Malats N. Gene-environment interactions in pancreatic cancer. *Pancreatology* 2001; 1: 472-476.
27. McWilliams RR, Bamlet WR, Cunningham JM, Goode EL, de Andrade M, Boardman LA, Petersen GM. Polymorphisms in DNA repair genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk. *Cancer Res* 2008; 68: 4928-4935.
28. 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* 2008; 17: 1470-1479.
29. Porta M. *Dictionary of epidemiology*. 5th edition. New York: Oxford University Press; 2008: 320 pages.
30. Fernandez E, La vecchia C, Decarli A. Attributable risks for pancreatic cancer in Northern Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5: 23-27.
31. Hassan MM, Bondy ML, Wolff RA, Abbruzzese JL, Vauthey JN, Pisters PW, Evans DB, Khan R, Chou TH, Lenzi R, Jiao L, Li D. Risk factors for pancreatic cancer: case-control study. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2696-2707.

32. Lo AC, Soliman AS, El-Ghawalby N, Abdel-Wahab M, Fathy O, Khaled HM, Omar S, Hamilton SR, Greenson JK, Abbruzzese JL. Lifestyle, occupational, and reproductive factors in relation to pancreatic cancer risk. *Pancreas* 2007; 35: 120-129.
33. Fryzek JP, Garabrant DH, Harlow SD, Severson RK, Gillespie BW, Schenk M, Schottenfeld D. A case-control study of self-reported exposures to pesticides and pancreas cancer in southeastern Michigan. *Int J Cancer* 1997; 72: 62-67.
34. Stolzenberg-Solomon RZ, Pietinen P, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. Prospective study of diet and pancreatic cancer in male smokers. *Am J Epidemiol* 2002; 155: 783-792.
35. Stolzenberg-Solomon RZ, Pietinen P, Barrett MJ, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D. Dietary and other methyl-group availability factors and pancreatic cancer risk in a cohort of male smokers. *Am J Epidemiol* 2001; 153: 680-687.
36. Villeneuve PJ, Johnson KC, Hanley AJ, Mao Y. Alcohol, tobacco and coffee consumption and the risk of pancreatic cancer: results from the Canadian Enhanced Surveillance System case-control project. Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. *Eur J Cancer Prev* 2000; 9: 49-58.
37. Michaud DS, Skinner HG, Wu K, Hu F, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Fuchs CS. Dietary patterns and pancreatic cancer risk in men and women. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 518-524.
38. Michaud DS. Epidemiology of pancreatic cancer. *Minerva Chir* 2004; 59: 99-111.
39. Michaud DS, Liu S, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Fuchs CS. Dietary sugar, glycemic load, and pancreatic cancer risk in a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 1293-1300.
40. Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Fuchs CS. Dietary meat, dairy products, fat, and cholesterol and pancreatic cancer risk in a prospective study. *Am J Epidemiol* 2003; 157: 1115-1125.
41. Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Fuchs CS. Coffee and alcohol consumption and the risk of pancreatic cancer in two prospective United States cohorts. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 429-437.
42. Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Fuchs CS. Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer. *JAMA* 2001; 286: 921-929.
43. International Agency for Research on Cancer: Tobacco smoking. IARC monographs of the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans, Vol 38: Lyon (France), 1986.
44. Hecht SS. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chem Res Toxicol* 1998; 11: 559-603.
45. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 733-744.

46. Schuller HM. Mechanisms of smoking-related lung and pancreatic adenocarcinoma development. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 455-463.
47. Dufour MC, Adamson MD. The epidemiology of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas* 2003; 27: 286-290.
48. Sand J, Lankisch PG, Nordback I. Alcohol consumption in patients with acute or chronic pancreatitis. *Pancreatology* 2007; 7: 147-156.
49. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andrén-Sandberg A, Domellöf L. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med* 1993; 328: 1433-1437.
50. Malka D, Hammel P, Maire F, Rufat P, Madeira I, Pessione F, Lévy P, Ruzniewski P. Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut* 2002; 51: 849-852.
51. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol* 2006; 7: 149-156.
52. Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G. A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer* 2001; 85: 1700-1705.
53. Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G. Alcohol consumption and the risk of cancer: a meta-analysis. *Alcohol Res Health* 2001; 25: 263-270.
54. Alcohol drinking. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 44. 1988. International Agency for Research on Cancer, Lyon. Disponible a : <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/PDFs/index.php> [últim accés 26 de novembre de 2008].
55. Consumption of alcoholic beverages. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 96. In press. International Agency for Research on Cancer, Lyon. Disponible a : <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/PDFs/index.php> [últim accés 26 de novembre de 2008].
56. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol* 2006; 7: 149-156.
57. Simanowski UA, Homann N, Knühl M, Arce L, Waldherr R, Conradt C, Bosch FX, Seitz HK. Increased rectal cell proliferation following alcohol abuse. *Gut* 2001; 49: 418-422.
58. Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 599-612.
59. Everhart J, Wright D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA* 1995; 273: 1605-1609.
60. Silverman DT, Schiffman M, Everhart J, Goldstein A, Lillemoe KD, Swanson GM, Schwartz AG, Brown LM, Greenberg RS, Schoenberg JB, Pottern LM, Hoover RN, Fraumeni JF Jr. Diabetes mellitus, other medical conditions and familial history of cancer as risk factors for pancreatic cancer. *Br J Cancer* 1999; 80: 1830-1837.

61. Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de Gonzalez A, Barzi F, Woodward M. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer* 2005; 92: 2076-2083.
62. Wang F, Herrington M, Larsson J, Permert J. The relationship between diabetes and pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2003; 2: 4-8.
63. Fisher WE. Diabetes: risk factor for the development of pancreatic cancer or manifestation of the disease? *World J Surg* 2001; 25: 503-508.
64. Lowenfels AB, Maisonneuve P, DiMagno EP, Elitsur Y, Gates LK Jr, Perrault J, Whitcomb DC. Hereditary pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Hereditary Pancreatitis Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 442-446.
65. Howes N, Lerch MM, Greenhalf W, Stocken DD, Ellis I, Simon P, Truninger K, Ammann R, Cavallini G, Charnley RM, Uomo G, Delhaye M, Spicak J, Drumm B, Jansen J, Mountford R, Whitcomb DC, Neoptolemos JP; European Registry of Hereditary Pancreatitis and Pancreatic Cancer (EUROPAC). Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 252-261.
66. Ekbom A, McLaughlin JK, Nyrén O. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 1993; 329: 1502-1503.
67. Whitcomb DC, Pogue-Geile K. Pancreatitis as a risk for pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31: 663-678.
68. Whitcomb DC, Applebaum S, Martin SP. Hereditary pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 880: 201-209.
69. Talamini G, Falconi M, Bassi C, Sartori N, Salvia R, Caldiron E, Frulloni L, Di Francesco V, Vaona B, Bovo P, Vantini I, Pederzoli P, Cavallini G. Incidence of cancer in the course of chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 1253-1260.
70. Maisonneuve P, Lowenfels AB. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig Dis* 2002; 20: 32-37.
71. Whitcomb DC. Inflammation and cancer V. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: 315-319.
72. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Lankisch PG. Chronic pancreatitis and other risk factors for pancreatic cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28: 673-685.
73. Farrow B, Sugiyama Y, Chen A, Uffort E, Nealon W, Mark Evers B. Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development. *Ann Surg* 2004; 239: 763-771.
74. Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 221-233.
75. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867.
76. Lochan R, Daly AK, Reeves HL, Charnley RM. Genetic susceptibility in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br J Surg* 2008; 95: 22-32.

77. Duell EJ, Holly EA, Bracci PM, Wiencke JK, Kelsey KT. A population-based study of the Arg399Gln polymorphism in X-ray repair cross-complementing group 1 (XRCC1) and risk of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 4630-4636.
78. Duell EJ, Holly EA, Bracci PM, Liu M, Wiencke JK, Kelsey KT. A population-based, case-control study of polymorphisms in carcinogen-metabolizing genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 297-306.
79. Jiao L, Hassan MM, Bondy ML, Wolff RA, Evans DB, Abbruzzese JL, Li D. XRCC2 and XRCC3 gene polymorphism and risk of pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 360-367.
80. Jiao L, Hassan MM, Bondy ML, Abbruzzese JL, Evans DB, Li D. The XPD Asp312Asn and Lys751Gln polymorphisms, corresponding haplotype, and pancreatic cancer risk. *Cancer Lett* 2007; 245: 61-68.
81. Jiao L, Bondy ML, Hassan MM, Chang DZ, Abbruzzese JL, Evans DB, Smolensky MH, Li D. Glutathione S-transferase gene polymorphisms and risk and survival of pancreatic cancer. *Cancer* 2007; 109: 840-848.
82. Li D, Jiao L, Li Y, Doll MA, Hein DW, Bondy ML, Evans DB, Wolff RA, Lenzi R, Pisters PW, Abbruzzese JL, Hassan MM. Polymorphisms of cytochrome P4501A2 and N-acetyltransferase genes, smoking, and risk of pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 2006; 27: 103-111.
83. Jiao L, Bondy ML, Hassan MM, Wolff RA, Evans DB, Abbruzzese JL, Li D. Selected polymorphisms of DNA repair genes and risk of pancreatic cancer. *Cancer Detect Prev* 2006; 30: 284-291.
84. Piepoli A, Gentile A, Valvano MR, Barana D, Oliani C, Cotugno R, Quitadamo M, Andriulli A, Perri F. Lack of association between UGT1A7, UGT1A9, ARP, SPINK1 and CFTR gene polymorphisms and pancreatic cancer in Italian patients. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6343-6348.
85. Basso D, Navaglia F, Fogar P, Zambon CF, Greco E, Schiavon S, Fasolo M, Stranges A, Falda A, Padoan A, Fadi E, Pedrazzoli S, Plebani M. DNA repair pathways and mitochondrial DNA mutations in gastrointestinal carcinogenesis. *Clin Chim Acta* 2007; 381: 50-55.
86. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Cáncer. En: Biología molecular de la célula. 3a edición.* Barcelona: Ediciones Omega, S.A; 1996: 1345-1387.
87. Casarett LJ, Klaassen CD, Amdur MO, Doull J. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 6th edition.* New York: McGraw-Hill Health Professions Division; 2001: 1280 pages.
88. World Cancer Reserarch Foundation, American Institute for Cancer Research. *Food, nutrition, physical activity and the prevention of cancer: a global perspective.* Washington, DC: American Institute for Cancer Research; 1997. Disponible a: <http://www.dietandcancerreport.org> [últim accés 8 de desembre de 2008].
89. Wark P. *Diet, lifestyle, heritable factors and colorectal carcinogenesis: associations with histopathological and molecular endpoints.* Thesis Wageningen University; 2007.

90. Cowgill SM, Muscarella P. The genetics of pancreatic cancer. *Am J Surg* 2003; 186: 279-286.
91. Barberá VM, Malats N, Porta M, Real FX, Carrato A. Alteraciones moleculares en el adenocarcinoma de páncreas exocrino. *Rev Cancer* 1999; 13: 192-203.
92. Real FX. A "Catastrophic hypothesis" for pancreas cancer progression. *Gastroenterology* 2003; 124: 1958-1964.
93. Real FX, Cibrián-Uhalte E, Martinelli P. Pancreatic cancer development and progression: remodeling the model. *Gastroenterology* 2008 ; 135: 724-728.
94. Schneider G, Schmid RM. Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Mol Cancer* 2003; 2: 15-21.
95. Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 897-909.
96. Maitra A, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH. Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol* 2003; 16: 902-912.
97. Maitra A, Kern SE, Hruban RH. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 211-226.
98. Hruban RH, Goggins M, Parsons J, Kern SE. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2969-2972.
99. Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 2006; 20: 1218-1249.
100. Moore PS, Beghelli S, Zamboni G, Scarpa A. Genetic abnormalities in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2003; 2: 7-12.
101. Blanck HM, Tolbert PE, Hoppin JA. Patterns of genetic alterations in pancreatic cancer: a pooled analysis. *Environ Mol Mutagen* 1999; 33: 111-122.
102. Vera E, Canela A, Fraga MF, Esteller M, Blasco MA. Epigenetic regulation of telomeres in human cancer. *Oncogene* 2008; 27: 6817-6833.
103. Esteller M. Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes. *Br J Cancer* 2007; 96: 26-30.
104. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 1148-1159.
105. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 286-298.
106. Malumbres M, Barbacid M. *RAS* oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 459-465.
107. Bos JL. *Ras* oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 4682-4689.
108. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988; 53: 549-554.

109. Smit VT, Boot AJ, Smits AM, Fleuren GJ, Cornelisse CJ, Bos JL. KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 7773-7782.
110. Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, Redston MS, Yeo CJ, Kern SE. Detection of K-*ras* mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res* 1994; 54: 3568-3573.
111. Shields JM, Pruitt K, McFall A, Shaub A, Der CJ. Understanding *ras*: 'it ain't over 'til it's over'. *Trends Cell Biol* 2000; 10: 147-154.
112. Fryzek JP, Garabrant DH, Schenk M, Kinnard M, Greenson JK, Sarkar FH. The association between selected risk factors for pancreatic cancer and the expression of p53 and K-*ras* codon 12 mutations. *Int J Gastrointest Cancer* 2006; 37: 139-145.
113. Slebos RJ, Hoppin JA, Tolbert PE, Holly EA, Brock JW, Zhang RH, Bracci PM, Foley J, Stockton P, McGregor LM, Flake GP, Taylor JA. K-*ras* and p53 in pancreatic cancer: association with medical history, histopathology, and environmental exposures in a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 1223-1232.
114. Malats N, Porta M, Corominas JM, Piñol JL, Rifà J, Real FX. Ki-*ras* mutations in exocrine pancreatic cancer: association with clinicopathological characteristics and with tobacco and alcohol consumption. *Int J Cancer* 1997; 70: 661-667.
115. Löhr M, Klöppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Lüttges J. Frequency of K-*ras* mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia* 2005; 7: 17-23.
116. Furukawa T, Sunamura M, Horii A. Molecular mechanisms of pancreatic carcinogenesis. *Cancer Sci* 2006; 97: 1-7.
117. Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ. Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 1998; 17: 1395-1413.
118. Capella G, Cronauer-Mitra S, Pienado MA, Perucho M. Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-*ras* gene in human tumors. *Environ Health Perspect* 1991; 93: 125-131.
119. Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 1731-1734.
120. Porta M, Malats N, Jarid M, Grimalt JO, Rifà J, Carrato A, Guarner L, Salas A, Santiago-Silva M, Corominas JM, Andreu M, Real FX. Serum concentrations of organochlorine compounds and K-*ras* mutations in exocrine pancreatic cancer. *Lancet* 1999; 354: 2125-2129.
121. Porta M, Malats N, Guarner L, Carrato A, Rifà J, Salas A, Corominas JM, Andreu M, Real FX. Association between coffee drinking and K-*ras* mutations in exocrine pancreatic cancer. *J Epidemiol Community Health* 1999; 53: 702-709.

122. Alguacil J, Porta M, Malats N, Kauppinen T, Kogevinas M, Benavides FG, Partanen T, Carrato A; PANKRAS II Study Group. Occupational exposure to organic solvents and *K-ras* mutations in exocrine pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 2002; 23: 101-106.
123. Alguacil J, Porta M, Kauppinen T, Malats N, Kogevinas M, Carrato A; PANKRAS II Study Group. Occupational exposure to dyes, metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and other agents and *K-ras* activation in human exocrine pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2003; 107: 635-641.
124. Morales E, Porta M, Vioque J, López T, Mendez MA, Pumarega J, Malats N, Crous-Bou M, Ngo J, Rifà J, Carrato A, Guarner L, Corominas JM, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Food and nutrient intakes and *K-ras* mutations in exocrine pancreatic cancer. *J Epidemiol Community Health* 2007; 61: 641-649.
125. Porta M, Ayude D, Alguacil J, Jarrod M. Exploring environmental causes of altered *ras* effects: fragmentation plus integration? *Mol Carcinog* 2003; 36: 45-52.
126. Nagata Y, Abe M, Motoshima K, Nakayama E, Shiku H. Frequent glycine-to-aspartic acid mutations at codon 12 of *c-Ki-ras* gene in human pancreatic cancer in Japanese. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81: 135-140.
127. Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, van Weering DH, Allison DC, Goodman SN, Kensler TW, Bose KK, Cameron JL, Bos JL. *K-ras* oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 1993; 143: 545-554.
128. Berger DH, Chang H, Wood M, Huang L, Heath CW, Lehman T, Ruggeri BA. Mutational activation of *K-ras* in nonneoplastic exocrine pancreatic lesions in relation to cigarette smoking status. *Cancer* 1999; 85: 326-332.
129. Jiao L, Zhu J, Hassan MM, Evans DB, Abbruzzese JL, Li D. *K-ras* mutation and p16 and preproenkephalin promoter hypermethylation in plasma DNA of pancreatic cancer patients: in relation to cigarette smoking. *Pancreas* 2007; 34: 55-62.
130. Porta M, Real FX, Malats N, Guarner L, Rifà J, Carrato A. Role of mutations in *K-ras* and *p53* genes in exocrine pancreatic cancer and cancer of the biliary tract (PANKRAS II). In: Sankaranarayanan R, Wahrendorf J, Démaret E, Eds. *Directory of On-going Research in Cancer Epidemiology* 1996. IARC Scientific Publications, no. 137. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1996: 304.
131. Porta M, Real FX, Malats N, et al. Estudio multicéntrico prospectivo sobre el papel del oncogen *K-ras* y del gen *p53* en el diagnóstico, el pronóstico y la etiología del cáncer de páncreas exocrino y en el cáncer de las vías biliares (PANKRAS II). Fondo de Investigación Sanitaria (FIS), project #92/0007. 1991. Ministerio de Sanidad; Madrid.
132. Malats N, Porta M, Fernandez E, Real FX. Detection of *c-Ki-ras* mutation by PCR/RFLP analysis and diagnosis of pancreatic adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1353-1354.

133. Porta M, Malats N, Piñol JL, et al. Relevance of misclassification of disease status in epidemiologic studies of exocrine pancreatic cancer. *J Clin Epidemiol* 1996; 49: 602-603.
134. Malats N, Real FX, Porta M. DDT and pancreatic cancer. [Letter]. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 328-329.
135. Porta M, Fabregat X, Malats N, Guarner L, Carrato A, de Miguel A, Ruiz L, Jariod M, Costafreda S, Coll S, Alguacil J, Corominas JM, Solà R, Salas A, Real FX. Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clin Transl Oncol* 2005; 7: 189-197.
136. Soler M, Malats N, Porta M, Fernandez E, Guarner L, Maguire A, Piñol JL, Rifà J, Carrato A. Medical conditions in patients with pancreatic and biliary diseases: validity and agreement between data from questionnaires and medical records. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 2469-2477.
137. Porta M, Costafreda S, Malats N, Guarner L, Soler M, Gubern JM, García-Olivares E, Andreu M, Salas A, Corominas JM, Alguacil J, Carrato A, Rifà J, Real FX. Validity of the hospital discharge diagnosis in epidemiologic studies of biliopancreatic pathology. *Eur J Epidemiol* 2000; 16: 533-541.
138. Malats N, Casals T, Porta M, Guarner L, Estivill X, Real FX. The cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) Δ F508 mutation and 5T allele in patients with chronic pancreatitis and exocrine pancreas cancer. *Gut* 2001; 48: 70-74.
139. Real FX, Malats N, Lesca G, Porta M, Chopin S, Lenoir GM, Sinilnikova O. Family history of cancer and germline BRCA2 mutations in sporadic exocrine pancreas cancer. *Gut* 2002; 50: 653-657.
140. Soler M, Porta M, Malats N, Guarner L, Costafreda S, Gubern JM, García-Olivares E, Andreu M, Real FX. Learning from case-reports: Diagnostic issues in an epidemiologic study of pancreatic cancer. *J Clin Epidemiol* 1998; 51: 1215-1221.
141. Gavalda L, Porta M, Malats N, Piñol JL, Fernandez E, Maguire A, Cortès I, Carrillo E, Marrugat M, Rifà J. Agreement between information supplied by the patient and a family member on medical history, consumption of tobacco, alcohol and coffee and diet in cancer of the exocrine pancreas and extrahepatic biliary tract. *Gac Sanit* 1995; 9: 334-342.
142. International Union Against Cancer. TNM classification of malignant tumours. 4th ed, 2nd rev. Berlin: Springer, 1992.
143. American Joint Committee on Cancer, TNM Committee of the International Union Against Cancer. Handbook for staging of cancer from the Manual for Staging of Cancer. 4th ed. Philadelphia: J B Lippincott, 1993.
144. World Health Organization. International classification of diseases for oncology (ICD-O-2). 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 1990.
145. Berg JW. Morphologic classification of human cancer. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF Jr eds. *Cancer epidemiology and prevention*. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 1996: 28-44.
146. Berrozpe G, Schaeffer J, Peinado MA, Real FX, Perucho M. Comparative analysis of mutations in p53 and Ki-ras genes in pancreas cancer. *Int J Cancer* 1994; 58: 185-191.

147. Malats N, Porta M, Piñol JL, Corominas JM, Rifà J, Real FX. *Ki-ras* mutations as a prognostic factor in extrahepatic bile system cancer. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1679-1686.
148. De Vivo I, Hankinson SE, Li L, Colditz GA, Hunter DJ. Association of CYP1B1 polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 489-492.
149. McGrath M, Hankinson SE, Arbeitman L, Colditz GA, Hunter DJ, De Vivo I. Cytochrome P450 1B1 and catechol-O-methyltransferase polymorphisms and endometrial cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 2004; 25: 559-565.
150. Rosenbaum PR. The case-only odds ratio as a causal parameter. *Biometrics* 2004; 60: 233-240.
151. Taylor JA. Oncogenes and their applications in epidemiologic studies. *Am J Epidemiol* 1989; 130: 6-13.
152. Vineis P, Porta M. Causal thinking, biomarkers and mechanisms of carcinogenesis. *J Clin Epidemiol* 1996; 49: 951-956.
153. Rothman N, Stewart WF, Schulte PA. Incorporating biomarkers into cancer epidemiology: a matrix of biomarker and study design categories. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4: 301-311.
154. Piegorsch WW, Weinberg CR, Taylor JA. Non-hierarchical logistic models and case-only designs for assessing susceptibility in population-based case-control studies. *Stat Med* 1994; 13: 153-162.
155. Begg CB, Zhang Z-F. Statistical analysis of molecular epidemiology studies employing case-series. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 173-175.
156. Schaid DJ, Jacobsen SJ. Biased tests of association: comparisons of allele frequencies when departing from Hardy-Weinberg proportions. *Am J Epidemiol* 1999; 149: 706-711.
157. Schaid DJ, Rowland C. Use of parents, sibs, and unrelated controls for detection of associations between genetic markers and disease. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 1492-1506.
158. Armitage P, Berry G, Matthews JNS. *Statistical methods in medical research*. 4th edition. Oxford: Blackwell 2002.
159. Rothman KJ, Greenland S, Lash TL. *Modern epidemiology*. 3rd edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2008.
160. Kleinbaum DG, Kupper LL, Morgenstern H. *Epidemiologic research*. Belmont, CA: Lifetime Learning Publications 1982: 320-376, 343, 419-456.
161. Breslow NE, Day NE. *Statistical methods in cancer research. Vol I: The analysis of case-control studies*. Lyon: IARC Scientific Publications 1980: 149-154.
162. Bland M. *An Introduction to medical statistics*. Oxford: Oxford Medical Publications 1987: 241-265.
163. Fuchs CS, Colditz GA, Stampfer MJ, Giovannucci EL, Hunter DJ, Rimm EB, Willett WC, Speizer FE. A prospective study of cigarette smoking and the risk of pancreatic cancer. *Arch Intern Med* 1996; 156: 2255-2260.

164. Silverman DT, Dunn JA, Hoover RN, Schiffman M, Lillemoe KD, Schoenberg JB, Brown LM, Greenberg RS, Hayes RB, Swanson GM, Wacholder S, Schwartz AG, Liff JM, Pottern LM. Cigarette smoking and pancreas cancer: a case-control study based on direct interviews. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 510-516.
165. Bueno de Mesquita HB, Maisonneuve P, Moerman CJ, Runia S, Boyle P. Life-time history of smoking and exocrine carcinoma of the pancreas: a population-based case-control study in The Netherlands. *Int J Cancer* 1991; 49: 816-822.
166. Boyle P, Maisonneuve P, Bueno de Mesquita B, Ghadirian P, Howe GR, Zatonski W, Baghurst P, Moerman CJ, Simard A, Miller AB, Przewoniak K, McMichael AJ, Hsieh CC, Walker AM. Cigarette smoking and pancreas cancer: a case control study of the SEARCH programme of the IARC. *Int J Cancer* 1996; 67: 63-71.
167. Howe GR, Jain M, Burch JD, Miller AB. Cigarette smoking and cancer of the pancreas: evidence from a population-based case-control study in Toronto, Canada. *Int J Cancer* 1991; 47: 323-328.
168. Askari MD, Tsao M, Cekanova M, Schuller HM. Ethanol and the tobacco-specific carcinogen, NNK, contribute to signaling in immortalized human pancreatic duct epithelial cells. *Pancreas* 2006; 33: 53-62.
169. Baskaran K, Laconi S, Reddy MK. Transformation of hamster pancreatic duct cells by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butatone (NNK), in vitro. *Carcinogenesis* 1994; 15: 2461-2466.
170. Sills RC, Boorman GA, Neal JE, Hong HL, Devereux TR. Mutations in *ras* genes in experimental tumours of rodents. *IARC Sci Publ* 1999; 146: 55-86.
171. Irimia M, Fraga MF, Sanchez-Cespedes M, Esteller M. CpG island promoter hypermethylation of the Ras-effector gene NORE1A occurs in the context of a wild-type *K-ras* in lung cancer. *Oncogene* 2004; 23: 8695-8699.
172. Slebos RJ, Hruban RH, Dalesio O, Mooi WJ, Offerhaus GJ, Rodenhuis S. Relationship between *K-ras* oncogene activation and smoking in adenocarcinoma of the human lung. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 1024-1027.
173. Ross JA, Nesnow S. Polycyclic aromatic hydrocarbons: correlations between DNA adducts and *ras* oncogene mutations. *Mutat Res* 1999; 424: 155-166.
174. Tretyakova N, Matter B, Jones R, Shallop A. Formation of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts at specific guanines within *K-ras* and *p53* gene sequences: stable isotope-labeling mass spectrometry approach. *Biochemistry* 2002; 41: 9535-9544.
175. Khuder SA. Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer* 2001; 31: 139-148.
176. Thun MJ, Lally CA, Flannery JT, Calle EE, Flanders WD, Heath CW Jr. Cigarette smoking and changes in the histopathology of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1580-1586.

177. Yun YH, Lim MK, Jung KW, Bae JM, Park SM, Shin SA, Lee JS, Park JG. Relative and absolute risks of cigarette smoking on major histologic types of lung cancer in Korean men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2125-2130.
178. Sobue T, Yamamoto S, Hara M, Sasazuki S, Sasaki S, Tsugane S. Cigarette smoking and subsequent risk of lung cancer by histologic type in middle-aged Japanese men and women: the JPHC study. *Int J Cancer* 2002; 99: 245-251.
179. Gealy R, Zhang L, Siegfried JM, Luketich JD, Keohavong P. Comparison of mutations in the *p53* and *K-ras* genes in lung carcinomas from smoking and nonsmoking women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; 8: 297-302.
180. Boffeta P, Trichopoulos D. Cancer of the lung, larynx, and pleura. In: Adami HO, Hunter D, Trichopoulos D, editors. *Textbook of cancer epidemiology*. 2nd edition. New York: Oxford University Press 2008: 349-377.
181. Kuper H, Adami HO, Boffetta P. Tobacco use, cancer causation and public health impact. *J Intern Med* 2002; 251: 455-466.
182. Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers: a different disease. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 778-790.
183. Toyooka S, Tokumo M, Shigematsu H, Matsuo K, Asano H, Tomii K, Ichihara S, Suzuki M, Aoe M, Date H, Gazdar AF, Shimizu N. Mutational and epigenetic evidence for independent pathways for lung adenocarcinomas arising in smokers and never smokers. *Cancer Res* 2006; 66: 1371-1375.
184. Deramandt T, Rustgi AK. Mutant KRAS in the initiation of pancreatic cancer. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1756: 97-101.
185. Nebert DW, Dalton TP. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 947-960.
186. Wenzlaff AS, Cote ML, Bock CH, Land SJ, Santer SK, Schwartz DR, Schwartz AG. CYP1A1 and CYP1B1 polymorphisms and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study. *Carcinogenesis* 2005; 26: 2207-2212.
187. Buters JT, Sakai S, Richter T, Pineau T, Alexander DL, Savas U, Doehmer J, Ward JM, Jefcoate CR, Gonzalez FJ. Cytochrome P450 CYP1B1 determines susceptibility to 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced lymphomas. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 1977-1982.
188. Badawi AF, Cavalieri EL, Rogan EG. Effect of chlorinated hydrocarbons on expression of cytochrome P450 1A1, 1A2 and 1B1 and 2- and 4-hydroxylation of 17beta-estradiol in female Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1593-1599.
189. Li D, Firozi PF, Zhang W, Shen J, DiGiovanni J, Lau S, Evans D, Friess H, Hassan M, Abbruzzese JL. DNA adducts, genetic polymorphisms, and *K-ras* mutation in human pancreatic cancer. *Mutat Res* 2002; 513: 37-48.

190. Malka D, Hammel P, Maire F, Rufat P, Madeira I, Pessione F, Lévy P, Ruzsniowski P. Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut* 2002; 51: 849-852.
191. Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de Gonzalez A, Barzi F, Woodward M. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer* 2005; 92: 2076-2083.
192. Guerra C, Schuhmacher AJ, Canamero M, Grippo PJ, Verdaguer L, Perez-Gallego L, Dubus P, Sandgren EP, Barbacid M. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 2007; 11: 291-302.
193. Karin M. Inflammation and cancer: the long reach of Ras. *Nature Med* 2005; 11: 20-21.
194. Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras oncogene and inflammation: partners in crime. *Cell Cycle* 2005; 4: 735-736.
195. Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 221-233.
196. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867.
197. Hanahan D, Wagner EF, Palmiter RD. The origins of oncomice: a history of the first transgenic mice genetically engineered to develop cancer. *Genes Dev* 2007; 21: 2258-2270.
198. Schiel R, Beltschikow W, Steiner T, Stein G. Diabetes, insulin, and risk of cancer. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2006; 28: 169-175.
199. Basso D, Plebani M, Fogar P, Panozzo MP, Meggiato T, De Paoli M, Del Favero G. Insulin-like growth factor-I, interleukin-1 alpha and beta in pancreatic cancer: role in tumor invasiveness and associated diabetes. *Int J Clin Lab Res* 1995; 25: 40-43.
200. Menendez JA, Lupu R, Colomer R. Obesity, fatty acid synthase, and cancer: serendipity or forgotten causal linkage? *Mol Genet Metab* 2005; 84: 293-295.
201. Luo J, Nordenvall C, Nyrén O, Adami HO, Permert J, Ye W. The risk of pancreatic cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. *Int J Cancer* 2007; 120: 368-372.
202. Risch HA. Etiology of pancreatic cancer, with a hypothesis concerning the role of N-nitroso compounds and excess gastric acidity. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 948-960.
203. Stolzenberg-Solomon RZ, Blaser MJ, Limburg PJ, Perez-Perez G, Taylor PR, Virtamo J, Albanes D; ATBC Study. *Helicobacter pylori* seropositivity as a risk factor for pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 937-941.
204. Welsch T, Kleeff J, Seitz HK, Büchler P, Friess H, Büchler MW. Update on pancreatic cancer and alcohol-associated risk. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 69-75.

205. Bongaerts BW, de Goeij AF, van den Brandt PA, Weijnenberg MP. Alcohol and the risk of colon and rectal cancer with mutations in the K-ras gene. *Alcohol* 2006; 38: 147-154.
206. Seitz HK, Matsuzaki S, Yokoyama A, Homann N, Väkeväinen S, Wang XD. Alcohol and cancer. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 137-143.
207. Salaspuro MP. Alcohol consumption and cancer of the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 679-694.
208. Wang M, Yu N, Chen L, Villalta PW, Hochalter JB, Hecht SS. Identification of an acetaldehyde adduct in human liver DNA and quantitation as N2-ethyldeoxyguanosine. *Chem Res Toxicol* 2006; 19: 319-324.
209. Pöschl G, Stickel F, Wang XD, Seitz HK. Alcohol and cancer: genetic and nutritional aspects. *Proc Nutr Soc* 2004; 63: 65-71.
210. Seitz HK, Simanowski UA, Garzon FT, Rideout JM, Peters TJ, Koch A, Berger MR, Einecke H, Maiwald M. Possible role of acetaldehyde in ethanol-related rectal cocarcinogenesis in the rat. *Gastroenterology* 1990; 98: 406-413.
211. Simanowski UA, Suter P, Russell RM, Heller M, Waldherr R, Ward R, Peters TJ, Smith D, Seitz HK. Enhancement of ethanol induced rectal mucosal hyper regeneration with age in F344 rats. *Gut* 1994; 35: 1102-1106.
212. Go VL, Gukovskaya A, Pandol SJ. Alcohol and pancreatic cancer. *Alcohol* 2005; 35: 205-211.
213. Sarkola T, Iles MR, Kohlenberg-Mueller K, Eriksson CJ. Ethanol, acetaldehyde, acetate, and lactate levels after alcohol intake in white men and women: effect of 4-methylpyrazole. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26: 239-245.
214. Porta M, Malats N, Corominas JM, Rifà J, Piñol JL, Real FX; Pankras I Project Investigators. Generalizing molecular results arising from incomplete biological samples: expected bias and unexpected findings. *Ann Epidemiol* 2002; 12: 7-14.
215. Albert PS, Ratnasinghe D, Tangrea J, Wacholder S. Limitations of the case-only design for identifying gene-environment interactions. *Am J Epidemiol* 2001; 154: 687-693.
216. Stürmer T, Brenner H. Flexible matching strategies to increase power and efficiency to detect and estimate gene-environment interactions in case-control studies. *Am J Epidemiol* 2002; 155: 593-602.

ANNEX 1

Llistat de publicacions derivades dels estudis PANKRAS I i II

En aquest annex presentem la llista completa de publicacions derivades dels estudis PANKRAS I i II, ordenades cronològicament, en les quals s'han descrit amb detall els objectius i la finalitat de l'estudi, així com els mètodes i les estratègies d'anàlisi. El llistat complet de publicacions del GRECMC es pot consultar a: <http://www.imim.es/programesrecerca/epidemiologia/greem.html>. Al final d'aquest annex presentem la llista completa d'investigadors de l'estudi PANKRAS II.

2009

Crous-Bou M, Porta M, Morales E, López T, Carrato A, Puigdomènech E, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Past medical conditions and K-ras mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma: a hypothesis-generating study. *Cancer Causes & Control* 2009; 20 (en premsa).

Crous-Bou M, Porta M, López T, Jariod M, Malats N, Morales E, Guarner L, Rifà J, Carrato A, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Lifetime history of alcohol consumption and K-ras mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2009; 50 (en premsa).

2008

Porta M, Bosch de Basea M, Benavides FG, López T, Fernandez E, Marco E, Alguacil J, Grimalt JO, Puigdomènech E for the PANKRAS II Study Group. Differences in serum concentrations of organochlorine compounds by occupational social class in pancreatic cancer. *Environmental Research* 2008; 108: 370-379.

Porta M, Ferrer-Armengou O, Pumarega J, López T, Crous-Bou M, Alguacil A, Vicente A, Fitó M, Jariod M, Morales E, Covas MI, Puidomènech E, Gupta N for the PANKRAS II Study Group. Exocrine pancreatic cancer clinical factors were related to timing of blood extraction and influenced serum concentrations of lipids. *Journal of Clinical Epidemiology* 2008; 61: 695-704.

Crous-Bou M, De Vivo I, Porta M, Pumarega JA, López T, Alguacil J, Morales E, Malats N, Rifà J, Hunter DJ, Real FX. CYP1B1 polymorphisms and K-ras mutations in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Digestive Diseases & Sciences* 2008; 53: 1417-1421.

Porta M, Pumarega J, Ferrer-Armengou O, López T, Alguacil A, Malats N, Fernández E for the PANKRAS II Study Group. Timing of blood extraction in epidemiologic and proteomic studies: Results and proposals from the PANKRAS II Study. *European Journal of Epidemiology* 2008; 22: 577-588.

2007

Porta M, Grimalt JO, Jariod M, Ruiz L, Marco E, López T, Malats N, Puigdomènech E, Zumeta E for the PANKRAS II Study Group. The influence of lipid and lifestyle factors upon correlations between highly prevalent organochlorine compounds in patients with exocrine pancreatic cancer. *Environment International* 2007; 33: 946-954.

Crous-Bou M, Porta M, López T, Jariod M, Malats N, Alguacil J, Morales E, Fernandez E, Corominas JM, Carrato A, Guarner L, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Lifetime history of tobacco consumption and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *Pancreas* 2007; 35: 135-141.

Morales E, Porta M, Vioque J, López T, Mendez MA, Pumarega J, Malats N, Crous-Bou M, Ngo J, Rifà J, Carrato A, Guarner L, Corominas JM, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Food and nutrient intakes and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *Journal of Epidemiology and Community Health* 2007; 61: 641-649.

2006

Mendez MA, Vioque J, Porta M, Morales E, López T, Malats N, Crous M, Gomez LI for the PANKRAS II Study Group. Estimating dietary intakes from a brief questionnaire in a molecular epidemiologic study of pancreatic and biliary diseases. *European Journal of Epidemiology* 2006; 21: 417-426.

2005

Porta M, Fabregat X, Malats N, Guarner L, Carrato A, de Miguel A, Ruiz L, Jariod M, Costafreda S, Coll S, Alguacil J, Corominas JM, Solà R, Salas A, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Exocrine pancreatic cancer: symptoms at presentation and their relation to tumour site and stage. *Clinical and Translational Oncology* 2005; 7: 189-197.

2003

Alguacil J, Porta M, Kauppinen T, Malats N, Kogevinas M, Carrato A for the PANKRAS II Study Group. Occupational exposure to dyes, metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and other agents and K-ras activation in human exocrine pancreatic cancer. *International Journal of Cancer* 2003; 107: 635-641.

Porta M, Ayude D, Alguacil J, Jariod M. Exploring environmental causes of altered ras effects: fragmentation plus integration? *Molecular Carcinogenesis* 2003; 36: 45-52.

Porta M, Vioque J, Ayude D, Alguacil A, Jariod M, Ruiz L, Murillo JA. Coffee drinking: The rationale for treating it as a potential effect modifier of carcinogenic exposures. *European Journal of Epidemiology* 2003; 18: 289-298.

2002

Fernandez E, Porta M, Malats N, Belloc J, Gallén M. Symptom to diagnosis interval and survival in cancers of the digestive tract. *Digestive Diseases & Sciences* 2002; 47: 2434-2440.

Porta M, Zumeta E, Ruiz L, Jariod M, Malats N, Marco E, Carrato A, Real FX, Grimalt JO. The influence of age and gender on serum concentrations of p,p'DDT, p,p'DDE and the DDT / DDE ratio in subjects with exocrine pancreatic cancer. *Organohalogen Compounds* 2002; 59: 351-354.

Porta M, Ruiz L, Jariod M, Zumeta E, Malats N, Marco E, Carrato A, Real FX, Grimalt JO. Correlations among serum concentrations of highly prevalent organochlorine compounds in patients with exocrine pancreatic cancer. *Organohalogen Compounds* 2002; 55: 307-310.

Porta M, Malats N, Vioque J, Carrato C, Soler M, Ruiz L, Barberà V, Ayude D, Real FX. Incomplete overlapping of biological, clinical and environmental information in molecular epidemiologic studies: a variety of causes and a cascade of consequences. *Journal of Epidemiology & Community Health* 2002; 56: 734-738.

Porta M, Malats N, Corominas JM, Rifà J, Piñol JL, Real FX for the PANKRAS I Study Group. Generalizing molecular results arising from incomplete biological samples: expected bias and unexpected findings. *Annals of Epidemiology* 2002; 12: 7-14.

Alguacil J, Porta M, Malats N, Kauppinen T, Kogevinas M, Benavides FG, Partanen T, Carrato A for the PANKRAS II Study Group. Occupational exposure to organic solvents and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *Carcinogenesis* 2002; 23: 101-106.

Real FX, Malats N, Lesca G, Porta M, Chopin S, Lenoir GM, Sinilnikova O for the PANKRAS II Study Group. Family history of cancer and germline BRCA2 mutations in sporadic exocrine pancreas cancer. *Gut* 2002; 50: 653-657.

Alguacil J, Porta M, Malats N, Benavides FG, Kogevinas M. Exposiciones laborales y cáncer de páncreas: una revisión de la bibliografía internacional. *Archivos de Prevención de Riesgos Laborales* 2002; 5: 21-29.

2001

Porta M. Role of organochlorine compounds in the etiology of pancreatic cancer: A proposal to develop methodological standards. *Epidemiology* 2001; 12: 272-276.

Malats N, Casals T, Porta M, Guarner L, Estivill X, Real FX for the PANKRAS II Study Group. The cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) $\Delta F508$ mutation and 5T allele in patients with chronic pancreatitis and exocrine pancreas cancer. *Gut* 2001; 48: 70-74.

Estivill X, Casals T, Malats N, Porta M, Guarner L, Real FX. Evaluation of the role of CFTR in alcohol related pancreatic disease. *Gut* 2001; 49: 312-313.

Malats N. Gene-environment interactions in pancreatic cancer. *Pancreatology* 2001; 1: 472-476.

Porta M, Ruiz L, Jariod M, Carrato A, Malats N. Thinking about interactions and mechanisms. *Journal of Epidemiology and Community Health* 2001; 55: 608.

2000

Porta M, Jariod M, Malats N, Grimalt JO, Carrato A, Guarner L, Salas A, Rifà J, Corominas JM, Alguacil J, Andreu M, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Prevalence of K-ras mutations at diagnosis and serum levels of DDT, DDE, PCBs and other organochlorine compounds in exocrine pancreatic cancer. In: Gress TM, ed. *Molecular pathogenesis of pancreatic cancer*. Amsterdam: IOS Press, 2000: 37-44.

Alguacil J, Porta M, Benavides FG, Malats N, Kogevinas M, Fernández E, Carrato A, Rifà J, Guarner L for the PANKRAS II Study Group. Occupation and pancreatic cancer in Spain: a case-control study based on job titles. *International Journal of Epidemiology* 2000; 29: 1004-1013.

Alguacil J, Kauppinen T, Porta M, Partanen T, Malats N, Kogevinas M, Benavides FG, Obiols J, Bernal F, Rifà J, Carrato A for the PANKRAS II Study Group. Risk of pancreatic cancer and occupational exposures in Spain. *Annals of Occupational Hygiene* 2000; 44: 391-403.

Porta M, Costafreda S, Malats N, Guarner L, Soler M, Gubern JM, García-Olivares E, Andreu M, Salas A, Corominas JM, Alguacil J, Carrato A, Rifà J, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Validity of the hospital discharge diagnosis in epidemiologic studies of biliopancreatic pathology. *European Journal of Epidemiology* 2000; 16: 533-541.

Porta M, Malats N, Alguacil J, Ruiz L, Jariod M, Carrato A, Rifà J, Guarner L. Coffee, pancreatic cancer, and K-ras mutations: updating the research agenda. *Journal of Epidemiology & Community Health* 2000; 54: 656-659.

Ojajärvi IA, Partanen TJ, Ahlbom A, Boffetta P, Hakulinen T, Jourenkova N, Kauppinen TP, Kogevinas M, Porta M, Vainio HU, Weiderpass E, Wesseling CH. Occupational exposures and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Occupational & Environmental Medicine* 2000; 57: 316-324.

Porta M, Real FX, Grimalt JO, Malats N, Jariod M, Guarner L, Carrato A, Rifà J, Alguacil J, Corominas JM, Salas A, Andreu M, Santiago-Silva M, en nombre de los Investigadores del Estudio PANKRAS II. Mutaciones en el gen K-ras y concentraciones séricas de DDT, DDE, PCBs y otros compuestos organoclorados en el cáncer de páncreas exocrino. *Quadern CAPS* 2000; 29: 24-29.

Porta M, en nom dels Investigadors de l'Estudi PANKRAS II. Residus organoclorats i mutacions en el gen K-ras en el càncer de pàncrees: les raons i els resultats d'un estudi en persones. *L'Informatiu (Acadèmia de Ciències Mèdiques de Catalunya i Balears)* 2000; 1: 16-19.

1999

Porta M, Malats N, Jariod M, Grimalt JO, Rifà J, Carrato A, Guarner L, Salas A, Santiago-Silva M, Corominas JM, Andreu M, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Serum concentrations of organochlorine compounds and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *The Lancet* 1999; 354: 2125-2129.

Porta M, Malats N, Guarner L, Carrato A, Rifà J, Salas A, Corominas JM, Andreu M, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Association between coffee drinking and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *Journal of Epidemiology & Community Health* 1999; 53: 702-709.

Soler M, Malats N, Porta M, Fernandez E, Guarner L, Maguire A, Piñol JL, Rifà J, Carrato A for the PANKRAS II Study Group. Medical conditions in patients with pancreatic and biliary diseases: Validity and agreement between data from questionnaires and medical records. *Digestive Diseases & Sciences* 1999; 44: 2469-2477.

Malats N, Real FX. Correction: Mutations of the cystic fibrosis gene in patients with chronic pancreatitis. *New England Journal of Medicine* 1999; 340: 1592-1593.

Barberà VM, Malats N, Porta M, Real FX, Carrato A. Alteraciones moleculares en el adenocarcinoma de páncreas exocrino. *Revisiones en Cáncer* 1999; 13: 192-203.

1998

Soler M, Porta M, Malats N, Guarner L, Gubern JM, García-Olivares E, Andreu M, Costafreda S, Real FX. Learning from case-reports: diagnostic issues in an epidemiologic study on pancreatic cancer. *Journal of Clinical Epidemiology* 1998; 51: 1215-1221.

1997

Malats N, Porta M, Corominas JM, Piñol JL, Rifà J, Real FX for the PANKRAS I Project Investigators. *Ki-ras* mutations in exocrine pancreatic cancer: association with clinico-pathological characteristics, and with tobacco and alcohol consumption. *International Journal of Cancer* 1997; 70: 661-667.

1996

Porta M, Real FX, Malats N, Guarner L, Rifà J, Carrato A, *et al.* Role of mutations in *Kras* and *p53* genes in exocrine pancreatic cancer and cancer of the biliary tract (PANKRAS II). In: Sankaranarayanan R, Wahrendorf J, Démaret E, Eds. *Directory of On-going Research in Cancer Epidemiology 1996*. IARC Scientific Publications, no. 137. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1996: 304.

Porta M, Malats N, Piñol JL, Real FX, Rifà J. Diagnostic certainty in pancreatic cancer. *Journal of Clinical Epidemiology* 1996; 49: 601-603.

1995

Malats N, Porta M, Piñol JL, Corominas JM, Rifà J, Real FX for the PANKRAS I Project Investigators. *Ki-ras* mutations as a prognostic factor in extrahepatic bile system cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1995; 13: 1679-1686.

Gavaldà L, Porta M, Malats N, Piñol JL, Fernández E, Maguire A, Cortès I, Carrillo E, Marrugat J, Rifà J, Carrato A. Antecedentes patológicos, consumo de tabaco, de alcohol, de café y dieta en el cáncer de páncreas exocrino y el cáncer del sistema biliar extrahepático. Concordancia entre la información facilitada por el paciente y la facilidad. *Gaceta Sanitaria* 1995; 9: 334-342.

1994

Porta M, Malats N, Piñol JL, Rifà J, Andreu M, Real FX for the PANKRAS I Project Investigators. Diagnostic certainty and potential for misclassification in exocrine pancreatic cancer. *Journal of Clinical Epidemiology* 1994; 47: 1069-1079.

Malats N, Porta M, Fernandez E, Real FX. Detection of c-Ki-ras mutation by PCR / RFLP analysis and diagnosis of pancreatic adenocarcinomas. *Journal of the National Cancer Institute* 1994; 86: 1353-1354.

1993

Malats N, Real FX, Porta M. DDT and pancreatic cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 1993; 85: 328-329.

Llistat d'investigadors i centres participants de l'estudi PANKRAS II

Centre Coordinador

Institut Municipal d'Investigació Mèdica: F.X. Real¹, M. Porta¹, N. Malats^{2,3}, E. Fernández⁴, J.L. Piñol⁴, M. Jarrod, E. Carrillo⁴, I. Cortès⁴, L. Gavaldà⁴, J. Alguacil⁴, A. García de Herreros, A. Maguire, A. Serrat, E. Zumeta, F.G. Benavides, M. Soler, M. Torà, S. Costafreda, J. Ngo, C.Q. Porter, D. Ayude, J. Murillo, T. López, M. Crous-Bou, E. Puigdomènech, J. Selva, O. Ferrer-Armengou, J. Pumarega, E. Morales, M. Gasull, M. Bosch de Basea.

Centres Participants

Hospital General de Elche: A. Carrato³, E. Gómez⁴, V. Barberà, J.M. Barón, M. de Diego, R. Guaraz, F.J. Lacueva, J.A. Maruenda, A. Orduña, J. Ruiz, C. Sillero, A. Teruel.

Hospital del Mar, Barcelona: M. Andreu³, J.M. Corominas⁵, S. Coll, M. Conangla, J.M. Gubern, T. Maristany, A. Panadès, R. Solà, F. Tous.

Hospital de Son Dureta, Palma de Mallorca: J. Rifà³, M. Marrugat⁴, J. Calafell, P. de Miguel, J. Forteza, N. Matamoros, A. Obrador, O. Pons, C. Saus, T. Terrasa.

Hospital de la Vall d'Hebron, Barcelona: L. Guarner³, A. Alvarez, J. Bellmunt, I. de Torre, M. García, E. Murio, A. Nadal, V. Puig-Diví, N. Tallada.

Hospital Mútua de Terrassa: A. Salas^{3,5}, E. Cugat, J.C. Espinós, E. García Olivares, M. García.

¹Investigador Principal, ²Coordinadora General, ³Investigador-Coordinador de Centre, ⁴Monitor, ⁵Patòleg de Referència de l'estudi.

ANNEX 2

Grups diagnòstics dels pacients de l'estudi PANKRAS II

En aquest annex es presenten els grans grups diagnòstics dels pacients de l'estudi PANKRAS II, així com el nombre de casos inclosos en cadascun d'ells (veure també l'apartat 3.2 de **Metodologia general**).

PATOLOGIES INCLOSES A L'ESTUDI PANKRAS II	N	Total	Codis CIM.9		
Càncer de pàncrees exocrí		185			
Càncer de cap de pàncrees	114		157.0		
Càncer de cos de pàncrees	19		157.1		
Càncer de cua de pàncrees	11		157.2		
Càncer d'altres llocs especificats del pàncrees	22		157.8		
Càncer de pàncrees, part inespecificada	19		157.9		
Càncer del sistema biliar extrahepàtic		128			
Càncer de vesícula biliar	34		156.0		
Càncer de vies biliars	41		156.1		
Càncer d'Ampul·la de Vàter	37		156.2		
Càncer d'altres llocs especificats de les vies biliars	2		156.8		
Càncer del sistema biliar, part inespecificada	14		156.9		
Patologia pancreàtica benigna		169			
Pancreatitis crònica	119		577.1		
Pancreatitis aguda	40		577.0		
Neoplàsies benignes del pàncrees, excepte illots de Langerhans	7		211.6		
Neoplàsies benignes dels illots de Langerhans	3		211.7		
Altres patologies benignes		73			
Neoplàsies benignes del sistema biliar	2		211.5		
Patologia benigna del fetge	6		571.*	572.*	573*
Colelitiasis i/o colecistitis i/o altra patologia biliar	54		574.*	575.*	576.*
Dolor abdominal	4		789.0		
Peritonitis	1		567.2		
Síndrome depressiu	2		311.*		
Diabetis mellitus	1		250.0		
Exostosis	1		726.0		
Osteoporosis	1		733.0		
Fractura de fèmur	1		820.0		
Altres patologies malignes		47			
Càncer de pàncrees endocrí	3		157.4		
Neoplàsia periampul·lar	7		156.3		
Neoplàsia d'esòfag	1		150.*		
Neoplàsia d'estómac	6		151.*		
Neoplàsia de l'intestí prim	1		152.*		
Neoplàsia de còlon	4		153.*		
Neoplàsia de recte	1		154.*		
Neoplàsia de fetge i conductes biliars intrahepàtics	3		155.*		
Neoplàsia d'origen digestiu i/o abdominal sense determinar	4		159.*	199.*	
Neoplàsia de pulmó	2		162.*		
Limfomes	8		200.*		
Neoplàsies malignes secundàries (metàstasi)	7		196.*	197.*	198.*
TOTAL DE CASOS		602			
Controls hospitalaris (Hospital del Mar)	29				
Voluntaris sans	27				
TOTAL PERSONES		658			

CIM = Classificació internacional de malalties.

Number of subjects included in the PANKRAS II Study by diagnostic group

DIAGNOSTIC GROUPS INCLUDED IN THE PANKRAS II STUDY	N	Total	ICD9 codes		
Malignant neoplasms of the exocrine pancreas		185			
Malignant neoplasm of head of pancreas	114		157.0		
Malignant neoplasm of body of pancreas	19		157.1		
Malignant neoplasm of tail of pancreas	11		157.2		
Malignant neoplasm of specified site(s) of pancreas	22		157.8		
Malignant neoplasm of pancreas (part unspecified)	19		157.9		
Malignant neoplasms of the gallbladder and the extrahepatic bile ducts		128			
Malignant neoplasm of gallbladder	34		156.0		
Malignant neoplasm of extrahepatic bile ducts	41		156.1		
Malignant neoplasm of Ampulla of Vater	37		156.2		
Malignant neoplasm of specified site(s) of gallbladder and extrahepatic bile ducts	2		156.8		
Malignant neoplasm of biliary tract (part unspecified)	14		156.9		
Benign diseases of the pancreas		169			
Chronic pancreatitis	119		577.1		
Acute pancreatitis	40		577.0		
Benign neoplasm of pancreas, except islets of Langerhans	7		211.6		
Benign neoplasm of islets of Langerhans	3		211.7		
Other benign pathologies		73			
Benign neoplasm of biliary tract	2		211.5		
Benign pathology of liver	6		571.*	572.*	573*
Cholelithiasis and/or cholecystitis and/or other disorders of biliary tract	54		574.*	575.*	576.*
Abdominal pain	4		789.0		
Peritonitis	1		567.2		
Depressive disorder	2		311.*		
Diabetes mellitus	1		250.0		
Adhesive capsulitis of shoulder	1		726.0		
Osteoporosis	1		733.0		
Closed transcervical fracture (neck of femur)	1		820.0		
Other malignant pathologies		47			
Malignant neoplasm of islets of pancreas	3		157.4		
Malignant neoplasm of periampular zone	7		156.3		
Malignant neoplasm of oesophagus	1		150.*		
Malignant neoplasm of stomach	6		151.*		
Malignant neoplasm of small intestine	1		152.*		
Malignant neoplasm of colon	4		153.*		
Malignant neoplasm of rectum	1		154.*		
Malignant neoplasm of liver and intrahepatic bile ducts	3		155.*		
Malignant neoplasm of other and ill-defined sites within the digestive organs and peritoneum (unspecified site)	4		159.*	199.*	
Malignant neoplasm of lung	2		162.*		
Malignant tumor of lymphatic tissue	8		200.*		
Secondary malignant neoplasm	7		196.*	197.*	198.*
TOTAL NUMER OF CASES		602			
Hospital controls (Hospital del Mar)	29				
Healthy volunteers	27				
TOTAL NUMER OF SUBJECTS		658			

ICD = International statistical classification of diseases and related health problems.

ANNEX 3

Comparació dels pacients inclosos i exclosos en les diferents anàlisis

Atesa la importància dels biaixos de selecció que sovint afecten els estudis (epidemiològics, clínics i de vegades també els experimentals) que treballen amb mostres biològiques [121,214] en molts dels nostres articles hem comentat les diferències entre els grups de pacients analitzats i no analitzats, inclosos i exclosos; tanmateix, les limitacions d'espai habituals en les revistes no han permès publicar les taules de comparació entre els diferents grups de pacients. Per aquest motiu en aquest annex es presenten les taules de comparació detallades entre els casos inclosos i exclosos en cadascuna de les diferents anàlisis.

A continuació hem inclòs les taules següents (veure també les **pàgines 27-28** de l'apartat 3.2 de **Metodologia general** de la tesi):

1. Comparació de les característiques dels pacients amb i sense entrevista (és a dir, amb i sense informació sobre el consum de tabac i alcohol): 161 (87%) versus 24.
2. Comparació de les característiques dels pacients amb i sense les mutacions en l'oncogèn *K-ras* determinades (és a dir, amb i sense mostra cito-histològica i resultats moleculars): 121 (65,4%) versus 64.
3. Comparació de les característiques dels pacients amb i sense extracció de sang (és a dir, amb i sense leucòcits per analitzar els polimorfismes en el gen *CYP1B1*): 167 (90,3%) versus 18.
4. Comparació de les característiques dels pacients inclosos i exclosos en les anàlisis de l'associació entre el consum de tabac i alcohol i les mutacions en l'oncogèn *K-ras*: 107 (57,8%) versus 78.
5. Comparació de les característiques dels pacients inclosos i exclosos en les anàlisis de l'associació entre els antecedents patològics i les mutacions en l'oncogèn *K-ras*: 120 (64,9%) versus 65.
6. Comparació de les característiques dels pacients inclosos i exclosos en les anàlisis de l'associació entre els polimorfismes en el gen *CYP1B1* i les mutacions en l'oncogèn *K-ras*: 87 (47%) versus 98.
7. Comparació de les característiques dels pacients amb i sense mutacions en l'oncogèn *K-ras*: 94 versus 27.

Taula 1. Comparació de les característiques dels casos d'ADP amb i sense entrevista completa (161 versus 24), és a dir, amb i sense informació sobre els hàbits de consum de tabac i alcohol [Characteristics of pancreatic cancer cases with and without complete interview].

Personal and lifestyle characteristics	Complete interview				P-value
	Yes (N=161)		No (N=24)		
	N	%	%	N	
Age (years) median	161	66.6 ± 12.4 67.0	68.4 ± 13.9 71.8	24	0.503 ¹ 0.478 ²
Sex (% males)	161	59.0	62.5	24	0.826 ³
Social class	160			4	0.738 ³
I+II		11.3	0.0		
III		25.6	50.0		
IV+V		63.1	50.0		
Education (%)	161			3	0.144 ³
Illiterate		11.8	33.3		
Can only read and write		26.1	66.7		
Up to 10 years of schooling		52.8	0.0		
>10 years of schooling		9.3	0.0		
Years of schooling	159	4.9 ± 4.4	0.7 ± 1.2	3	0.102 ¹ 0.066 ²
median		4.0	0.0		
% zero		24.5	66.7		
Occupation (%) (a)	161			4	0.422 ³
Managers, professionals		17.4	0.0		
Service workers		13.0	0.0		
Skilled agricultural & fishery workers		27.3	50.0		
Craft & related trades workers		27.3	0.0		
Plant & machine operators		31.1	0.0		
Elementary occupations		44.1	75.0		
Smoking					
Ever-smokers (%)	161	56.5	25.0	4	0.323 ³
Pack-years		23.3 ± 30.3	27.0 ± 54.0		0.813 ¹
median		11.0	0.0		0.510 ²
% zero		43.5	75.0		
Coffee drinking					
Regular coffee drinkers (%)	161	85.1	100.0	3	1.000 ³
No. Cups per week	159	12.5 ± 11.7	18.7 ± 14.6	3	0.364 ¹
median		8.0	14.0		0.372 ²
% zero		17.0	0.0		

Plus-minus values are means±SD.

¹Student's t-test.

²Wilcoxon 2-sample rank sum test.

³Fisher's exact test (two-tail).

(a) Groups from the International Standard Classification of Occupations (ISCO88). Managers and Professionals include also technicians and clerks (first-digit major groups 1 to 4 of ISCO88). Service workers include also shop and market sales workers (group 5), and the other four categories correspond to first-digit major groups 6, 7 8 and 9, respectively, of ISCO88. One subject may have had more than one occupation.

Personal and lifestyle characteristics	Complete interview				P-value ¹
	N	Yes (N=161) %	No (N=24) %	N	
Milk (4cat.)	161			3	1.000
Rarely or never		9.3	0.0		
Several times/month		3.1	0.0		
Several times/week		6.2	0.0		
Daily		81.4	100.0		
Milk (3cat.)	161			3	1.000
Low		12.4	0.0		
Medium		6.2	0.0		
High		81.4	100.0		
Milk (2cat.) (% daily)	161	81.4	100.0	3	1.000
Alcohol drinking (5cat.)	161			3	0.663
Non-drinker		14.9	0.0		
Occasional drinker		11.2	33.3		
Low consumption		32.9	33.3		
High consumption		19.3	0.0		
Heavy drinker		21.7	33.3		
Alcohol drinking (3cat.)	161			3	0.360
Non-drinker		14.9	0.0		
Occasional drinker		11.2	33.3		
Regular drinker		73.9	66.7		
Regular alcohol drinkers	161	73.9	66.7	3	1.000
Study interview					
Duration (minutes)	161	27.2 ±8.7	20.3 ± 7.4	4	0.116 ²
median		25.0	22.0		0.137 ³
SDI^a (days)	161	110.6 ± 119.1	73.0 ± 80.4	24	0.137 ²
median		73.0	61.0		0.068 ³
Less than 30 days		19.9	37.5		0.079
Between 30 and 90 days		39.1	41.7		
More than 90 days		41.0	20.8		
SEI^b (days)	153	114.1 ± 119.2	79.4 ± 92.2	14	0.292 ²
median		73.0	58.5		0.178 ³
Less than 41 days		32.7	42.9		0.341
Between 41 and 120 days		34.0	14.3		
More than 120 days		33.3	14		

Plus-minus values are means±SD.

^aSymptom to diagnosis interval.

^bSymptom to extraction interval.

¹Except where otherwise noted, Fisher's exact test.

²Student's t-test.

³Wilcoxon 2-sample rank sum test.

Continua/Continued

Symptoms and other characteristics at presentation	Complete interview				P-value ¹
	N	Yes (N=161) %	No (N=24) %	N	
Abdominal mass					
Epigastric mass	160	9.4	4.3	23	0.698
Right hypocondrium mass	160	14.4	17.4	23	0.753
Left hypocondrium mass	160	3.1	4.3	23	0.559
Courvoisier-Terrier sign	160	11.9	17.4	23	0.499
Hepatomegaly	160	29.4	30.4	23	1.000
Any pain					
Abdominal pain	161	79.5	75.0	24	0.598
Right hypocondrium pain	134	57.5	68.8	16	0.434
Left hypocondrium pain	133	46.6	31.3	16	0.295
Epigastrical pain	133	71.4	70.6	17	1.000
Back pain	152	51.3	27.8	18	0.080
Cholestatic symptoms					
Jaundice	161	56.5	52.2	23	0.823
Hypocholia	161	55.3	47.8	23	0.512
Choluria	161	59.0	56.5	23	0.825
Pruritus	161	34.2	18.2	22	0.152
None ^a	161	33.5	41.7	24	0.688
Any one or two signs ^a		21.1	20.8		
All three ^a		45.3	37.5		
Constitutional syndrome					
Asthenia	161	88.2	73.9	23	0.096
Anorexia	161	85.1	69.6	23	0.076
Weight loss	161	88.2	69.6	23	0.025
Cachexia	160	13.1	8.7	23	0.743
None ^b	161	3.1	29.2	24	<0.001
Any one or two signs ^b		23.0	8.3		
All three ^b		73.9	62.5		
Other symptoms					
Diarrhea	161	47.8	13.6	22	0.002
Steatorrhea	161	28.0	4.5	22	0.017
Nausea	161	51.6	45.5	22	0.653
Vomiting	161	33.5	31.8	22	1.000
Splenomegaly	160	2.5	4.3	23	0.493
Ascites	160	4.4	8.7	23	0.315
Clay-coloured stools	160	45.6	NA	0	NA
Trombophlebitis	161	3.1	4.5	22	0.542
Stage at diagnosis (%)	160			23	0.909
I		23.8	30.4		
II		12.5	13.0		
III		13.1	8.7		
IV		50.6	47.8		

Plus-minus values are means±SD.

^aJaundice (symptom), hypocholia and/or choluria.

^bAsthenia, anorexia and/or weight loss.

¹Fisher's exact test.

No s'observen diferències estadísticament significatives entre els 161 casos amb entrevista completa i els 24 amb entrevista incompleta o no realitzada en les variables estudiades.

Taula 2. Comparació de les característiques dels casos d'ADP amb i sense les mutacions en l'oncogen K-ras determinades (121 versus 64), és a dir, amb i sense mostra cito-histològica i resultats moleculars de l'anàlisi de les mutacions a K-ras. [Characteristics of pancreatic cancer cases with and without K-ras determined.]

Personal and lifestyle characteristics	K-ras determined				P-value
	Yes (N=121)		No (N=64)		
	N	%	%	N	
Age (years) median	121	64.5 ± 12.4 64.7	71.2 ± 12.0 71.99	64	0.001 ¹ 0.709 ²
Sex (% males)	121	58.7	60.9	64	0.875 ³
Social class	106			58	0.553 ³
I-II		12.3	8.6		
III		23.6	31.0		
II-V		64.2	60.3		
Education (%)	107			57	0.042 ³
Illiterate		10.3	15.8		
Can only read and write		22.4	35.1		
Up to 10 years of schooling		59.8	36.8		
>10 years of schooling		7.5	12.3		
Years of schooling median	104	5.3 ± 4.3 6.0	4.1 ± 4.6 3.0	55	0.104 ¹ 0.035 ²
% zero		22.1	27.3		
Occupation (%) (a)	107			58	0.749 ³
Managers, professionals		17.8	15.5		
Service workers		15.9	6.9		
Skilled agricultural & fishery workers		28.0	27.6		
Craft & related trades workers		26.2	27.6		
Plant & machine operators		32.7	25.9		
Elementary occupations		43.9	46.6		
Smoking					
Ever-smokers (%)	107	57.0	53.4	58	0.743 ³
Pack-years median		21.6 ± 30.2 0.9	24.0 ± 34.6 0.0		0.628 ¹ 0.929 ²
% zero		49.6	51.6		
Coffee drinking					
Regular coffee drinkers (%)	107	83.2	89.5	57	0.356 ³
No. Cups per week median	105	13.2 ± 12.3 14.0	11.4 ± 10.6 7.0	57	0.368 ¹ 0.290 ²
% zero		17.1	15.8		

Plus-minus values are means±SD.

¹Student's t-test.

²Wilcoxon 2-sample rank sum test.

³Fisher's exact test (two-tail).

(a) Groups from the International Standard Classification of Occupations (ISCO88). Managers and professionals include also technicians and clerks (first-digit major groups 1 to 4 of ISCO88). Service workers include also shop and market sales workers (group 5), and the other four categories correspond to first-digit major groups 6, 7 8 and 9, respectively, of ISCO88. One subject may have had more than one occupation.

Personal and lifestyle characteristics	K-ras determined				P-value ¹
	N	Yes (N=121) %	No (N=64) %	N	
Milk (4cat.)	107			57	0.642
Rarely or never		9.3	8.8		
Several times/month		1.9	5.3		
Several times/week		5.6	7.0		
Daily		83.2	78.9		
Milk (3cat.)	107			57	0.764
Low		11.2	14.0		
Medium		5.6	7.0		
High		83.2	78.9		
Milk (2cat.) (% daily)	107	83.2	78.9	57	0.529
Alcohol drinking (5cat.)	107			57	0.220
Non-drinker		11.2	21.1		
Occasional drinker		9.3	15.8		
Low consumption		33.6	31.6		
High consumption		20.6	15.8		
Heavy drinker		25.2	15.8		
Alcohol drinking (3cat.)	107			57	0.077
Non-drinker		11.2	21.1		
Occasional drinker		9.3	15.8		
Regular drinker		79.4	63.2		
Regular alcohol drinkers	107	79.4	63.2	57	0.027
Study interview					
Completed interview (%)	121	87.6	85.9	64	0.211
Duration (minutes)		27.0 ± 8.1	27.0 ± 9.8		0.979 ²
median		25.0	25.0		0.884 ³
SDI^a (days)	121	102.9 ± 105.9	111.0 ± 132.1	64	0.650 ²
median		70.0	66.5		0.492 ³
Less than 30 days		19.0	28.1		0.262
Between 30 and 90 days		43.0	32.8		
More than 90 days		38.0	39.1		
SEI^b (days)	109	105.4 ± 104.3	121.9 ± 139.0	58	0.431 ²
median		73.0	68.5		0.770 ³
Less than 41 days		28.4	43.1		0.070
Between 41 and 120 days		40.4	24.1		
More than 120 days		31.2	32.8		

Plus-minus values are means±SD.

^aSymptom to diagnosis interval.

^bSymptom to extraction interval.

¹Except where otherwise noted, Fisher's exact test.

²Student's t-test.

³Wilcoxon 2-sample rank sum test.

Continua/Continued

Symptoms and other characteristics at presentation	K-ras determined				P-value ¹
	Yes (N=121)		No (N=64)		
	N	%	N	%	
Abdominal mass					
Epigastric mass	120	10.8	4.8	63	0.270
Right hypocondrium mass	120	12.5	19.0	63	0.274
Left hypocondrium mass	120	5.0	0.0	63	0.095
Courvoisier-Terrier sign	120	12.5	12.7	63	1.000
Hepatomegaly	120	26.7	34.9	63	0.306
Any pain					
Abdominal pain	120	78.3	79.7	64	1.000
Right hypocondrium pain	95	55.8	63.6	55	0.392
Left hypocondrium pain	95	48.4	38.9	54	0.306
Epigastric pain	95	76.8	61.1	54	0.059
Back pain	110	45.5	55.0	60	0.263
Cholestatic symptoms					
Jaundice (symptom)	120	50.0	67.2	64	0.029
Jaundice (sign)	120	49.2	65.1	63	0.044
Hypocholia	120	49.2	64.1	64	0.063
Choluria	120	53.3	68.8	64	0.059
Pruritus	120	28.3	39.7	63	0.136
None ^a	121	40.5	23.4	64	0.049
Any one or two signs ^a		20.7	21.9		
All three ^a		38.8	54.7		
Constitutional syndrome					
Asthenia	120	85.8	85.9	64	1.000
Anorexia	120	80.8	85.9	64	0.422
Weight loss	120	85.0	84.4	64	1.000
Cachexia	120	11.7	14.3	63	0.643
None ^b	121	6.6	7.8	64	0.187
Any one or two signs ^b		25.6	14.1		
All three ^b		67.8	78.1		
Other symptoms					
Diarrhea	120	40.8	49.2	63	0.347
Steatorrhea	120	25.8	23.8	63	0.858
Nausea	120	48.3	55.6	63	0.437
Vomiting	120	32.5	34.9	63	0.744
Splenomegaly	120	4.2	0.0	63	0.166
Ascites	120	5.8	3.2	63	0.721
Clay-coloured stools	105	52.4	58.2	55	0.508
Trombophlebitis	120	1.7	6.3	63	0.184
Stage at diagnosis (%)	121			62	0.022
I		20.7	32.3		
II		17.4	3.2		
III		12.4	12.9		
IV		49.6	51.6		

Plus-minus values are means±SD.

^aJaundice (symptom), hypocholia and/or choluria.

^bAsthenia, anorexia and/or weight loss.

¹Fisher's exact test.

Quasi no s'observen diferències estadísticament significatives entre els 121 pacients d'ADP que tenen *K-ras* determinat i els 64 que no. L'excepció és l'edat: els casos d'ADP sense *K-ras* determinat són més grans. Aquesta diferència és deguda a la relació de l'edat del pacient amb l'estat de la malaltia en el qual es trobava. Generalment, als pacient de més edat, amb estadis més avançats de la malaltia i amb pitjor pronòstic, era menys probable que se'ls realitzessin proves invasives; per això sovint no disposem de mostra citològica i histològica per a la determinació de mutacions a *K-ras*. També s'observen algunes diferències, menys importants, en l'educació i els anys d'escolarització, en el consum regular d'alcohol, en la síndrome colelàtica i, finalment, en l'estadi tumoral: els casos d'ADP amb *K-ras* determinat tenen més anys d'escolarització, són més consumidors regulars d'alcohol i són diagnosticats més freqüentment en estadis tumorals intermedis (especialment en estadi II).

Taula 3. Comparació de les característiques dels casos d'ADP amb i sense extracció de sang (167 versus 18), és a dir, amb i sense leucòcits per analitzar els polimorfismes en el gen *CYP1B1*. [Characteristics of pancreatic cancer cases with and without blood extraction.]

Personal and lifestyle characteristics	Blood extraction				P-value
	Yes (N=167)		No (N=18)		
	N	%	%	N	
Age (years) median	167	66.6 ± 12.5 66.7	68.4 ± 13.9 68.3	18	0.564 ¹ 0.668 ²
Sex (% males)	167	59.9	55.6	18	0.802 ³
Social class	155			9	0.330 ³
I-III		11.0	11.1		
III		25.2	44.4		
IV-V		63.9	44.4		
Education (%)	155			9	0.819 ³
Illiterate		12.9	0.0		
Can only read and write		26.5	33.3		
Up to 10 years of schooling		51.6	55.6		
>10 years of schooling		9.0	11.1		
Years of schooling	153	4.8 ± 4.4	5.6 ± 4.5	9	0.611 ¹ 0.542 ²
median		4.0	6.0		
% zero		25.5	22.2		
Occupation (%) (a)	135			0	NA ³
Managers, professionals		17.8	-		
Service workers		14.8	-		
Skilled agricultural & fishery workers		26.7	-		
Craft & related trades workers		28.1	-		
Plant & machine operators		30.4	-		
Elementary occupations		45.9	-		
Smoking					
Ever-smokers (%)	156	55.8	55.6	9	1.000 ³
Pack-years		25.2 ± 33.0	24.9 ± 25.3		0.984 ¹
median		10.6	27.0		0.781 ²
% zero		44.2	44.4		
Coffee drinking					
Regular coffee drinkers (%)	155	84.5	100.0	9	0.359 ³
No. Cups per week	153	12.6 ± 12.0	12.6 ± 5.7	9	0.997 ¹
median		7.0	14.0		0.488 ²
% zero		17.6	0.0		

Plus-minus values are means±SD.

¹Student's t-test.

²Wilcoxon 2-sample rank sum test.

³Fisher's exact test (two-tail).

(a) Groups from the International Standard Classification of Occupations (ISCO88). Managers and Professionals include also technicians and clerks (first-digit major groups 1 to 4 of ISCO88). Service workers include also shop and market sales workers (group 5), and the other four categories correspond to first-digit major groups 6, 7 8 and 9, respectively, of ISCO88. One subject may have had more than one occupation.

Personal and lifestyle characteristics	Blood extraction				P-value ¹
	N	Yes (N=167) %	No (N=18) %	N	
Milk (4cat.)	155			9	0.393
Rarely or never		9.7	0.0		
Several times/month		2.6	11.1		
Several times/week		6.5	0.0		
Daily		81.3	88.9		
Milk (3cat.)	155			9	1.000
Low		12.3	11.1		
Medium		6.5	0.0		
High		81.3	88.9		
Milk (2cat.) (% daily)	155	81.3	88.9	9	1.000
Alcohol drinking (5cat.)	155			9	0.861
Non-drinker		14.8	11.1		
Occasional drinker		12.3	0.0		
Low consumption		32.9	33.3		
High consumption		18.7	22.2		
Heavy drinker		21.3	33.3		
Alcohol drinking (3cat.)	155			9	0.848
Non-drinker		14.8	11.1		
Occasional drinker		12.3	0.0		
Regular drinker		72.9	88.9		
Alcohol drinking (3cat.)	155			9	0.534
Occasional drinker		27.1	11.1		
Regular drinker		51.6	55.6		
Heavy drinker		21.3	33.3		
Regular alcohol drinkers	155	72.9	88.9	9	0.448
Study interview					
Completed interview (%)					
Duration (minutes)	156	27.1 ± 8.7	25.6 ± 8.7	9	0.605 ²
median		25.0	27.0		0.986 ³
SDI^a (days)	167	106.0 ± 114.8	74.3 ± 60.3	18	0.251 ²
median		70.0	67.5		0.342 ³
Less than 30 days	167	21.0	33.3	18	0.253
Between 30 and 90 days		38.9	44.4		
More than 90 days		40.1	22.2		
SEI^b (days)	167	116.2 ± 117.4	-	0	NA ²
median		72	-		NA ³
Less than 41 days		33.5	-		
Between 41 and 120 days		34.7	-		
More than 120 days		31.7	-		

Plus-minus values are means±SD.

^aSymptom to diagnosis interval. ^bSymptom to extraction interval.

¹Except where otherwise noted, Fisher's exact test. ²Student's t-test. ³Wilcoxon 2-sample rank sum test.

Symptoms and other characteristics at presentation	Blood extraction				P-value ¹
		Yes (N=167) %	No (N=18) %		
	N			N	
Abdominal mass					
Epigastric mass	166	9.6	0.0	17	0.369
Right hypocondrium mass	166	14.5	17.6	17	0.721
Left hypocondrium mass	166	3.6	0.0	17	1.000
Courvoisier-Terrier sign	166	11.4	23.5	17	0.238
Hepatomegaly	166	28.9	35.3	17	0.584
Any pain					
Abdominal pain	167	79.6	72.2	18	0.542
Right hypocondrium pain	139	58.3	63.6	11	1.000
Left hypocondrium pain	138	44.2	54.5	11	0.544
Epigastrical pain	139	74.1	36.4	11	0.013
Back pain	155	50.3	33.3	15	0.281
Cholestatic symptoms					
Jaundice	166	56.0	55.6	18	1.000
Hypochohlia	166	54.2	55.6	18	1.000
Choluria	166	56.6	77.8	18	0.129
Pruritus	166	33.1	23.5	17	0.588
None ^a	167	35.9	22.2	18	0.306
Any one or two signs ^a		19.8	33.3		
All three ^a		44.3	44.4		
Constitutional syndrome					
Asthenia	166	85.5	94.4	18	0.475
Anorexia	166	83.1	83.3	18	1.000
Weight loss	166	84.9	94.4	18	0.476
Cachexia	166	12.7	11.8	17	1.000
None ^b	167	6.6	5.6	18	0.629
Any one or two signs ^b		22.2	11.1		
All three ^b		71.3	83.3		
Other symptoms					
Diarrhea	166	44.6	35.3	17	0.609
Steatorrhea	166	26.5	11.8	17	0.247
Nausea	166	53.0	29.4	17	0.077
Vomiting	166	34.9	17.6	17	0.184
Splenomegaly	166	3.0	0.0	17	1.000
Ascites	166	5.4	0.0	17	1.000
Clay-coloured stools	152	56.6	12.5	8	0.024
Trombophlebitis	166	3.6	0.0	17	1.000
Stage at diagnosis (%)	165			18	0.898
I		24.2	27.8		
II		12.1	16.7		
III		12.7	11.1		
IV		50.9	44.4		

Plus-minus values are means±SD.

^aJaundice, hypochohlia and/or choluria.

^bAsthenia, anorexia and/or weight loss.

¹Fisher's exact test.

Continua/Continued

Symptoms and other characteristics at presentation	Blood extraction			P-value ¹	
	N	Yes (N=167) %	No (N=18) %		N
Number of diagnostic test before blood extraction	167			18	0.699
< 3 test		23.4	27.8		
3 test		38.9	44.4		
> 3 test		37.7	27.8		
Number of invasive diagnostic test before blood extraction	167			18	0.321
≤ 1 test		52.1	66.7		
> 1 test		47.9	33.3		
Number of non invasive diagnostic test before blood extraction	167			18	1.000
≤ 1 test		29.9	27.8		
> 1 test		70.1	72.2		

¹Fisher's exact test.

No s'observen diferències estadísticament significatives entre els 167 casos amb extracció de sang i els 18 que no en tenien en cap de les variables estudiades.

Taula 4. Comparació de les característiques dels casos d'ADP inclosos i exclosos en les anàlisis de l'associació entre consum de tabac i alcohol i mutacions en l'oncogen K-ras (107 versus 78), és a dir, amb i sense entrevista completa i K-ras determinat. [Characteristics of pancreatic cancer cases with and without epidemiological information from patient interviews and K-ras determined.]

Personal and lifestyle characteristics	K-ras and interview				P-value
	N	Yes (N=107)	No (N=78)	N	
		%	%		
Age (years) median	107	64.2 ± 12.2 64.7	70.4 ± 12.4 71.0	78	0.001 ¹ 0.001 ²
Sex (% males)	107	57.9	61.5	78	0.652 ³
Social class	106			58	0.553 ³
I-II		12.3	8.6		
III		23.6	31.0		
IV-V		64.2	60.3		
Education (%)	107			57	0.042 ³
Illiterate		10.3	15.8		
Can only read and write		22.4	35.1		
Up to 10 years of schooling		59.8	36.8		
>10 years of schooling		7.5	12.3		
Years of schooling	106	5.2 ± 4.3	4.1 ± 4.6	56	0.110 ¹ 0.040 ²
median		6.0	2.5		
% zero		23.6	28.6		
Occupation (%) (a)	97			38	0.876 ³
Managers, professionals		18.6	15.8		
Service workers		17.5	7.9		
Skilled agricultural & fishery workers		29.9	18.4		
Craft & related trades workers		26.8	31.6		
Plant & machine operators		32.0	26.3		
Elementary occupations		45.4	47.4		
Smoking					
Ever-smokers (%)	107	57.0	53.4	58	0.743 ³
Pack-years	107	24.4 ± 31.0	26.5 ± 35.4	58	0.703 ¹ 0.986 ²
median		12.0	10.8		
% zero		43.0	46.6		
Coffee drinking					
Regular coffee drinkers (%)	107	83.2	89.5	57	0.356 ³
No. Cups per week	105	13.2 ± 12.3	11.4 ± 10.6	57	0.368 ¹ 0.290 ²
median		14.0	7.0		
% zero		17.1	15.8		

Plus-minus values are means±SD.

¹Student's t-test.

²Wilcoxon 2-sample rank sum test.

³Fisher's exact test (two-tail).

(a) Groups from the International Standard Classification of Occupations (ISCO88). Managers and Professionals include also technicians and clerks (first-digit major groups 1 to 4 of ISCO88). Service workers include also shop and market sales workers (group 5), and the other four categories correspond to first-digit major groups 6, 7, 8 and 9, respectively, of ISCO88. One subject may have had more than one occupation.

Personal and lifestyle characteristics	K-ras and interview				P-value ¹
	N	Yes (N=107) %	No (N=78) %	N	
Milk (4cat.)	107			57	0.652 ¹
Rarely or never		9.3	8.8		
Several times/month		1.9	5.3		
Several times/week		5.6	7.0		
Daily		83.2	78.9		
Milk (3cat.)	107			57	0.764 ¹
Low		11.2	14.0		
Medium		5.6	7.0		
High		83.2	78.9		
Milk (2cat.) (% daily)	107	83.2	78.9	57	0.529 ¹
Alcohol drinking (5cat.)	107			57	0.220 ¹
Non-drinker		11.2	21.1		
Occasional drinker		9.3	15.8		
Low consumption		33.6	31.6		
High consumption		20.6	15.8		
Heavy drinker		25.2	15.8		
Alcohol drinking (3cat.)	107			57	0.077 ¹
Non-drinker		11.2	21.1		
Occasional drinker		9.3	15.8		
Regular drinker		79.4	63.2		
Regular alcohol drinkers	107	79.4	63.2	57	0.027 ¹
Study interview					
Completed interview (%)					
Duration (minutes)	107	27.0 ± 8.1	27.0 ± 9.8	58	0.979 ²
median		25.0	25.0		0.884 ³
SDI^a (days)	107	102.7 ± 102.2	103.2 ± 122.7	78	0.974 ²
median		72.0	65.0		0.230 ³
Less than 30 days		17.8	28.2		0.238 ¹
Between 30 and 90 days		42.1	35.9		
More than 90 days		40.2	35.9		
SEI^b (days)	102	109.3 ± 106.5	114.1 ± 133.5	64	0.798 ²
median		74	65		0.340 ³
Less than 41 days	102	27.5	43.1	65	0.106 ¹
Between 41 and 120 days		39.2	27.7		
More than 120 days		33.3	29.2		

Plus-minus values are means±SD.

^aSymptom to diagnosis interval.

^bSymptom to extraction interval.

¹Except where otherwise noted, Fisher's exact test.

²Student's t-test.

³Wilcoxon 2-sample rank sum test.

Symptoms and other characteristics at presentation	K-ras and interview				P-value ¹
		Yes (N=107) %	No (N=78) %		
	N			N	
Abdominal mass					
Epigastric mass	106	12.3	3.9	77	0.063
Right hypocondrium mass	106	11.3	19.5	77	0.143
Left hypocondrium mass	106	4.7	1.3	77	0.403
Courvoisier-Terrier sign	106	12.3	13.0	77	1.000
Hepatomegaly					
Any pain					
Abdominal pain	106	25.5	35.1	77	0.190
Right hypocondrium pain	107	80.4	76.9	78	0.588
Left hypocondrium pain	87	54.0	65.1	63	0.184
Epigastrical pain	87	49.4	38.7	62	0.243
Back pain	100	48.0	50.0	70	0.876
Cholestatic symptoms					
Jaundice	107	49.5	64.9	77	0.050
Hypocholia	107	48.6	62.3	77	0.073
Choluria	107	52.3	67.5	77	0.049
Pruritus	107	29.9	35.5	76	0.428
None ^a	107	40.2	26.9	78	0.110
Any one or two signs ^a		21.5	20.5		
All three ^a		38.3	52.6		
Constitutional syndrome					
Asthenia	107	87.9	84.4	77	0.520
Anorexia	107	83.2	83.1	77	1.000
Weight loss	107	87.9	83.1	77	0.396
Cachexia	106	13.2	11.7	77	0.824
None ^b	107	2.8	11.5	78	0.007
Any one or two signs ^b		27.1	12.8		
All three ^b		70.1	75.6		
Other symptoms					
Diarrhea	107	44.9	42.1	76	0.763
Steatorrhea	107	29.0	19.7	76	0.170
Nausea	107	49.5	52.6	76	0.764
Vomiting	107	34.6	31.6	76	0.751
Splenomegaly	106	3.8	1.3	77	0.400
Ascites	106	5.7	3.9	77	0.736
Clay-coloured stools	105	52.4	58.2	55	0.508
Trombophlebitis	107	0.9	6.6	76	0.083
Stage at diagnosis (%)	107			76	0.025
I		18.7	32.9		
II		17.8	5.3		
III		13.1	11.8		
IV		50.5	50.0		

Plus-minus values are means±SD.

^aJaundice (symptom), hypocholia and/or choluria.

^bAsthenia, anorexia and/or weight loss.

¹Fisher's exact test.

Quasi no s'observen diferències estadísticament significatives entre els 107 casos inclosos i els 78 exclosos de l'anàlisi. L'excepció és l'edat: els casos d'ADP sense *K-ras* determinat són més grans, per motius que hem comentat anteriorment. També s'observen algunes diferències, menys importants, en l'educació, els anys d'escolarització, el consum regular d'alcohol i, finalment, en l'estadi tumoral: els casos d'ADP amb *K-ras* determinat tenen més anys d'escolarització, són més consumidors regulars d'alcohol i són diagnosticats més freqüentment en estadis tumorals intermedis (especialment en estadi II), mentre que els casos d'ADP sense *K-ras* determinat es diagnostiquen majoritàriament en estadi I i presenten proporcions més elevades d'analfabets i de pacients que només saben llegir i escriure.

Taula 5. Comparació de les característiques dels casos d'ADP inclosos i exclosos en les anàlisis de l'associació entre antecedents patològics i mutacions en l'oncogen K-ras (120 versus 65), és a dir amb i sense dades clíniques i K-ras determinat. [Characteristics of pancreatic cancer cases with and without data from medical records and K-ras analyzed.]

Personal and lifestyle characteristics	K-ras and medical history				P-value
	Yes (N=120)		No (N=65)		
	N	%	%	N	
Age (years) median	120	64.4 ± 12.4 64.7	71.2 ± 11.9 72.1	65	<0.001 ¹ 0.001 ²
Sex (% males)	120	58.3	61.5	65	0.754 ³
Social class	106			58	0.553 ³
I-II		12.3	8.6		
III		23.6	31.0		
IV-V		64.2	60.3		
Education (%)	107			57	0.042 ³
Illiterate		10.3	15.8		
Can only read and write		22.4	35.1		
Up to 10 years of schooling		59.8	36.8		
>10 years of schooling		7.5	12.3		
Years of schooling	106	5.2 ± 4.3	4.1 ± 4.6	56	0.110 ¹ 0.040 ²
median		6.0	2.5		
% zero		23.6	28.6		
Occupation (%) (a)	107			58	0.749 ³
Managers, professionals		17.8	15.5		
Service workers		15.9	6.9		
Skilled agricultural & fishery workers		28.0	27.6		
Craft & related trades workers		26.2	27.6		
Plant & machine operators		32.7	25.9		
Elementary occupations		43.9	46.6		
Smoking	107				
Ever-smokers (%)		57.0	53.4		0.743 ³
Pack-years		24.4 ± 31.0	26.5 ± 35.4		0.703 ¹
median		12.0	10.8		0.986 ²
% zero		43.0	46.6		
Coffee drinking	107			57	
Regular coffee drinkers (%)		83.2	89.5		0.356 ³
No. Cups per week		13.2 ± 12.3	11.4 ± 10.6		0.368 ¹
median		14.00	7.00		0.290 ²
% zero		19.6	15.8		

Plus-minus values are means±SD.

¹Student's t-test.

²Wilcoxon 2-sample rank sum test.

³Fisher's exact test (two-tail).

(a) Groups from the International Standard Classification of Occupations (ISCO88). Managers and Professionals include also technicians and clerks (first-digit major groups 1 to 4 of ISCO88). Service workers include also shop and market sales workers (group 5), and the other four categories correspond to first-digit major groups 6, 7, 8 and 9, respectively, of ISCO88. One subject may have had more than one occupation.

Personal and lifestyle characteristics	K-ras and medical history				P-value
	N	Yes (N=120) %	No (N=65) %	N	
Diabetes mellitus (% sick)	120	20.8	32.8	64	0.055 ³
Diabetes treatment					
No diabetes	95	79.2	67.2	43	0.328 ³
Diet	5	20.0	28.6	6	
Oral Hypoglycaemic	13	52.0	57.1	12	
Insulin	8	32.0	38.1	8	
Insulin and/or O. Hypo	18	72.0	85.7	18	
Interval from diagnosis of DM to diagnosis of EPC (years)	22	10.7 ± 11.3	12.4 ± 14.3	20	0.677 ¹
median		8.4	5.2		0.840 ¹
<2 years		31.8	20.0		0.447 ³
2-6 years		18.2	35.0		
>6 years		50.0	45.0		
Chronic pancreatitis (% sick)	120	2.5	0.0	63	0.280 ³
Acute pancreatitis (% sick)	119	4.2	0.0	62	0.167 ³
Pancreatitis (% sick)	119	5.9	0.0	62	0.097 ³
Gallstones (% sick)	120	13.3	11.1	63	0.816 ³
Cholecystitis (% sick)	120	2.5	3.2	63	1.000 ³
Gallstones and/or cholecystitis (% sick)	120	14.2	12.7	63	1.000 ³
Peptic ulcer (% sick)	120	10.8	14.3	63	0.484 ³
Milk (3cat.)	107			57	0.764 ³
Low		11.2	14.0		
Medium		5.6	7.0		
High		83.2	78.9		
Alcohol drinking (3cat.)	107			57	0.061 ³
Non-drinker-occasional		20.6	36.8		
Low-high drinker		54.2	47.4		
Heavy drinker		25.2	15.8		
Regular alcohol drinkers	107	79.4	63.2	57	0.027 ³
Study interview					
Completed interview (%)	120	88.3	84.6	65	0.497 ³
Duration (minutes)	107	27.0 ± 8.1	27.0 ± 9.8	58	0.979 ¹
median		25.0	25.0		0.884 ²
Stage at diagnosis (%)	120			63	0.021 ³
I		20.8	31.7		
II		17.5	3.2		
III		12.5	12.7		
IV		49.2	52.4		

Plus-minus values are means±SD.

¹Student's t-test.

²Wilcoxon 2-sample rank sum test.

³Except where otherwise noted, Fisher's exact test.

Continua/Continued

Symptoms and other characteristics at presentation	K-ras and medical history				P-value ¹
	N	Yes	No	N	
		(N=120) %	(N=65) %		
Abdominal mass					
Epigastric mass	119	10.9	4.7	64	0.181
Right hypocondrium mass	119	12.6	18.8	64	0.280
Left hypocondrium mass	119	5.0	0.0	64	0.093
Courvoisier-Terrier sign	119	12.5	12.6	64	1.000
Hepatomegaly	119	26.9	34.4	64	0.311
Any pain					
Abdominal pain	120	78.3	80.0	65	0.852
Right hypocondrium pain	95	55.8	63.6	55	0.392
Left hypocondrium pain	95	48.4	38.9	54	0.306
Epigastric pain	95	76.8	61.8	55	0.062
Back pain	110	45.5	55.0	60	0.263
Cholestatic symptoms					
Jaundice (symptom)	120	50.0	67.2	64	0.029
Jaundice (sign)	119	49.6	64.1	64	0.064
Hypocholia	120	49.2	64.1	64	0.063
Choluria	120	53.3	68.8	64	0.059
Pruritus	120	28.3	39.7		0.136
None ^a	120	40.0	24.6	65	0.081
Any one or two signs ^a		20.8	21.5		
All three ^a		39.2	53.8		
Constitutional syndrome					
Asthenia	120	85.8	87.5	64	0.825
Anorexia	120	80.8	87.5	64	0.304
Weight loss	120	85.8	85.9	64	1.000
Cachexia	119	11.8	14.1	64	0.647
None ^b	120	5.8	7.7	64	0.191
Any one or two signs ^b		25.0	13.8		
All three ^b		69.2	78.5		
Other symptoms					
Diarrhea	120	40.8	49.2	63	0.347
Steatorrhea	120	25.8	23.8	63	0.858
Nausea	120	48.3	55.6	63	0.437
Vomiting	120	32.5	34.9	63	0.744
Splenomegaly	119	4.2	0.0	64	0.164
Ascites	119	5.9	3.1	64	0.498
Clay-coloured stools	105	52.4	58.2	55	0.508
Trombophlebitis	119	1.7	6.3	64	0.184
Stage at diagnosis (%)	120			63	0.021
I		20.8	31.7		
II		17.5	3.2		
III		12.5	12.7		
IV		49.2	52.4		

Plus-minus values are means±SD.

^aJaundice (symptom), hypocholia and/or choluria.

^bAsthenia, anorexia and/or weight loss.

¹Fisher's exact test.

Gairebé no s'observen diferències estadísticament significatives entre els 120 casos inclosos i els 65 exclosos de l'anàlisi. Com ja hem comentat anteriorment, l'excepció és l'edat: els casos d'ADP sense K-ras determinat són més grans. Com abans, s'observen algunes diferències, menys importants, en l'educació, els anys d'escolarització, el consum regular d'alcohol i, finalment, en l'estadi tumoral.

Taula 6. Comparació de les característiques dels casos d'ADP inclosos i exclosos en les anàlisis de l'associació entre polimorfismes en el gen *CYP1B1* i mutacions en l'oncògen *K-ras* (87 versus 98). [Characteristics of pancreatic cancer cases with and without *CYP1B1* polymorphisms and *K-ras* mutations analyzed.]

Personal and lifestyle characteristics	K-ras and <i>CYP1B1</i>				P-value
	Yes (N=87)		No (N=98)		
	N	%	%	N	
Age (years) median	87	64.0 ± 12.2 63.4	69.3 ± 12.5 69.7	98	0.005 ¹ 0.006 ²
Sex (% males)	87	42.5	38.8	98	0.654 ³
Social class	80			84	0.311 ³
I-II		8.8	13.1		
III		22.5	29.8		
IV-V		68.8	57.1		
Education (%)	81			83	0.139 ³
Illiterate		9.9	14.5		
Can only read and write		25.9	27.7		
Up to 10 years of schooling		59.3	44.6		
>10 years of schooling		4.9	13.3		
Years of schooling	80	5.0 ± 4.1	4.7 ± 4.7	82	0.716 ¹
median		6.0	3.0		0.430 ²
% zero		26.3	24.4		
Occupation (%) (a)	81			84	0.852 ³
Managers, professionals		14.8	19.0		
Service workers		16.0	9.5		
Skilled agricultural & fishery workers		29.6	26.2		
Craft & related trades workers		29.6	23.8		
Plant & machine operators		30.9	29.8		
Elementary occupations		45.7	44.0		
Smoking					
Ever-smokers (%)	81	48.1	40.5	84	0.350 ³
Pack-years		18.4 ± 27.6	28.2 ± 33.1		0.039 ¹
median		1.4	19.0		0.055 ²
% zero		48.1	40.5		
Coffee drinking					
Regular coffee drinkers (%)	81	79.0	91.6	83	0.028 ³
No. Cups per week	79	11.3 ± 9.7	13.7 ± 13.3	83	0.190 ¹
median		10.0	7.0		0.411 ²
% zero		21.5	12.0		

Plus-minus values are means±SD.

¹Student's t-test.

²Wilcoxon 2-sample rank sum test.

³Fisher's exact test (two-tail).

(a) Groups from the International Standard Classification of Occupations (ISCO88). Managers and Professionals include also technicians and clerks (first-digit major groups 1 to 4 of ISCO88). Service workers include also shop and market sales workers (group 5), and the other four categories correspond to first-digit major groups 6, 7 8 and 9, respectively, of ISCO88. One subject may have had more than one occupation.

Personal and lifestyle characteristics	K-ras and CYP1B1				P-value ¹
	N	Yes (N=87) %	No (N=98) %	N	
Milk (4cat.)	81			83	0.864
Rarely or never		9.9	8.4		
Several times/month		2.5	3.6		
Several times/week		7.4	4.8		
Daily		80.2	83.1		
Milk (3cat.)	81			83	0.826
Low		12.3	12.0		
Medium		7.4	4.8		
High		80.2	83.1		
Milk (2cat.) (% daily)	81	80.2	83.1	83	0.689
Alcohol drinking (5cat.)	81			83	0.724
Non-drinker		12.3	16.9		
Occasional drinker		9.9	13.3		
Low consumption		34.6	31.3		
High consumption		22.2	15.7		
Heavy drinker		21.0	22.9		
Alcohol drinking (3cat.)	81			83	0.541
Non-drinker		12.3	16.9		
Occasional drinker		9.9	13.3		
Regular drinker		77.8	69.9		
Regular alcohol drinkers	81	77.8	69.9	83	0.289
Study interview					
Completed interview (%)	87	92.0	82.7	98	0.079
Duration (minutes)	81	27.0 ± 8.5	27.1 ± 9.0	84	0.958 ²
median		25.0	25.0		0.806 ³
SDI^a (days)	87	103.9 ± 110.2	107.4 ± 120.2	98	0.838 ²
median		70.0	68.0		0.621 ³
Less than 30 days		16.1	27.6		0.047
Between 30 and 90 days		48.3	31.6		
More than 90 days		35.6	40.8		
SEI^b (days)	86	106.7 ± 108.4	115.9 ± 126.7	81	0.616 ²
median		71.0	75.0		0.766 ³
Less than 41 days		27.9	39.5		0.107
Between 41 and 120 days		41.9	27.2		
More than 120 days		30.2	33.3		

Plus-minus values are means±SD.

^aSymptom to diagnosis interval.

^bSymptom to extraction interval.

¹Except where otherwise noted, Fisher's exact test.

²Student's t-test.

³Wilcoxon 2-sample rank sum test.

Continua/Continued

Symptoms and other characteristics at presentation	K-ras and CYP1B1				P-value ¹
		Yes (N=87)	No (N=98)		
	N	%	%	N	
Abdominal mass					
Epigastric mass	86	10.5	7.2	97	0.448
Right hypocondrium mass	86	14.0	15.5	97	0.836
Left hypocondrium mass	86	7.0	0.0	97	0.010
Courvoisier-Terrier sign	86	14.0	11.3	97	0.658
Hepatomegaly	86	26.7	32.0	97	0.517
Any pain					
Abdominal pain	87	82.8	75.5	98	0.279
Right hypocondrium pain	72	56.9	60.3	78	0.741
Left hypocondrium pain	72	52.8	37.7	77	0.072
Epigastric pain	73	78.1	64.9	77	0.104
Back pain	81	48.1	49.4	89	0.879
Cholestatic symptoms					
Jaundice	86	51.2	60.2	98	0.236
Hypocholia	86	48.8	59.2	98	0.183
Choluria	86	52.3	64.3	98	0.133
Pruritus	86	31.4	33.0	97	0.875
None ^a	87	41.4	28.6	98	0.190
Any one or two signs ^a		19.5	22.4		
All three ^a		39.1	49.0		
Constitutional syndrome					
Asthenia	86	87.2	85.7	98	0.831
Anorexia	86	81.4	84.7	98	0.561
Weight loss	86	84.9	86.7	98	0.833
Cachexia	86	9.3	15.5	97	0.266
None ^b	87	8.0	5.1	98	0.543
Any one or two signs ^b		23.0	19.4		
All three ^b		69.0	75.5		
Other symptoms					
Diarrhea	86	43.0	44.3	97	0.882
Steatorrhea	86	29.1	21.6	97	0.306
Nausea	86	46.5	54.6	97	0.302
Vomiting	86	27.9	38.1	97	0.159
Splenomegaly	86	4.7	1.0	97	0.189
Ascites	86	5.8	4.1	97	0.737
Clay-coloured stools	79	44.3	46.9	81	0.754
Trombophlebitis	86	1.2	5.2	97	0.216
Stage at diagnosis (%)	87			96	0.963
I		24.1	25.0		
II		13.8	11.5		
III		11.5	13.5		
IV		50.6	50.0		

Plus-minus values are means±SD.

^aJaundice (symptom), hypocholia and/or choluria.

^bAsthenia, anorexia and/or weight loss.

¹Fisher's exact test.

A excepció de l'edat, no s'observen diferències estadísticament significatives entre els 87 casos inclosos i els 98 exclosos de l'anàlisi. Els casos d'ADP sense K-ras determinat són més grans per motius que ja hem comentat anteriorment.

Taula 7. Comparació de les característiques dels casos d'ADP amb i sense mutacions en l'oncògen K-ras (94 versus 27). [Characteristics of pancreatic cancer cases with and without K-ras mutations.]

Personal and lifestyle characteristics	K-ras status				P-value
	Mutated (N=94)		Wild-type (N=27)		
	N	%	%	N	
Age (years) median	94	64.8 ± 12.1 65.4	63.6 ± 13.6 62.9	27	0.661 ¹ 0.709 ²
Sex (% males)	94	58.5	59.3	27	1.000 ³
Social class	82			24	0.125 ³
I-II		11.0	16.7		
III		28.0	8.3		
IV-V		61.0	75.0		
Education (%)	83			24	0.367 ³
Illiterate		8.4	16.7		
Can only read and write		24.1	16.7		
Up to 10 years of schooling		61.4	54.2		
>10 years of schooling		6.0	12.5		
Years of schooling	80	5.2 ± 3.7	5.8 ± 5.9	24	0.641 ¹
median		6.0	5.5		0.938 ²
% zero		20.0	29.2		
Occupation (%) (a)	83			24	0.933 ³
Managers, professionals		19.3	12.5		
Service workers		14.5	20.8		
Skilled agricultural & fishery workers		28.9	25.0		
Craft & related trades workers		26.5	25.0		
Plant & machine operators		34.9	25.0		
Elementary occupations		44.6	41.7		
Smoking					
Ever-smokers (%)	83	55.4	62.5	24	0.642 ³
Pack-years	94	20.6 ± 30.5	25.1 ± 29.4	27	0.501 ¹
median		0.0	12.0		0.354 ²
% zero		51.1	44.4		
Coffee drinking					
Regular coffee drinkers (%)	83	88.0	66.7	24	0.026 ³
No. Cups per week	81	14.5 ± 13.1	8.8 ± 8.1	24	0.046 ¹
median		14.0	7.0		0.043 ²
% zero		12.3	33.3		

Plus-minus values are means±SD.

¹Student's t-test.

²Wilcoxon 2-sample rank sum test.

³Fisher's exact test (two-tail).

(a) Groups from the International Standard Classification of Occupations (ISCO88). Managers and Professionals include also technicians and clerks (first-digit major groups 1 to 4 of ISCO88). Service workers include also shop and market sales workers (group 5), and the other four categories correspond to first-digit major groups 6, 7 8 and 9, respectively, of ISCO88. One subject may have had more than one occupation.

Personal and lifestyle characteristics	K-ras status				P-value ¹
		Mutated (N=94) %	Wild-type (N=27) %		
	N			N	
Milk (4cat.)	83			24	0.028
Rarely or never		6.0	20.8		
Several times/month		2.4	0.0		
Several times/week		3.6	12.5		
Daily		88.0	66.7		
Milk (3cat.)	83			24	0.038
Low		8.4	20.8		
Medium		3.6	12.5		
High		88.0	66.7		
Milk (2cat.) (% daily)	83	88.0	66.7	24	0.026
Alcohol drinking (5cat.)	83			24	0.060
Non-drinker		12.0	8.3		
Occasional drinker		4.8	25.0		
Low consumption		36.1	25.0		
High consumption		22.9	12.5		
Heavy drinker		24.1	29.2		
Alcohol drinking (3cat.)	83			24	0.020
Non-drinker		12.0	8.3		
Occasional drinker		4.8	25.0		
Regular drinker		83.1	66.7		
Regular alcohol drinkers	83	83.1	66.7	24	0.091
Study interview					
Completed interview (%)	94	87.2	88.9	27	1.000
Duration (minutes)	83	27.7 ± 8.1	24.9 ± 8.1	24	0.139 ²
median		25.0	24.5		0.102 ²
SDI^a (days)	94	94.6 ± 80.7	131.8 ± 165.4	27	0.268 ²
median		70.0	72.0		0.102 ³
Less than 30 days		19.1	18.5		0.557
Between 30 and 90 days		40.4	51.9		
More than 90 days		40.4	29.6		
SEI^b (days)	86	99.4 ± 80.8	127.9 ± 165.9	23	0.432 ²
median		76.0	69.0		0.741 ³
Less than 41 days		25.6	39.1		0.369
Between 41 and 120 days		40.7	39.1		
More than 120 days		33.7	21.7		

Plus-minus values are means±SD.

^aSymptom to diagnosis interval.

^bSymptom to extraction interval.

¹Except where otherwise noted, Fisher's exact test.

²Student's t-test.

³Wilcoxon 2-sample rank sum test.

Continua/Continued

Symptoms and other characteristics at presentation	K-ras status				P-value ¹
	Mutated (N=94)		Wild-type (N=27)		
	N	%	%	N	
Abdominal mass					
Epigastric mass	93	8.6	18.5	27	0.165
Right hypocondrium mass	93	9.7	22.2	27	0.101
Left hypocondrium mass	93	6.5	0.0	27	0.335
Courvoisier-Terrier sign	93	12.9	11.1	27	1.000
Hepatomegaly	93	31.2	11.1	27	0.048
Any pain					
Abdominal pain	93	78.5	77.8	27	1.000
Right hypocondrium pain	74	54.1	61.9	21	0.622
Left hypocondrium pain	74	47.3	52.4	21	0.806
Epigastrical pain	74	79.7	66.7	21	0.245
Back pain	86	46.5	41.7	24	0.817
Cholestatic symptoms					
Jaundice (symptom)	93	51.6	44.4	27	0.662
Jaundice (sign)	93	51.6	40.7	27	0.384
Hypocholia	93	50.5	44.4	27	0.664
Choluria	93	52.7	55.6	27	0.830
Pruritus	93	31.2	18.5	27	0.233
None ^a	94	39.4	44.4	27	0.751
Any one or two signs ^a		22.3	14.8		
All three ^a		38.3	40.7		
Constitutional syndrome					
Asthenia	93	86.0	85.2	27	1.000
Anorexia	93	81.7	77.8	27	0.781
Weight loss	93	86.0	81.5	27	0.550
Cachexia	93	12.9	7.4	27	0.734
None ^b	94	6.4	7.4	27	0.469
Any one or two signs ^b		23.4	33.3		
All three ^b		70.2	59.3		
Other symptoms					
Diarrhea	93	36.6	55.6	27	0.118
Steatorrhea	93	25.8	25.9	27	1.000
Nausea	93	44.1	63.0	27	0.125
Vomiting	93	31.2	37.0	27	0.642
Splenomegaly	93	3.2	7.4	27	0.314
Ascites	93	7.5	0.0	27	0.347
Clay-coloured stools	81	53.1	50.0	24	0.820
Trombophlebitis	93	2.2	0.0	27	1.000
Stage at diagnosis (%)	94			27	0.441
I		19.1	25.9		
II		20.2	7.4		
III		12.8	11.1		
IV		47.9	55.6		

Plus-minus values are means±SD.

^aJaundice (symptom), hypocholia and/or choluria.

^bAsthenia, anorexia and/or weight loss.

¹Fisher's exact test.

No s'observen diferències entre els casos amb i sense mutacions en el codó 12 de l'oncogèn *K-ras* en les següents variables: edat al diagnòstic del càncer de pàncrees, sexe, educació, estadi tumoral, temps entre el primer símptoma i el diagnòstic del càncer, signes i símptomes i durada de l'entrevista. Però, en canvi, s'observen diferències importants sobretot en el consum de cafè i productes làctics: els casos amb mutacions en l'oncogèn *K-ras* presenten consums més elevats d'ambdós productes. Aquestes troballes han estat analitzades en diverses publicacions [124,214]

ANNEX 4

Projectes de recerca del GRECMC durant el període de realització de la tesi

En aquest annex presentem la llista dels principals projectes de recerca, i el corresponent finançament, que han rebut els investigadors del GRECMC, vigents durant el període 2004-2008 en el qual s'ha realitzat la tesi.

Investigadors: Porta M, Casamitjana M, Macià F (entre altres)
Títol del Projecte: Renovació de l'acreditació com a grup de recerca - Subvenció per a conceptes diversos.
Entitat Finançadora: Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris de Recerca (AGAUR)
Període: 2002-2005
Import: 55.293,13€
Expedient: 2001/SGR/00406

Investigador: Porta M (entre altres)
Títol del Projecte: Evaluación de la exposición a xenoestrógenos de la población adulta en área rural y urbana e identificación de factores asociados a la exposición
Entitat Finançadora: Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS)
Període: 2002-2004
Import: 33.568,50 €
Expedient: PI020974

Investigadors: Porta M, Casamitjana M (entre altres)
Títol del Projecte: Estudio de los intervalos en el diagnóstico y tratamiento del cáncer en Cataluña (Estudio INTERCAT)
Entitat Finançadora: Agencia de Salud Pública de Barcelona, Plan Director de Oncología, Instituto Catalán de Oncología (ICO)
Període: 2003-2004

Investigador: Porta M. Representant de l'IMIM en el Programa de Formació
Títol del Projecte: Red temática de investigación cooperativa de centros en 'Epidemiología y salud pública: determinantes, mecanismos, métodos y políticas'
Entitat Finançadora: Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)
Període: 2003-2006
Import: 108.182,17 €
Expedient: C03/09

Investigador: Porta M. Coordinador del Grup d'Epidemiologia Molecular y Prevención del Cáncer del PRBB; y Co-coordinador (amb el Dr. F.X. Bosch) de l'Àrea de Bioestadística i Epidemiologia del Programa Horitzontal de Bioinformàtica i d'Anàlisis Bioestadístic i Epidemiològic
Títol del Projecte: Red temática de investigación cooperativa de centros en "Cáncer: epidemiología, mecanismos moleculares e investigación clínica"
Entitat Finançadora: Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)
Període: 2003-2006
Import: 1.123.813,61 €
Expedient: C03/10

Investigador:	Porta M (entre altres)
Títol del Projecte:	Ayudas económicas para infraestructuras. Sistema de captura informatizada para formularios y documentos
Entitat Finançadora:	Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)
Període:	2004
Import:	28.444,00 €
Expedient:	mar-57
Investigadors Principals:	Porta M, Alguacil J, Real FX, Petricoin E
Altres investigadors:	Malats N, Liotta L, Blair A., Ferrer O, Pumarega JA, López T
Títol del Projecte:	Use of serum proteome on the early diagnosis of malignant biliary-pancreas disease
Entitat Finançadora:	Occupational and Environmental Epidemiology Branch, Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, National Institutes of Health (Bethesda, Maryland, EEUU). Center for Biologics Evaluation and Research, Food and Drug Administration
Període:	2004-2005
Import:	58.800\$
Expedient:	QRT40073
Investigador Principal:	Porta M
Altres investigadors:	Selva J, Puigdomènech E
Títol del Projecte:	Oferta técnica para la realización de un estudio sobre compuestos orgánicos persistentes (COPs) en personas, medio ambiente y alimentos
Entitat Finançadora:	Ministerio de Medio Ambiente
Període:	2005-2006
Import:	10.345 €
Expedient:	205/05
Investigador:	Porta M (entre altres)
Títol del Projecte:	Genómica del cáncer (Proyecto cooperativo red de centros de cáncer. Subproyecto Nodo Fundación PRBB)
Període:	2006
Import:	154.700 €
Expedient:	PI051312
Investigador Principal:	Alguacil J
Investigador:	Porta M (entre altres)
Títol del Projecte:	Toxicidad subcrónica en trabajadores de las industrias química, metalúrgica y minera expuestos a metales pesados
Entitat Finançadora:	Fondo de Investigación Sanitaria (FIS)
Període:	2005-2007
Import:	107.000 €
Expedient:	PI052511
Investigador:	Porta M (entre altres)
Títol del Projecte:	Ajut de Suport als Grups de Recerca de Catalunya (SGR 2005)
Entitat Finançadora:	Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris de Recerca (AGAUR)
Període:	2004-2008
Import:	7.180,00€
Expedient:	2005SGR00392

Investigador Principal:	Alguacil J
Investigador:	Porta M (entre altres)
Títol del Projecte:	Cáncer de vejiga en el suroeste andaluz. Papel de la exposición ambiental
Entitat Finançadora:	Fondo de Investigación Sanitaria (FIS)
Període:	2007-2010
Import:	330.000 €
Expedient:	PI071160
Investigadors:	Porta M, Crous-Bou M (entre altres)
Títol del Projecte:	Consolidación y extensión de un modelo de investigación cooperativa en epidemiología y salud pública
Entitat Finançadora:	Fondo de Investigación Sanitaria-Instituto de Salud Carlos III (FIS/ISCIII)
Període:	2006
Import:	197.540,00€
Expedient:	PI052302
Investigador:	Porta M (entre altres)
Títol del Projecte:	Novel molecular diagnostic tools for the prevention and diagnosis in pancreatic cancer
Entitat Finançadora:	Comissió Europea
Període:	2006-2009
Import:	624.820,00 €
Expedient:	18771
Investigador principal:	Porta M
Investigadores:	Puigdomènech E, Gasull M, Pumarega JA
Títol del Projecte:	Estudi sobre la distribució de contaminants orgànics en la població de la ciutat de Barcelona, en el marc de l'enquesta de salut
Entitat Finançadora:	Agència de Salut Pública de Barcelona (ASPB)
Període:	2006-2007
Import:	21.170,00€
Investigador principal:	Porta M
Investigadors:	Puigdomènech E, Gasull M, Bosch de Basea M, López T
Títol del Projecte:	Estudi sobre la presència de determinants contaminants orgànics persistents en mostres de sang de la població de Catalunya
Entitat Finançadora:	Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya
Període:	2007
Import:	17.250,00€
Investigador principal:	Porta M
Investigadores:	Puigdomènech E, Gasull M
Títol del Projecte:	Consultoría para la realización de un estudio de vigilancia de contaminantes químicos en la población humana
Entitat Finançadora:	Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)
Període:	2007
Import:	27.840,00€
Investigadores:	Puigdomènech E, Gasull M
Títol del Projecte:	Informes de factores de riesgo ambientales: "Compuestos químicos tóxicos y peligrosos y salud". Bases para el Plan Nacional de Salud y Medio Ambiente
Entitat Finançadora:	Centro Nacional de Salud Ambiental (ISCIII)
Període:	2007
Import:	1.000,00 €

Investigador principal:	Porta, M
Investigadores:	Puigdomènech E, Gasull M, Bosch de Basea M
Títol del Projecte:	Estudio de la influencia de la alimentación en las concentraciones corporales de compuestos orgánicos persistentes
Entitat Finançadora:	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN)
Període:	2007-2008
Import:	29.510,00€
Investigador principal:	Porta M
Investigadors:	Alguacil J, Morales E, Crous-Bou M, Puigdomènech E, Macià F, Casamitjana M, Collet I, Gasull M, Bosch de Basea M, López T, Pumarega JA
Títol del Projecte:	Ciber: Epidemiología y Salud Pública
Entitat Finançadora:	Fondo de Investigación Sanitaria-Instituto de Salud Carlos III (FIS/ISCIII)
Període:	2007-2008
Import:	137.826,50€
Investigador principal:	Porta M
Investigadors:	Vioque J, López T, Pumarega JA, Puigdomènech E, Bosch de Basea M, Gasull M
Títol del Projecte:	La influencia de la dieta en las concentraciones séricas de compuestos organoclorados en pacientes con cáncer de páncreas exocrino
Entitat Finançadora:	Ciber de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP)
Període:	2007
Import:	5.860,00 €
Investigador principal:	Porta M
Investigadors:	Artazcoz L, Alguacil J, López T, Bosch de Basea M, Puigdomènech E, Benavides F
Títol del Projecte:	La influencia de la clase social, la educación y la ocupación en las concentraciones séricas de compuestos organoclorados en pacientes con cáncer de páncreas exocrino
Entitat Finançadora:	Ciber de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP)
Període:	2007
Import:	6.460,00 €
Investigador principal:	Porta M
Investigadores:	Borrell C, Puigdomènech E, Gasull M
Títol del Projecte:	Distribución de las concentraciones sanguíneas de compuestos orgánicos persistentes en la población de la ciudad de Barcelona
Entitat Finançadora:	Ciber de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP)
Període:	2007
Import:	9.020,00 €
Investigador principal:	Porta M
Investigadors:	Navarro C, Martínez C, Macià F, Casamitjana M, López T, Pumarega JA
Títol del Projecte:	Estandarización del cálculo de las demoras en el proceso diagnóstico-terapéutico a partir de los datos proporcionados por los registros de cáncer
Entitat Finançadora:	Ciber de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP)
Període:	2007
Import:	14.600,00 €

Investigador principal: Porta M
Investigadors: Puigdomènech E, Gasull M, Pumarega JA
Títol del Projecte: Métodos de reclutamiento de participantes en estudios epidemiológicos de determinación de agentes químicos ambientales en muestras de suero humano

Entitat Finançadora: Ciber de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP)
Període: 2007
Import: 7.000,00 €

Investigador principal: Porta M
Investigadors: Morales E, Gasull M, Puigdomènech E, Pumarega JA, Vioque J
Títol del Projecte: Revisión y síntesis de la literatura sobre la influencia de la alimentación en las concentraciones corporales de compuestos orgánicos persistentes (COPs) en la población española

Entitat Finançadora: Ciber de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP)
Període: 2008
Import: 15.000,00 €

Investigador principal: Porta M
Investigadors: Puigdomènech E, Gasull M, Borrell C, Sunyer J, Grimalt J, Garí M
Títol del Projecte: Distribución de las concentraciones sanguíneas de compuestos orgánicos persistentes en la población de la ciudad de Barcelona: Estudio transversal prospectivo de la Encuesta de Salud de Barcelona

Entitat Finançadora: Ciber de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP)
Període: 2008
Import: 15.000,00 €

Investigador principal: Macià F
Títol del Projecte: Supervivencia y costes en los cánceres de mama y colorrectal. Determinantes clínicos y organizativos

Entitat Finançadora: Fondo de Investigación Sanitaria (ISCIII)
Període: 2008-2009
Import: 30.855,00 €

ANNEX 5

Curriculum Vitae (brief English version)

Name: Crous Bou, Marta
Nationality: Spanish
Date of Birth: February 8, 1978
Address: Travessera de la Salut, 12. 17300 Blanes (Girona)
Phone: +34 972332545; +34 649711670
E-Mail: mcrous@imim.es

EDUCATION

Degree in Biology. Universitat de Girona, 2000.

Predoctoral studies in Genetics. Universitat de Girona, 2000-2004.

DEA in Genetics. Universitat de Girona. 2002.

Project: "Filogènia molecular del gènere Merluccius basada en el DNA mitocondrial"

PhD in Epidemiology and Public Health. Universitat Autònoma de Barcelona, 2005-present.

Project: "Genetic alterations and environmental factors involved in the etiology of pancreatic ductal adenocarcinoma"

PROFESSIONAL EXPERIENCE

CURRENT POSITION

Predoctoral researcher

Incorporation date: September 1, 2004

Institution: Institut Municipal d'Investigació Mèdica (FIMIM) & CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP); Departament: Grup de Recerca en Epidemiologia Clínica i Molecular del Càncer (<http://www.imim.es/programesrecerca/epidemiologia/grecm.html>)

Postal Address: Dr Aiguader, 88. Barcelona 08003 Phone: 93 316 0700 (ext 1700)

PREVIOUS POSITIONS

Assistant professor

Appointment period: September 1, 2000 - August 31, 2004

Teaching : Genetics, Biology, Molecular Genetics, Population Genetics, Biodiversity.

Institution: Universitat de Girona. Facultat de Ciències. Department: Laboratori d'Ictiologia Genètica.

Postal Address: Campus Montilivi sn. Girona 17071.

FOREIGN RESEARCH STAGES

2 month stage in the **Molecular Biology and Human Genetics Laboratory** of **Universidad de Guadalajara (México)**, from September 3, until October 30, 2001. Collaboration on project "Diversidad genética de grupos étnicos mexicanos revelado mediante análisis del cromosoma Y" and teaching Genetics and Molecular Biology.

1 month stage in **Channing Laboratory** and **Harvard School of Public Health (Boston)** as visiting researcher, from July 3, until July 30, 2006. Collaboration on 2 research projects: "CYP1B1 polymorphisms and pancreatic cancer" and "MDM2 polymorphisms and endometrial cancer".

PUBLICATIONS

Porta M, **Crous M**. La acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas: un proceso causal clave entre el medio ambiente y las enfermedades de etiología compleja. *Gaceta Sanitaria* 2005; 19: 273-276.

Mendez MA, Vioque J, Porta M, Morales E, López T, Malats N, **Crous M**, Gomez LI for the PANKRAS II Study Group. Estimating dietary intakes from a brief questionnaire in a molecular epidemiologic study of pancreatic and biliary diseases. *European Journal of Epidemiology* 2006; 21: 417-426

Crous-Bou M, Porta M, López T, Jariod M, Malats N, Alguacil J, Morales E, Fernandez E, Corominas JM, Carrato A, Guarner L, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Lifetime history of tobacco consumption and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *Pancreas* 2007; 35: 135-141.

Morales E, Porta M, Vioque J, López T, Méndez MA, Pumarega JA, Malats N, **Crous-Bou M**, Rifà J, Carrato A, Guarner L, Corominas JM, Real FX, for the PANKRAS II Study Group. Food and nutrient intakes and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *Journal of Epidemiology and Community Health* 2007; 61: 641-649.

Porta M, Hernández-Aguado I, Lumbreras B, **Crous-Bou M**. "Omics" research, monetization of intellectual property and fragmentation of knowledge: can clinical epidemiology strengthen integrative research? *Journal of Clinical Epidemiology* 2007; 60: 1220-1225.

Crous-Bou M, De Vivo I, Porta M, Pumarega JA, López T, Alguacil J, Morales E, Malats N, Rifà J, Hunter DJ, Real FX for the PANKRAS II Study Group. CYP1B1 polymorphisms and K-ras mutations in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Digestive Diseases & Sciences* 2008; 53: 1417-1421.

Porta M, Ferrer-Armengou O, Pumarega JA, López T, **Crous-Bou M**, Alguacil J, Fitó M, Jariod M, Vicente A, Morales E, Covas MI, Puigdomènech E, Gupta N, for the PANKRAS II Study Group. Exocrine pancreatic cancer clinical factors were related to timing of blood extraction and influenced serum concentrations of lipids. *Journal of Clinical Epidemiology* 2008; 61: 695-704.

Crous-Bou M, Porta M, Morales E, López T, Carrato A, Puigdomènech E, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Past medical conditions and K-ras mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Causes and Control* 2009; 20 (In press).

Crous-Bou M, Porta M, López T, Jariod M, Malats N, Morales E, Guarner L, Rifà J, Carrato A, Real FX for the PANKRAS II Study Group. Lifetime history of alcohol consumption and K-ras mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2009; 50 (In press).

Curriculum Vitae (versió completa en català)

DADES PERSONALS

Nom i Cognoms: Marta Crous i Bou

NIF: 45539595-D

Data i Lloc de naixement: 8 de Febrer de 1978, Blanes

Adreces actuals:

Travessera de la Salut, 12.

17300 Blanes (Girona)

Telèfon: 972 33 25 45

Riera Bugantó, 7. 4rt. 7a.

17003 Girona

Telèfon: 972 21 77 89

Mòbil: 649 71 16 70

e-mail: mcrous@imim.es

TITULACIONS

- *Llicenciada en Biologia* per la Universitat de Girona (UdG) al juny del 2000.

Nota mitjana: 2.2

- *Diploma d'estudis Avançats (D.E.A.) en Genètica*, amb la qualificació d'Excel·lent per unanimitat, per la Universitat de Girona (UdG) el Juliol del 2002.

Obtenció de la Suficiència Investigadora.

- Realització de la Tesi Doctoral al Departament de Ginecologia, Obstetrícia, Medicina Preventiva i Salut Pública de la Universitat Autònoma de Barcelona. En curs des de Setembre de 2004.

SOCIETATS CIENTÍFIQUES

- Membre numerari de la *Sociedad Española de Genética* (SEG) des de 2002.

- Membre numerari de la *Sociedad Española de Epidemiología* (SEE) des de 2008.

FORMACIÓ ACADÈMICA

- *Institut Sa Palomera (Blanes)*

- cursos 1992-1995: B.U.P
- cursos 1995-1996: C.O.U. Nota mitjana batxillerat: 8.23.
- any 1996: Proves d'accés universitari, P.A.A.U. Nota: 7.64.
- Nota de tall per l'accés a la universitat: 7.86

- *Universitat de Girona. Facultat de Ciències (Girona)*

- cursos 1996-2000: Llicenciatura en Biologia (nota expedient: 2.2)
- curs 2000-2002: Cursos de Doctorat i Treball de recerca al Laboratori d'Ictiologia Genètica; Àrea de Genètica del Departament de Biologia de la UdG (Excel·lent per unanimitat)

- *Idiomes*

	General	Parlat	Escrit	Llegit	Traducció
Català	Molt Bo	Molt Bo	Molt Bo	Molt Bo	Molt Bo
Castellà	Molt Bo	Molt Bo	Molt Bo	Molt Bo	Molt Bo
Anglès	Bo*	Bo	Bo	Bo	Bo

* obtenció del Nivell 3 al Servei de Llengües Modernes de la Universitat de Girona al Maig del 2004.

- *Informàtica*

- coneixements a nivell d'usuari dels programes del sistema operatiu *Windows*: bàsicament *Microsoft Word, Excel, Powerpoint* i Internet.
- coneixements a nivell d'usuari de programes específics d'anàlisi de seqüències de DNA com *BioEdit, MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis), DNAsp (DNA sequence polymorphism), PHYLIP (Phylogenetic Inference Package), DAMBE (Data Analysis in Molecular Biology and Evolution)*.
- coneixements a nivell d'usuari del paquet d'anàlisi estadística SPSS.
- coneixements bàsics de bases de dades disponibles a internet (*Medline, Pubmed, NCBI-GenBank*) sobretot pel que fa a la cerca de bibliografia.
- coneixements bàsics a nivell d'usuari del sistema operatiu *Macintosh* sobretot com a encarregada de la manipulació del sequenciador automàtic ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Applied Biosystems) i de programes com el SeqEdit per la comprovació i edició de seqüències de DNA.

- *Seminaris, jornades i cursos*
 - “Jornades tècniques sobre la conservació de l’ós bru als Pirineus”. Universitat de Lleida, Febrer de 1998.
 - “Seminari de Biologia i Ecologia marines”. Girona, Maig de 1998.
 - Curs: “Recursos Marins”. Girona, Maig de 1999.
 - Curs: “Economia i Ecologia”. Universitat Ambiental d'Estiu de Figueres, Juliol de 1999.
 - Curs: “La seducció Ambiental”. Universitat Ambiental d'Estiu de Figueres, Juliol de 1999.
 - Participació en els cicles de conferències "Ciència Oberta". Universitat de Girona, curs 1998-1999.
 - Curs: “La Sida, una malaltia del nostre temps”. Girona, curs 1999-2000.
 - Curs: “La medicina a les portes del segle XXI”. Universitat Autònoma de Barcelona, Juliol de 2000.
 - Curs: “La llarga aventura del genoma”. Museu de la Ciència de la Fundació "La Caixa", Barcelona, Desembre de 2000.
 - Seminari: “Genomic Assays”, organitzat per Applied Biosystems. Barcelona, Octubre de 2002.
 - Seminari: “GenScan. Sistema d’Anàlisi de Fragments i les seves aplicacions”, organitzat per Applied Biosystems. Girona, Novembre de 2002.
 - Seminari: “Post Genome Analysis. Genòmica”, organitzat per Amersham Biosciences. Hospital de Sant Pau, Barcelona, Juny de 2004.
 - “III Simposi Interancional de Teràpia Gènica”, organitzat per la Xarxa Temàtica de Teràpia Gènica. Centre de Regulació Genòmica, Barcelona, Maig de 2004.
 - “Curso de Epidemiología Genética. Estudios de asociación e interacción genético-ambiental”. Organitzat per la Red de Investigación de Epidemiología y Salud Pública (RCESP). Institut Municipal d’Investigacions Mèdiques - Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Novembre de 2004.
 - “II Seminario de Epidemiología Genética”. Organitzat per la Red de Investigación de Epidemiología y Salud Pública (RCESP). Institut Municipal d’Investigacions Mèdiques, Barcelona, Desembre de 2004.
 - “IX Jornada sobre el Càncer de Mama”. Organitzat per l’Insitut Municipal d’Assistència Sanitària. Hospital del Mar, Barcelona, Febrer de 2005.
 - Participació al Taller “avaluació dels programes de cribatge” dins la “IX Jornada sobre el Càncer de Mama”. Impartit a l’Hospital de Mar i acreditat pel Consell Català de la Formació Mèdica Continuada”. Barcelona, Febrer de 2005.
 - “VI Seminario sobre Epidemiología Clínica y Molecular del Cáncer. Curso de Epidemiología genética y molecular: fundamentos, diseños y estrategias de análisis”. Organitzat per la Asociación Española de Investigación Sobre Cáncer (ASEICA). Unitat Docent de la UAB a l’Insitut Municipal d’Assistència Sanitària, Barcelona, Abril de 2005.

- *Pràctiques en empreses*
 - Laboratori de Bioquímica de l'Hospital Universitari Doctor Josep Trueta de Girona (Novembre-Desembre de 1999)
Responsable: Dra. Rosa-Núria Aleixandre
 - Laboratori de Reproducció i Diagnòstic Genètic de la Clínica Girona (Juliol de 1999)
Responsable: Dr. Joan Sarquella

FORMACIÓ PROFESSIONAL

- *Situació professional actual*
Contracte d'investigador a temps complert del CIBER de Epidemiologia y Salud Pública (CIBERESP) des de gener 2007.
- *Activitats professionals anteriors*
 - Contracte d'investigador a temps complert de la Fundació l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), d'octubre a desembre de 2006.
 - Becària de recerca de la Fundació de l'Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), des de setembre de 2004 fins a setembre de 2006.
 - Contracte de professor associat a temps complert (A2 TC) a la Universitat de Girona, des de setembre de 2000 fins a setembre de 2004 (renúncia voluntària).
- *Activitat docent*
A la *Universitat de Girona*, realització de la docència de la part de pràctiques de laboratori de les següents assignatures (docència corresponent a 18 crèdits anuals):
 - *Genètica* a alumnes de segon curs de la Llicenciatura de Biologia (curs 2002-2003, 2003-2004)
 - *Genètica Molecular* a alumnes de segon cicle de la Llicenciatura de Biologia (cursos 2000-2001, 2001-2002, 2002-2003, 2003-2004)
 - *Genètica de Poblacions* a alumnes de segon cicle de la Llicenciatura de Biologia (cursos 2001-2002, 2002-2003, 2003-2004)
 - *Biologia Fonamental* a alumnes de primer curs de la Llicenciatura de Ciències Ambientals (cursos 2000-2001, 2001-2002)
 - *Biodiversitat* a alumnes de segon cicle de la Llicenciatura de Ciències Ambientals (curs 2000-2001)

A la *Universitat de Guadalajara* (Mèxic), realització de la docència de la part teòrica de les següents assignatures:

- *Biologia Molecular* a alumnes de tercer curs de la Llicenciatura de Quimicofarmacobiologia (Setembre - Octubre de 2001)
- *Genètica* a alumnes de quart curs de la Llicenciatura de Quimicofarmacobiologia (Setembre - Octubre de 2001)

A la *Unitat Docent de la Universitat Autònoma de Barcelona a l'Insitut Municipal d'Assistència Sanitària* (Barcelona), participació com a docent i en la coordinació de dues edicions del "Curso de Epidemiología genética y molecular: fundamentos, diseños y estrategias de análisis"; del 18 al 22 d'abril de 2005 i del 24 al 28 d'abril del 2006.

- *Programa de Doctorat*

Realització dels següents cursos de doctorat dins el *Programa de Doctorat de Medi Ambient* de la Universitat de Girona:

- Curs de doctorat: "*Sistemes Complexos, desenvolupament sostenible i comunicació ambiental*". Universitat de Girona, Desembre de 2000.
- Curs de doctorat: "*Anàlisi molecular de malalties hereditàries*". Universitat de Barcelona, Febrer de 2001.
- Curs de doctorat: "*Tècniques de microscopia electrònica*". Universitat de Girona, Febrer de 2001.
- Curs de doctorat: "*Aplicacions dels sistemes d'informació geogràfica a l'anàlisi territorial i ambiental*". Universitat de Girona, Març de 2001.
- Curs de doctorat: "*Evolució molecular al DNA: variabilitat intraespecífica i divergència interespecífica*". Universitat de Barcelona, Maig - Juny de 2001.
- Curs de doctorat: "*Mètodes d'anàlisi filogenètic*". Universitat de Girona, Juny de 2001.
- Curs de doctorat: "*Diversitat genètica i conservació*". Universitat de Girona. Juliol de 2001.

Realització del *Treball de Recerca* que porta per títol: "*Filogènia molecular del gènere *Merluccius* basada en el DNA mitocondrial*", presentat el Maig del 2002 i defensat el Juny del mateix any davant de tribunal únic per la obtenció de la Suficiència Investigadora concedida amb la qualificació d'*Excel·lent per unanimitat*.

- *Línies de recerca*

- Durant el període 2000 al 2004, les línies d'investigació es van desenvolupar al *Laboratori d'Ictiologia Genètica* del Departament de Biologia de la Universitat de Girona i són les següents: filogènia molecular de peixos, estructura i evolució de diferents gens mitocondrials, estructura poblacional d'organismes aquàtics, ecologia molecular i conservació de recursos naturals.

- Des de Febrer de 2002 fins al Setembre de 2004, encarregada de la manipulació del seqüenciador automàtic ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Applied Biosystems) del *Laboratori d'Ictiologia Genètica* de la Universitat de Girona.

- Des de Setembre de 2004 i fins a l'actualitat, dins del Grup de Recerca en Epidemiologia Clínica i Molecular del Càncer de l'Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques de Barcelona, la principal línia d'investigació és l'Epidemiologia clínica i molecular del càncer de pàncrees exocrí, la pancreatitis crònica i el càncer del sistema biliar extrahepàtic. Concretament la línia de recerca es centra en l'estudi de factors ambientals i alteracions genètiques en l'etiologia del càncer de pàncrees.

- *Participació en projectes de recerca*

- Títol del projecte: *Avaluació genètica d'espècies marines*. Finançat per la UDG (projecte 9103059). Durada: de Juliol de 2003 a Juliol de 2004. Investigador principal: Dra María Inés Roldán Borassi.

- Títol del projecte: Papel de las interacciones genético–ambientales en la etiopatogenia del càncer de pàncreas exocrino. Finançat per la RCESP (Red de Investigación de Epidemiología y Salud Pública). Durada indefinida. Investigador principal: Dr Miquel Porta.

- Títol del projecte: Evaluación del impacto sobre la salud humana de los compuestos tóxicos persistentes (CTPs). Finançat per la RCESP (Red de Investigación de Epidemiología y Salud Pública). Durada: 2002-2006. Investigador principal: Dr Miquel Porta.

- Títol del projecte: Factores ambientales y alteraciones genéticas en la etiología del càncer. Finançat per la RTICCC (Red Temàtica de Investigación Cooperativa de Centros de Càncer). Durada indefinida. Investigador principal: Dr Miquel Porta.

- Títol del Projecte: Ciber: Epidemiología y Salud Pública. Finançat per el FIS/ISCIII (Fondo de Investigación Sanitaria- Instituto de Salud Carlos III). Durada: 2007-2008. Investigador principal: Dr Miquel Porta.

- *Beques*

- Concessió d'una beca dins el *Programa de Cooperación Interuniversitaria/E. AL. 2001* per estudiants de pre i postgrau, convocada per l'Agència Espanyola de Cooperació Internacional (A.E.C.I.) per una estada de 2 mesos (del 3 de Setembre al 30 d'Octubre de 2001) a Mèxic per incorporar-me al laboratori de Biologia Molecular i Genètica Humana del *Centro Universitario de la Ciénega* de Universitat de Guadalajara.

Durant aquest període es van realitzar les següents activitats:

- Docència de les assignatures de Biologia Molecular i Genètica a alumnes de tercer i quart curs respectivament, de la llicenciatura de Quimicofarmacobiologia

- Posada a punt d'un nou laboratori de Genètica Humana i Biologia Molecular tant pel que fa a la preparació de reactius, electroforesis, extracció d'ADN i PCR com a la formació dels futurs encarregats de portar el laboratori
- Participació en el projecte d'investigació "*Diversidad genética de grupos étnicos mexicanos revelado mediante análisis del cromosoma Y*" aprovat per el *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACyT nº 33949) i exposició dels resultats en forma de presentació oral al *XXXVI Congreso Nacional de Genética Humana*.

- Concessió d'una beca predoctoral de la Fundació IMIM al setembre de 2004 per participar en el projecte "Factors ambientals i alteracions genètiques en l'etiologia del càncer" com a becària d'investigació per realitzar la tesi doctoral dins la Unitat de Recerca en Epidemiologia Clínica i Molecular del Càncer amb una durada màxima de 5 anys.

- Concessió d'una beca de la Fundació IMIM al gener de 2006 per participar en el projecte "Consolidación y extensión de un modelo de investigación cooperativa en epidemiología y salud pública (xarxa RCESP; C03/09) a la Unitat de Recerca en Epidemiologia Clínica i Molecular del Càncer continuant així com a becària de la Fundació IMIM.

- Concessió d'una beca del programa de formació del CIBERESP al setembre de 2008 per assistir al "Encuentro *Excelencia de la Investigación en Salud Pública* de la Escuela de Verano de Salud Publica (Lazareto de Maó)".

PARTICIPACIÓ EN CONGRESSOS

Congrés: *XXXVI Congreso Nacional de Genética Humana*

Autors: Rangel-Villalobos H, Sandoval L, Ibarra B, **Crous-Bou M**, Figuera L.E.

Títol: *Diversidad haplotípica del cromosoma Y en cinco poblaciones mexicanas*

Tipus de presentació: comunicació oral

Lloc i data de celebració: Puerto Vallarta, Jalisco, México. Del 24 al 27 d'Octubre de 2001.

Congrés: *III Jornades de Biologia Evolutiva*

Autors: **Crous-Bou M**, Roldán MI.

Títol: *Filogènia molecular del gènere Merluccius (Gadiformes: Merlucciidae)*

Tipus de presentació: comunicació oral

Lloc i data de celebració: Barcelona, 7 de Juliol de 2003

Congrés: *Congreso de la Sociedad Española de Genética*

Tipus de participació: assistència sense presentació

Lloc i data de celebració: San Lorenzo de el Escorial (Madrid), 8-10 de Setembre de 2003

Congrés: XV Seminario de Genética de Poblaciones y Evolución

Autors: Heras S, **Crous-Bou M**, Roldán MI.

Títol: *Relaciones evolutivas en peces teleosteos, Estudio I: Análisis filogenético de las familias Mugilidae y Atherinidae (Acanthopterygii) mediante el gen 12S rRNA.*

Tipus de presentació: comunicació oral

Lloc i data de celebració: Sigüenza (Guadalajara), 9-12 de Novembre de 2004

Congrés: XV Seminario de Genética de Poblaciones y Evolución

Autors: **Crous-Bou M**, Roldán MI.

Títol: *Relaciones evolutivas en peces teleosteos, Estudio II: Caracterización de la Región Control del DNA mitocondrial en Gadiformes: variación de secuencias e implicaciones filogenéticas.*

Tipus de presentació: comunicació oral

Lloc i data de celebració: Sigüenza (Guadalajara), 9-12 de Novembre de 2004

Congrés: *IX Jornada sobre el càncer de mama*

Tipus de participació: assistència sense presentació

Lloc i data de celebració: Barcelona, 4 de Febrer de 2005

Congrés: *X Congreso Nacional de la Asociación Española de Investigación Sobre Cáncer: desde los genes a la clínica.*

Autors: **Crous-Bou M**, Porta M, López T, Jarrod M, Malats N, Alguacil J, Carrato A, Real X.

Títol: *En el cáncer de páncreas exocrino el consumo de tabaco no se relaciona con la persistencia de mutaciones en el codon 12 del oncogen K-ras.*

Tipus de presentació: póster

Lloc i data de celebració: Pamplona, 13-16 d'Octubre de 2005.

Congrés: Integrative Molecular Cancer Epidemiology. An IARC-EACR-AACR-ECNIS Symposium

Autors: **Crous-Bou M**, Porta M, Morales E, López T, Real FX.

Títol: *Past medical conditions and K-ras mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma.*

Tipus de presentació: póster

Lloc i data de celebració: Lyon, 3-5 de Juliol de 2008.

Congrés: Encuentro “Excelencia de la Investigación en Salud Pública” de la Escuela de Verano de Salud Pública.

Autors: **Crous-Bou M.**

Títol: *El papel de las interacciones genético-ambientales en la etiología del adenocarcinoma de páncreas.*

Tipus de presentació: comunicació oral.

Lloc i data de celebració: Llazaret de Maó, Menorca, 23-24 de Setembre de 2008.

Congrés: XXVI Reunión Científica de la SEE: ¿Quién es quién frente a las emergencias en la salud pública?

Autors: **Crous-Bou M**, Porta M, López T, Jarrod M, Real FX.

Títol: *Consumo de alcohol y mutaciones en el codón 12 del oncogen K-ras en pacientes con cáncer de páncreas.*

Tipus de presentació: comunicació oral.

Lloc i data de celebració: Girona, 14-17 d'Octubre de 2008.

ESTADES DE RECERCA A L'ESTRANGER

- Estada de 2 mesos al **Laboratori de Biologia Molecular i Genètica Humana de la Universidad de Guadalajara (México)**, del 3 de setembre al 30 d'octubre de 2001. Col·laboració en el projecte de recerca “Diversidad genética de grupos étnicos mexicanos revelado mediante análisis del cromosoma Y” i en la docència de les assignatures de Genètica i Biologia Molecular.

Durant aquest període es van realitzar les següents activitats:

- Docència de les assignatures de Biologia Molecular i Genètica a alumnes de tercer i quart curs respectivament, de la llicenciatura de Quimicofarmacobiologia.

- Posada a punt d'un nou laboratori de Genètica Humana i Biologia Molecular tant pel que fa a la preparació de reactius, electroforesis, extracció d'ADN i PCR, com a la formació dels futurs encarregats de portar el laboratori.

- Participació en el projecte d'investigació: "Diversidad genética de grupos étnicos mexicanos revelado mediante análisis del cromosoma Y" aprovat per el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT nº 33949) i exposició dels resultats en forma de presentació oral en el congrés nacional de genética humana.

- Participació com a co-autora en una comunicació oral titulada “Diversidad haplotípica del cromosoma Y en cinco poblaciones mexicanas”, en el XXXVI Congreso Nacional de Genética Humana. Puerto Vallarta, Jalisco, México. Del 24 al 27 d Octubre de 2001.

- Estada d'1 mes al **Channing Laboratory - Harvard School of Public Health (Boston)** com a investigador visitant, del 3 al 30 de juliol de 2006. Col·laboració en 2 projectes de recerca: "CYP1B1 polymorphisms and pancreatic cancer" i "MDM2 polymorphisms and endometrial cancer".

D'aquesta estada n'han resultat dos articles científics publicats en revistes indexades, amb diferent grau d'implicació:

- com a co-autora: Crous-Bou M, De Vivo I, Porta M, Pumarega JA, López T, Alguacil J, Morales E, Malats N, Rifà J, Hunter DJ, Real FX, for the PANKRAS II Study Group. CYP1B1 polymorphisms and K-ras mutations in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Digestive Diseases & Sciences* 2008; 53:1417-1421.

- com a col·laboradora (reconegut als agraïments): Terry K, McGrath M, Lee IM, Buring J, De Vivo I. MDM2 SNP309 is associated with endometrial cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; 17: 983-986.

PUBLICACIONS

Porta M, **Crous M**. La acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas: un proceso causal clave entre el medio ambiente y las enfermedades de etiología compleja. *Gaceta Sanitaria* 2005; 19: 273-276.

Mendez MA, Vioque J, Porta M, Morales E, López T, Malats N, **Crous M**, Gomez LI for the PANKRAS II Study Group. Estimating dietary intakes from a brief questionnaire in a molecular epidemiologic study of pancreatic and biliary diseases. *European Journal of Epidemiology* 2006; 21: 417-426

Crous-Bou M, Porta M, López T, Jarrod M, Malats N, Alguacil J, Morales E, Fernandez E, Corominas JM, Carrato A, Guarner L, Real FX, for the PANKRAS II Study Group. Lifetime history of tobacco consumption and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *Pancreas* 2007; 35:135-41.

Morales E, Porta M, Vioque J, López T, Mendez MA, Pumarega J, Malats N, **Crous-Bou M**, Ngo J, Rifà J, Carrato A, Guarner L, Corominas JM, Real FX; PANKRAS II Study Group. Food and nutrient intakes and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *J Epidemiol Community Health* 2007; 61:641-9.

Porta M, Hernández-Aguado I, Lumbreras B, **Crous-Bou M**. "Omics" research, monetization of intellectual property and fragmentation of knowledge: can clinical epidemiology strengthen integrative research? *J Clin Epidemiol* 2007;60:1220-5.

Crous-Bou M, De Vivo I, Porta M, Pumarega JA, López T, Alguacil J, Morales E, Malats N, Rifà J, Hunter DJ, Real FX, for the PANKRAS II Study Group. CYP1B1 polymorphisms and K-ras mutations in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Digestive Diseases & Sciences* 2008; 53:1417–1421.

Porta M, Ferrer-Armengou O, Pumarega J, López T, **Crous-Bou M**, Alguacil A, Vicente A, Fitó M, Jarrod M, Morales E, Covas MI, Puigdomènech E, Gupta N, for the PANKRAS II Study Group. Exocrine pancreatic cancer clinical factors were related to timing of blood extraction and influenced serum concentrations of lipids. *Journal of Clinical Epidemiology* 2008; 61: 695-704.

Crous-Bou M, Porta M, Morales E, López T, Carrato A, Puigdomènech E, Real FX; for the PANKRAS II Study Group. Past medical conditions and K-ras mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Causes and Control* 2009; 20 (En premsa).

Crous-Bou M, Porta M, López T, Jarrod M, Malats N, Morales E, Guarner L, Rifà J, Carrato A, Real FX; for the PANKRAS II Study Group. Lifetime history of alcohol consumption and K-ras mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2009; 50. (En premsa).

caa aca gaa aga caa aaa ggt gct ggg tga gaa aag gag
aga cat aaa taa aat atc caa ttt taa ggg tat aga gag
att cac tca agg agg gga gac cat cta tct gct ttg aga
tgg gaa aca aag tca tag ggt cag gat **ggt** gcc tga cta
atg ctc tca aaa gct agg cac caa gga ttt gga ctg gat
gct gga tat aag aag tta tta cag act tgg aag caa gat
gtc tcc ggg aag ggg aga ctt aac tgg gac cag aga tca
tcc cct ata att tta aag gta ctt atc atc ttt agg tac
tta ggt act tag ctt gta act ctt tcc act **gtt** caa ata
acc cag tat gca tgt agc cta tat gga gca ggc aca gag
atg ttt gat gat gat aaa aga cat gcg gaa gaa agg tta
tgg caa cat cat aaa act gaa ttg aga caa aga aag cca
ggt agg aaa gtc aat gaa gaa gtt att cca gaa atg tag
aga agg aag gaa tac aga aga ggc aga tat ggg aaa ata
agg aag tat aat taa aag gag ctg tga cta att tta ata
act ggg tta aaa att aag ttt tca tgt cta aat gtt ctg
gac cat gat gtc act cag gta aga tgg agg gaa ttg aga
gga att cgt tag agg gaa taa cat ggg gaa ttt ggc ttt
cag gca ttt gcc atg ata aca gaa tat tca ttt aga aat
cca gga aat tgg ttt gat gag aat gaa gtg cct gtg aag
gag gac tga agc ttg tta taa ttt cat tca ctt cag gaa
tta cag agg acc caa atg tgc taa gaa cta tga aaa cat
att aaa aga aat ggg cct gga ata att tac aac cta gta
cag tta tgg gaa aac ata ttt gca aaa aag gta tac aaa
taa tga aat aag tgt cca gta agg ata aag tgc aga gta
gaa tta agc agc acc cat tca **tgt** gtt caa att cct gcc
cta aca agg tta tga tca act aga cta act gaa aga ata

IMIM
hospital del mar



Parc
Recerca
Biomèdica
Barcelona

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Medicina

ciberesp

caa aca gaa aga caa aaa ggt gct ggg tga gaa aag gag
aga cat aaa taa aat atc caa ttt taa ggg tat aga gag
att cac tca agg agg gga gac cat cta tct gct ttg aga
tgg gaa aca aag tca tag ggt cag gat **gat** gcc tga cta
atg ctc tca aaa gct agg cac caa gga ttt gga ctg gat
gct gga tat aag aag tta tta cag act tgg aag caa gat
gtc tcc ggg aag ggg aga ctt aac tgg gac cag aga tca
tcc cct ata att tta aag gta ctt atc atc ttt agg tac
tta ggt act tag ctt gta act ctt tcc act **gat** caa ata
acc cag tat gca tgt agc cta tat gga gca ggc aca gag
atg ttt gat gat gat aaa aga cat gcg gaa gaa agg tta
tgg caa cat cat aaa act gaa ttg aga caa aga aag cca
ggt agg aaa gtc aat gaa gaa gtt att cca gaa atg tag
aga agg aag gaa tac aga aga ggc aga tat ggg aaa ata
agg aag tat aat taa aag gag ctg tga cta att tta ata
act ggg tta aaa att aag ttt tca tgt cta aat gtt ctg
gac cat gat gtc act cag gta aga tgg agg gaa ttg aga
gga att cgt tag agg gaa taa cat ggg gaa ttt ggc ttt
cag gca ttt gcc atg ata aca gaa tat tca ttt aga aat
cca gga aat tgg ttt gat gag aat gaa gtg cct gtg aag
gag gac tga agc ttg tta taa ttt cat tca ctt cag gaa
tta cag agg acc caa atg tgc taa gaa cta tga aaa cat
att aaa aga aat ggg cct gga ata att tac aac cta gta
cag tta tgg gaa aac ata ttt gca aaa aag gta tac aaa
taa tga aat aag tgt cca gta agg ata aag tgc aga gta
gaa tta agc agc acc cat tca **tgt** gtt caa att cct gcc
cta aca agg tta tga tca act aga cta act gaa aga ata