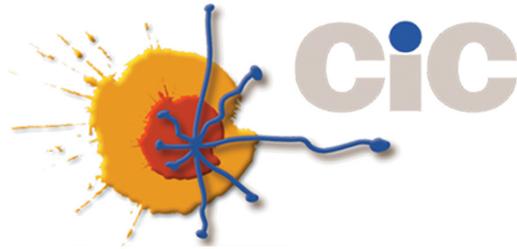




**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



**INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DEL CÁNCER /
CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN
ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS MEDIANTE aCGH
Y FISH EN SU CONTEXTO CLÍNICO-PATOLÓGICO**

ANA PASTORA OTERO MOTTA

2013

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1	EPIDEMIOLOGÍA	3
1.1	Incidencia y mortalidad.....	3
1.2	Supervivencia	5
1.3	Etiología y factores de riesgo	6
1.3.1	Factores dietéticos y del estilo de vida.....	6
1.3.1.1	Tabaco	7
1.3.1.2	<i>Helicobacter pylori</i>	7
1.3.1.3	Infección por virus del Epstein Barr (EBV).....	8
1.3.2	Condiciones precursoras	8
1.3.2.1	Gastritis crónica atrófica	9
1.3.2.2	Anemia Perniciosa.....	9
1.3.2.3	Gastrectomía parcial.....	9
1.3.2.4	Enfermedad de Ménétrier (gastropatía hipertrófica).....	9
1.3.2.5	Pólipos adenomatosos	10
1.3.2.6	Úlcera péptica.....	10
1.3.2.7	Esófago de Barrett.....	10
2	PATOLOGÍA	10
2.1	Clasificación de Lauren.....	11
2.2	Clasificación de la OMS	12
2.3	Clasificación según grado de diferenciación.....	14
3	DIAGNÓSTICO.....	14
3.1	Signos y síntomas.....	14
3.2	Estrategias de diagnóstico	15
3.3	Estadaje	15
4	FACTORES PRONÓSTICOS	16
4.1	Edad y Sexo.....	17
4.2	Estadio.....	17
4.3	Tamaño.....	17
4.4	Localización tumoral.....	18
4.5	Otros factores	18
5	TRATAMIENTO	18
5.1	Pronóstico y opciones de tratamiento.....	18
5.2	Modalidades terapéuticas	19

5.2.1	Cirugía	19
5.2.2	Quimioterapia adyuvante.....	20
5.2.2.1	Quimiorradioterapia adyuvante	21
5.2.3	Quimioterapia neoadyuvante.....	22
5.2.4	Tratamiento quimioterápico de la enfermedad avanzada metastásica	23
5.3	Quimioterapia dirigida a dianas específicas	25
6	ALTERACIONES GENÉTICAS EN ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS	27
6.1	Alteraciones genéticas	29
6.1.1	Cáncer gástrico de tipo Intestinal	33
6.1.2	Cáncer gástrico difuso	36
6.2	Impacto pronóstico de las alteraciones cromosómicas en los ADC gástricos.	38
6.3	Métodos de estudio de las alteraciones genéticas de los adenocarcinomas gástricos.....	39
6.3.1	Técnicas citogenéticas y moleculares convencionales	40
6.3.1.1	Técnicas de hibridación <i>in situ</i> fluorescente	40
6.3.1.2	Arrays genómicos.....	40
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
2.1	Hipótesis.....	45
2.2	Objetivos.....	46
2.2.1	Objetivo General	46
2.2.2	Objetivos Específicos	46
3	MATERIAL Y MÉTODOS	47
3.1	Muestras	49
3.2	Hibridación genómica comparada BAC array	50
3.2.1	Diseño del BAC-array	50
3.2.1.1	Amplificación del ADN por DOP-PCR y Aminolinking PCR	51
3.2.1.2	Depósito de los ADN de los BACs sobre un soporte sólido de vidrio con recubrimiento de amino-silano	55
3.2.2	Preparación del ADN para la hibridación (sonda)	57
3.2.2.1	Extracción y purificación del ADN	57
3.2.2.2	Marcaje del ADN	58
3.2.2.2.1	Purificación de la sonda marcada	60
3.2.3	Hibridación de las sondas sobre el BAC-array.....	60

3.2.3.1	Hibridación.....	61
3.2.3.2	Lavados post-hibridación	62
3.2.4	Adquisición de las imágenes	62
3.2.5	Análisis de los datos de los aCGH	63
3.3	Elaboración de las matrices tisulares	65
3.3.1	Selección de muestras	66
3.3.2	Protocolo para la construcción de las matrices de tejidos	66
3.4	Hibridación in situ fluorescente	68
3.4.1	FISH: Marcaje directo de sondas no comerciales mediante <i>nick translation</i>	70
3.4.2	Procedimiento FISH.....	72
3.4.2.1	Pre-hibridación	72
3.4.2.2	Hibridación.....	73
3.4.2.3	Post-hibridación	73
3.4.3	Criterios de evaluación.....	74
3.5	Inmunohistoquímica.....	75
3.5.1	Valoración de la expresión Inmunohistoquímica.....	77
3.5.1.1	HER2/neu.....	77
3.5.1.2	p53 y p21 ^{WAF1/Cip1}	79
3.5.1.3	EGFR.....	80
3.6	Análisis estadístico.....	81
4	RESULTADOS	83
4.1	Características clínico-biológicas de la serie de pacientes analizados mediante array de CGH	85
4.2	Incidencia de las alteraciones genéticas en adenocarcinoma gástrico detectados mediante BAC-arrays	87
4.3	Significado de los cambios genómicos detectados mediante aCGH en el comportamiento clínico-patológico y evolutivo de la enfermedad.....	91
4.4	Impacto de las características clínico-patológicas y de las alteraciones genéticas en la supervivencia libre de enfermedad	95
4.5	Impacto de las características clínico-patológicas y las alteraciones genéticas de la enfermedad en la supervivencia global de los pacientes	100
4.6	Validación mediante técnicas de FISH de las alteraciones genéticas detectadas por aCGH	108

4.7	Estudios de expresión de HER-2/neu, p53, p21 ^{WAF1/Cip1} , EGFR en adenocarcinoma gástrico	109
4.8	Correlación entre la expresión <i>HER2/neu</i> y <i>EGFR</i> detectadas por Inmunohistoquímica y el número de copias de ADN observadas por FISH. 112	
4.9	Comparación de la expresión proteica en tumores primarios y metástasis ganglionares.....	114
4.10	Heterogeneidad genética y vías de evolución clonal en adenocarcinoma gástrico	115
5	DISCUSIÓN.....	119
5.1	Incidencia de alteraciones cromosómicas en adenocarcinomas gástricos.....	121
5.2	Impacto de las alteraciones genéticas en el comportamiento clínico de los ADC gástricos.....	126
5.3	Impacto de las alteraciones moleculares en la supervivencia libre de recidiva y supervivencia global.....	132
5.4	Estudios de expresión de <i>HER2</i> , <i>TP53</i> , <i>P21</i> Y <i>EGFR</i> en adenocarcinomas gástricos.....	136
5.5	Heterogeneidad genética y vías de evolución clonal en los adenocarcinomas gástricos.....	143
6	CONCLUSIONES.....	145
7	BIBLIOGRAFÍA	149

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la OMS de los tumores de estómago (2010)	12
Tabla 2. Estadios TNM 7. ^a edición 2010 (UICC/AJCC).....	16
Tabla 3. Estudios randomizados que comparan esquemas de quimioterapia en cáncer gástrico avanzado	24
Tabla 4. Ensayos clínicos en curso, nuevas líneas de combinación con Trastuzumab en cáncer gástrico avanzado HER2 positivo.....	26
Tabla 5. Ensayos clínicos con nuevas dianas terapéuticas en pacientes con cáncer gástrico avanzado HER2 positivo.....	27
Tabla 6. Genes y sus alteraciones asociadas a cáncer gástrico.....	31-32
Tabla 7. Análisis comparativo de las principales ventajas y limitaciones de las técnicas de FISH y CGH	42
Tabla 8. Criterios FISH para la alteración en el número de copias de los diferentes marcadores genéticos.....	75
Tabla 9. Características técnicas de la metodología inmunohistoquímica	77
Tabla 10. Criterios de intensidad de tinción de membrana para HER2.....	78
Tabla 11. Interpretación de la tinción inmunohistoquímica de p53 y p21	79
Tabla 12. Características clínico-patológicas de los pacientes con adenocarcinoma gástrico	86
Tabla 13. Pérdidas cromosómicas en pacientes con adenocarcinoma gástrico detectadas por aCGH	89
Tabla 14. Ganancias cromosómicas en pacientes con adenocarcinoma gástrico detectadas por aCGH	90
Tabla 15. Relación entre las alteraciones genéticas detectadas mediante aCGH y las características clínico-patológicas de la enfermedad.....	92-93
Tabla 16. Características clínico-patológicas y genéticas con impacto pronóstico sobre la supervivencia libre de recaída.....	96
Tabla 17. Impacto pronóstico de las características clínico-patológicas y genéticas sobre la supervivencia global detectadas mediante aCGH en el total de la serie.....	101
Tabla 18. Impacto pronóstico de las características clínico-patológicas y genéticas sobre la supervivencia global detectadas por aCGH en pacientes con resección R0.....	107
Tabla 19. Correlación entre los resultados obtenidos por FISH y aCGH en las regiones cromosómicas más frecuentemente alteradas (6p21, 7p12, 12p12.1, 13q14, 17p13 y 20q13.2)	109
Tabla 20. Relación entre las características clínico-patológicas de la enfermedad y la expresión inmunohistoquímica de los genes <i>Tp53</i> , <i>p21</i> y <i>EGFR</i>	110
Tabla 21. Relación entre las características clínico-patológicas de la enfermedad y el estado de HER2 mediante inmunohistoquímica y FISH.....	112
Tabla 22. Correlación entre la expresión proteica y la amplificación de los genes <i>HER2/neu</i> y <i>EGFR</i> mediante técnicas de Inmunohistoquímica y FISH.....	113
Tabla 23. Concordancia en la expresión inmunohistoquímica entre el tumor primario y ganglios linfáticos metastáticos de las proteínas analizadas.....	115

Figura 1.	Incidencia de cáncer gástrico estandarizada por edad por 100.000 habitantes en 2008.....	3
Figura 2.	Mortalidad por cáncer gástrico por comunidad autónoma en 2008.	4
Figura 3.	Modelo hipotético de progresión tumoral según los cambios genéticos y epigenéticos asociados a adenocarcinomas gástricos.....	30
Figura 4.	Imagen del producto de varias Aminolinking PCR en un gel de agarosa.	54
Figura 5.	Imagen del gel de agarosa de los ADN procedentes de material fresco congelado.	58
Figura 6.	Ejemplo de una imagen adquirida tras el proceso de escaneado del BAC-array de la “librería Sanger 1Mb clone set”, hibridado con el ADN marcado de una muestra tumoral.....	63
Figura 7.	Esquema general de la construcción de un array de tejidos.....	67
Figura 8.	Conjunto de sondas de ADN de secuencia homóloga a genes, locus y centrómeros de siete cromosomas diferentes marcados en tres tipos de fluorescencia (verde, roja y aqua).....	69
Figura 9.	Esquema representativo del BAC CTD-2174F1 que localiza en la región 12p12.1 y contiene el gen <i>KRAS</i>	69
Figura 10.	Inmunohistoquímica de las diferentes intensidades en la expresión de EGFR.....	80
Figura 11.	Frecuencia de las alteraciones cromosómicas detectadas mediante aCGH en pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=138).....	88
Figura 12.	Representación esquemática de las vías de señalización alteradas en cáncer gástrico en base al análisis de los resultados obtenidos mediante array de CGH.....	94
Figura 13.	Patrones de recurrencia encontrados en 41 de 84 pacientes operados con intención curativa (R0).....	95
Figura 14.	Características clínico-patológicas y genéticas con impacto sobre la supervivencia libre de recaída en pacientes con resección R0.....	97
Figura 15.	Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con resección R0 basado en las alteraciones.....	99
Figura 16.	Supervivencia libre de recidiva en pacientes con resección R0 mediante el sistema de puntuación basado en los factores pronósticos independientes.....	100
Figura 17.	Características clínico-patológicas con impacto significativo sobre la supervivencia global.....	102

Figura 18. Alteraciones cromosómicas detectadas mediante aCGH con impacto significativo sobre la supervivencia global	103
Figura 19. Supervivencia global en los pacientes según profundidad de la invasión de la pared T3-T4 en función de 6p12.3-p11.2	104
Figura 20. Supervivencia global en Adenocarcinomas gástricos basado en las alteraciones	105
Figura 21. Estadificación pronóstica en pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=117) basada en un sistema de puntuación (score) relacionando tres factores pronósticos independientes.....	106
Figura 22. Supervivencia global en adenocarcinomas gástricos del gen <i>HER2/neu</i>	111
Figura 23. Heterogeneidad intratumoral para la expresión proteica de Her2/neu. ...	113
Figura 24. Patrones citogenéticos encontrados en la célula tumoral ancestral (n=89).	116
Figura 25. Modelo hipotético de evolución clonal:	117
Figura 26. Conjunto de núcleos interfásicos de un adenocarcinoma gástrico hibridados con tres sondas.....	118
Figura 27. Frecuencia de las alteraciones cromosómicas detectadas mediante CGH en 730 casos de adenocarcinoma gástrico.....	122
Figura 28. Ideograma de la distribución de ganancias y pérdidas de material genético detectadas por CGH en 730 adenocarcinomas gástricos	122
Figura 29. Alteraciones genéticas detectadas mediante CGH y aCGH en ADC gástricos relacionadas con las características clínico-patológicas y evolutivo de la enfermedad en 9 estudios.	127

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A

aCGH · Hibridación genómica comparada sobre microarray
ADC · Adenocarcinoma
ADN · Ácido desoxiribonucleico
AJCC · American Joint Committee on Cancer
ANC · Alteraciones de número de copia

B

BAC · Cromosoma artificial bacteriano
BAC-array · Microarray de CGH basado en una librería genómica de BAC
BSA · Albúmina sérica bovina

C

CDKI · Inhibidor de CDK (quinasa dependiente de ciclina)
CEP · Sonda centromérica
CG · Cáncer gástrico
CGH · Hibridación genómica comparada

D

dCTP · Nucleótido citosina trifosfato
dNTP · Desoxinucleótido trifosfato
DOP-PCR · PCR con cebadores de secuencia degenerada

F

FBS · Suero bovino fetal
FDR · Tasa de falsos positivos
FISH · Hibridación in situ fluorescente

I

IARC · International Agency for Research on Cancer
ICD-O-3 · Clasificación internacional de enfermedades oncológicas, versión O-3
iFISH · Hibridación in situ fluorescente sobre células en interfase
IHQ · Inmunohistoquímica

K

kb · Kilobase
KDa · Kilodalton

L

log2ratio · Ratio logaritmizado en base 2
LOH · Pérdida de heterocigosidad

M

Mb · Megabase
mCGH · Hibridación genómica comparada sobre metafases
Microarray · Microdisposición, micromatriz o microordenación de secuencias de DNA
milliQ · Agua filtrada y purificada por ósmosis inversa

N

NTA · Número total de alteraciones de número de copia

O

oligo dT · Cebador compuesto de 18 nucleótidos de timidina
OMS · Organización Mundial de la Salud

P

pb · Pares de bases
PBS · Tampón salino fosfato
PCR · Reacción en cadena de la polimerasa
PGA · Porcentaje de genoma alterado

R

RNA · Ácido ribonucleico
rpm · Revoluciones por minuto

S

SDS · Dodecil sulfato sódico
SG · Supervivencia global
SNP · Polimorfismo de nucleótido único
SNP-array · Microarray de oligonucleótidos aplicable al estudio de ANC mediante aCGH
SSC · Citrato sódico salino

T

Taq polimerasa · Polimerasa de DNA termoestable recombinante de *Thermus aquaticus*
Tm · Temperatura de "melting"
TMA · Microarray o micromatriz de tejidos

U

UICC · International Union Against Cancer
UV · Ultravioleta

 β

β ME · Beta mercaptoetanol

1 INTRODUCCIÓN

1 EPIDEMIOLOGÍA

1.1 Incidencia y mortalidad

El adenocarcinoma gástrico continúa siendo en la actualidad un importante problema sanitario a nivel mundial. Es el cuarto cáncer más frecuente en incidencia y es la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial con aproximadamente 738000 muertes en 2008¹. Las tasas de incidencia de cáncer gástrico (CG) presentan variaciones muy marcadas entre países incluso y entre regiones de un mismo país^{2,3}. Las tasas mundiales de incidencia de CG varían entre 4-15 veces (Figura 1). Las zonas más alto riesgo son Japón, China, Europa del este, Portugal y algunos países de Latinoamérica como Colombia y Chile. Por el contrario, la incidencia más baja se observa en países como USA, India, Filipinas, la mayoría de los países de Europa occidental, África y Australia.

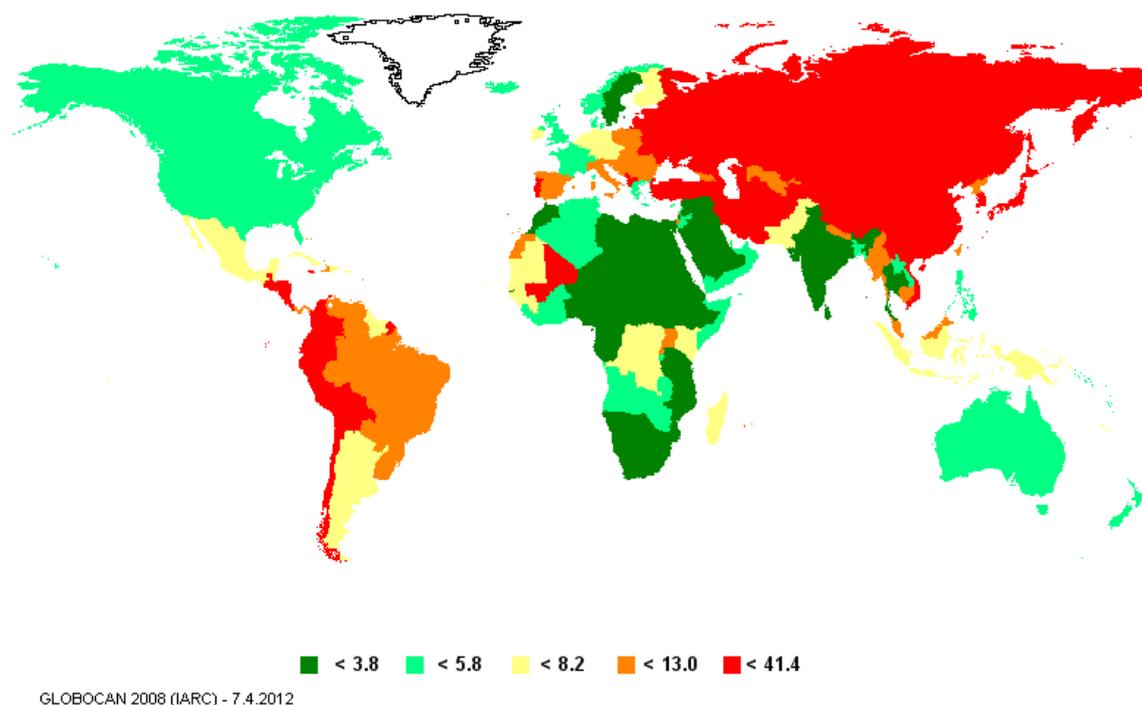


Figura 1. Incidencia de cáncer gástrico estandarizada por edad por 100.000 habitantes en 2008⁴.

En Europa, el cáncer gástrico ocupa el sexto lugar en incidencia en hombres y el quinto en mujeres. España presenta una tasa estimada para 2006 de 23.04 casos por 100.000 habitantes, algo superior a la media de la Unión Europea. Sin embargo, al analizar la mortalidad en España, este tumor se sitúa en el quinto puesto en importancia en hombres (por detrás de pulmón, colorrectal, próstata y vejiga) así como en mujeres (después del de mama,

colorrectal, pulmón y páncreas). En España, el análisis de la tendencia temporal de la mortalidad muestra un fuerte descenso desde 1975, de un 3% anual. El patrón es bastante similar en hombres y en mujeres. Según los últimos datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística (INE) el cáncer gástrico fue la causa principal de muerte en 2006 en 3533 hombres y en 2170 mujeres, lo que supone una tasa estandarizada por edad en España de 13 por 100.000 habitantes en hombres y 5.5 en mujeres⁵.

Una de las características más llamativas del CG es su variabilidad geográfica, no sólo entre diferentes países como hemos visto, sino también dentro de un mismo país. A pesar de la disminución de la mortalidad que se ha producido en las últimas décadas en prácticamente todas las provincias de España, sigue apareciendo un patrón “costa-interior” previamente descrito por López-Abente⁵. Las mayores tasas corresponden a Castilla y León y municipios de la costa de Galicia (Figura 2).

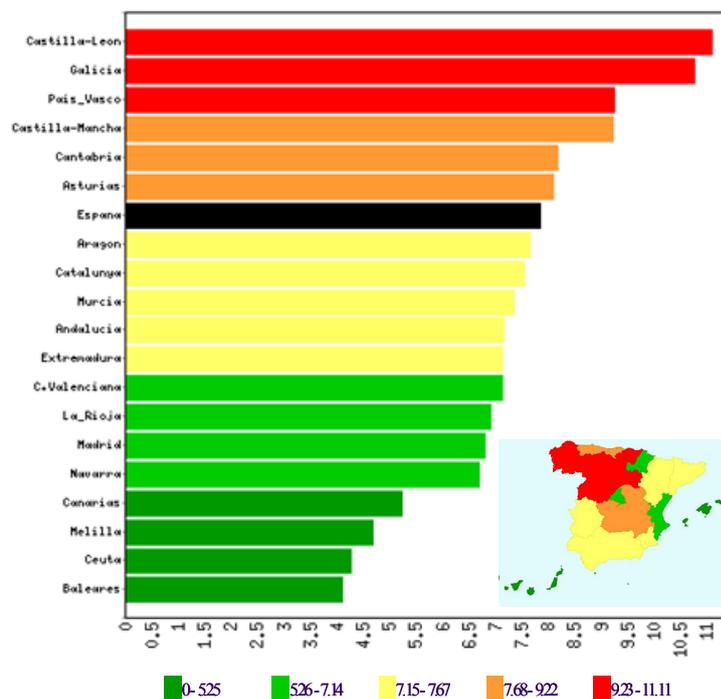


Figura 2. Mortalidad por cáncer gástrico por comunidad autónoma en 2008. Hombres, tasas ajustadas por 100.000 (población mundial). Centro Nacional de Epidemiología⁶.

A pesar del marcado descenso global en la incidencia del CG, la evolución de las tasas para las localizaciones en cardias y distal son totalmente opuestas. La incidencia del cáncer de cardias se ha mantenido estable o en algunos casos ha crecido sostenidamente en Europa y

Estados Unidos durante los últimos 30 años⁷. Por el contrario, la incidencia del CG de la porción distal ha declinado considerablemente en el mismo período^{8,9}.

A pesar de que las diferencias internacionales en la incidencia son muy pronunciadas, las variaciones con respecto al sexo son escasas, siguiendo una proporción de dos veces más frecuentes en los hombres que en las mujeres. La mayor incidencia por edad se encuentra entre los 50 y 70 años, con una incidencia máxima alrededor de los 60 años, siendo infrecuente antes de los 30 años. Durante las décadas pasadas, la mortalidad por cáncer gástrico ha disminuido notablemente en la mayor parte de áreas del mundo¹⁰.

El descenso de las tasas de incidencia y mortalidad por este tumor se suele interpretar como una consecuencia del desarrollo de los países industrializados. El nivel socioeconómico está relacionado con la exposición a distintos factores, como el tipo de dieta, las infecciones por *Helicobacter pylori*, el tabaco, y ciertas exposiciones laborales. Sin embargo, el hecho de que un país como Japón tenga unas tasas muy elevadas de cáncer de estómago indica que el nivel socioeconómico no es una variable que recoja adecuadamente todas las exposiciones de riesgo para el cáncer gástrico, y que factores culturales inherentes a los distintos estilos de vida, y muy especialmente a la dieta, pueden tener una importancia considerable. Esto ayudaría también a explicar las grandes diferencias que nos encontramos también en España entre algunas provincias. No obstante este cambio en los factores ambientales no explica por completo las variaciones geográficas conocidas ni la diferente evolución y pronóstico de la enfermedad. Aunque las tasas de incidencia de este tumor han venido disminuyendo en las últimas décadas, la cantidad absoluta de casos de cáncer gástrico va en aumento, debido al envejecimiento de la población^{3,11}.

1.2 Supervivencia

La supervivencia de los pacientes con adenocarcinoma (ADC) gástrico no ha mejorado significativamente en la última década. La probabilidad de permanecer con vida a los 5 años tras una intervención quirúrgica es solo del 10-30%^{12,13}. Para estos cálculos hay que excluir las dos situaciones especiales que constituyen el cáncer inicial (*early cancer*) (supervivencia 85-90% a los cinco años) y el cáncer gástrico en Japón (supervivencia global 70%). En general, los países con las tasas de incidencia más altas de cáncer gástrico muestran mejores tasas de supervivencia que países con tasas de incidencia inferiores¹⁴. Esta asociación es en

gran parte debido a una diferencia en tasas de supervivencia basadas en la localización tumoral. Los tumores localizados en cardias tienen un peor pronóstico comparado con aquellos tumores localizados en la parte distal. El cáncer gástrico casi siempre se diagnostica en los estadios avanzados, porque la tamización no se realiza en la mayor parte del mundo, excepto en Japón y Corea donde sí se hace y se logra hacer el diagnóstico de casos tempranos disminuyendo considerablemente la mortalidad. En contraste, en Estados Unidos y Europa donde se detectan pocos casos de cáncer gástrico en estadios tempranos la supervivencia a 5 años es baja (10-20%)^{15,16}. En Europa, la supervivencia a 5 años por cáncer de estómago en 2000-2002 fue mala en ambos sexos 25%¹⁷. La supervivencia a 5 años era ligeramente mejor en personas menores de 45 años (35%); sin embargo, el cáncer de estómago era raro en este grupo de edad. La supervivencia disminuyó lentamente con el aumento de la edad hasta los 74 años, pero cayó bruscamente en pacientes de más de 74 años (19%). En España su supervivencia sigue siendo mala, inferior al 28% a los 5 años¹⁸. La tasa global de supervivencia a 5 años en Europa es del 21%. Sin embargo, se observan grandes diferencias entre países como: Austria, Alemania, España, Francia e Italia que tienen tasas más altas (27-30%), mientras que UK, Escocia y Dinamarca las más bajas (12-15%)¹⁵.

1.3 Etiología y factores de riesgo

Se han sugerido diversos parámetros como factores de riesgo para cáncer gástrico, estableciendo complejas interacciones que en última instancia pueden conducir al desarrollo de esta enfermedad. Entre los factores de riesgo de cáncer gástrico más reconocidos encontramos aspectos dietéticos y nutricionales, predisposición genética, mutaciones esporádicas e infección por *Helicobacter pylori*^{19,20}

1.3.1 Factores dietéticos y del estilo de vida

La comida y la nutrición juegan un papel importante en la prevención y causalidad del cáncer de estómago. Recientemente *World Cancer Research Fund* (WCRF) y *American Institute for Cancer Research* (AICR) publicaron un informe denominado “Food, Nutrition, Physical Activity and the prevention of cancer”²¹. Este informe es el resultado de una revisión sistemática de la literatura sobre la dieta, actividad física y prevención del cáncer, concluyendo que el cáncer de estómago se puede prevenir mediante dietas apropiadas y

factores asociados. Después de una revisión sistemática de 722 publicaciones, un panel de expertos concluyeron:

- Hay una fuerte evidencia que la ingesta de legumbres y/o hortalizas no feculentas así como frutas reduce el riesgo de padecer CG.
- Existen fuertes evidencias que el consumo de alimentos salados y conservados en sal es una causa probable de este cáncer de estómago.
- Las evidencias referidas al consumo de legumbres, incluyendo la soja, productos de soja además de alimentos que contengan selenio son limitadas para establecer una relación de protección contra el cáncer de estómago.
- No existe evidencia científica suficiente que indique que el consumo de chile, carnes procesadas, alimentos ahumados, asados a la parrilla y barbacoas son causas de cáncer de gástrico.

1.3.1.1 Tabaco

Se reconoce la relación causal entre tabaco y CG. El tabaco contiene cantidades importantes de nitrosaminas, aminas heterocíclicas e hidrocarburos aromáticos policíclicos, entre otras muchas sustancias, algunas de las cuales han sido clasificadas por la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como cancerígenos para el ser humano. La *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition* muestra que el riesgo de CG se incrementa con la intensidad y la duración del hábito tabáquico y que los efectos son más fuertes en cardias. Este estudio concluye que el 20% de casos de CG en países europeos participantes del estudio podrían atribuirse al tabaco²².

1.3.1.2 *Helicobacter pylori*

El *Helicobacter pylori* es una bacteria gram negativa, microaerofílica, espiroidea, que coloniza primariamente la mucosa gástrica. Fue descubierta en el año 1982 por Marshall y Warren²³. La evidencia que relaciona la infección por *Helicobacter pylori* como causa de CG en humanos fue considerada como suficiente por la IARC en 1994.

La infección crónica por *Helicobacter pylori* conduce al desarrollo de una gastritis crónica, mediada por la activación de una red compleja de mediadores inflamatorios incluidos

IL-8, citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, FNT α) y péptidos inmunosupresores (IL-10)²⁴. A su vez esta inflamación crónica conduce a alteraciones en el ciclo celular favoreciendo la replicación de las células epiteliales, incrementando la tasa de apoptosis y aumentando la liberación de sustancias oxidantes. Todo esto en combinación con la depleción de las defensas antioxidantes predispone a la carcinogénesis gástrica por aumentar la probabilidad de mutaciones de ADN. La acumulación de estas mutaciones puede conducir al desarrollo de lesiones premalignas e iniciar el proceso de metaplasia, displasia y adenocarcinoma gástrico^{25,26}.

Varios estudios clínicos y epidemiológicos han observado esta asociación estimándose que menos del 1% de las infecciones por *H. pylori* pueden conducir al desarrollo del cáncer gástrico según la secuencia anteriormente expuesta²⁷, aumentado el riesgo de 2.7 a 12 veces de la población general¹⁹. De forma global el 8% de los tumores gástricos están relacionados causalmente por la infección por *H pylori*²⁸.

1.3.1.3 Infección por virus del Epstein Barr (EBV)

Descubierto por Epstein en 1964, es un herpes-virus icosaédrico que contiene una doble cadena lineal de ADN. Fue relacionado por primera vez con el cáncer gástrico en 1990 tras observar mediante PCR e hibridación in situ la presencia de su material genético en pacientes con cáncer gástrico. Su asociación ha sido encontrada en numerosos estudios de diferentes regiones geográficas^{29,30}. A diferencia del *Helicobacter pylori*, su infección ha sido observada por igual en el cáncer gástrico de tipo difuso que en el intestinal³¹.

1.3.2 Condiciones precursoras

Determinados cambios histológicos de la mucosa gástrica sana aumentan significativamente el riesgo de desarrollar un adenocarcinoma gástrico. Entre ellos cabe destacar:

1.3.2.1 Gastritis crónica atrófica

Lesión precursora que se encuentra presente en el 90% de los adenocarcinomas gástricos. En general requiere un largo periodo de evolución hasta el desarrollo del cáncer gástrico. En la mayoría de los estudios en los que el seguimiento de los pacientes fue superior a los 10 años, el riesgo de desarrollar cáncer gástrico fue de 1 por cada 150 pacientes por año, incrementándose este riesgo al 10% después de los 15 años de seguimiento³².

Su mecanismo carcinogénico parece partir de la disminución de la secreción de ácido clorhídrico y pepsina, aumentando el pH gástrico, lo que favorece la proliferación de gérmenes reductores de los nitratos de la dieta. La formación de nitrosamidas y nitrosaminas junto con algunos factores dietéticos como son la ingesta excesiva de sal o la ingesta inadecuada de vegetales y fruta fresca pueden inducir mutaciones del ADN en las células epiteliales favoreciendo la aparición y progresión de cambios tisulares como metaplasia intestinal y displasia, considerados lesiones premalignas^{25,33}.

1.3.2.2 Anemia Perniciosa

Condición que cursa con atrofia gástrica y que aumenta el riesgo de desarrollar cáncer gástrico aunque sólo el 5-10% de estos pacientes la desarrollan³⁴.

1.3.2.3 Gastrectomía parcial

Los pacientes con patología benigna sometidos a esta cirugía tienen un riesgo incrementado de desarrollar adenocarcinoma gástrico a partir de los 10 años de la intervención³⁵. Entre los 15 y 25 años tras el procedimiento el riesgo se incrementa un 50 y 70% respectivamente.

1.3.2.4 Enfermedad de Ménétrier (gastropatía hipertrófica)

El riesgo de desarrollar cáncer gástrico a partir de este cambio tisular es alto, situándose entre el 10-15% en algunas series, pero puesto que ya de por sí se trata de una condición extremadamente rara, este porcentaje de transformación resulta insignificante³⁶.

1.3.2.5 Pólipos adenomatosos

Los pólipos se encuentran con relativa frecuencia en la mucosa gástrica. Se clasifican en dos tipos:

- No neoplásicos: no presentan capacidad degenerativa (hiperplásicos, hamartomatosos, inflamatorios o heterotópicos).
- Neoplásicos: Adenomas. Constituyen el 15-20% de los pólipos encontrados en la mucosa gástrica. Poseen potencial neoplásico con una incidencia de malignización que oscila entre el 5-15% de los adenomas tubulares y el 15-75% de los adenomas vellosos. La tendencia a la malignización está directamente relacionada con el tamaño del pólipo y con la presencia o grado de displasia³⁷.

1.3.2.6 Úlcera péptica

La posibilidad de transformación de una úlcera péptica benigna en maligna está todavía en discusión, existiendo opiniones discordantes al respecto. Aunque la mayoría de los autores niegan esta posibilidad, se debe tener en cuenta el papel que parece desarrollar la infección por *Helicobacter pylori* en el proceso de la carcinogénesis gástrica³⁸.

1.3.2.7 Esófago de Barrett

El aumento de la incidencia del adenocarcinoma gástrico cardial en los países industrializados parece estrechamente relacionado con el aumento de la incidencia de la enfermedad por reflujo gastro-esofágico y del esófago de Barrett³⁹. Todavía son necesarios estudios más amplios para determinar otros factores que intervengan en su desarrollo y de esta manera poder establecer si realmente el cáncer gástrico proximal es una entidad con diferente etiopatogenia y evolución que el distal.

2 PATOLOGÍA

La mayoría de las lesiones malignas de estómago son de origen epitelial y pueden ser clasificadas como adenocarcinomas (90%). Otros tipos menos frecuentes son el linfoma (4%)

y los leiomiomas, mientras que el rhabdomioma y los tumores carcinoides ocurren con muy baja frecuencia. A pesar de la variedad de neoplasias que puedan afectar al estómago, hablaremos de CG para referirnos específicamente al adenocarcinoma gástrico.

El adenocarcinoma gástrico ha sido clasificado de diferentes maneras y por diversos autores en general de acuerdo a los rasgos macroscópicos (Borrmann) o en base a sus características morfológicas (Ming, Carneiro y Goseki)³⁵. Los sistemas de clasificación usados con mayor frecuencia son: Lauren y la Organización Mundial de la Salud (OMS).

2.1 Clasificación de Lauren

Lauren ideó en 1965 una clasificación histológica de clara importancia epidemiológica, etiológica, patológica y de pronóstico. Este sistema describe los tumores básicamente de acuerdo al aspecto microscópico y el patrón de crecimiento. En dicha clasificación se incluyen dos categorías: intestinal y difusa⁴⁰.

El tipo intestinal se caracteriza por la presencia de formaciones glandulares y células epiteliales que recuerdan a las células intestinales, tienden a crecer formando nódulos con amplios frentes cohesivos. y produce lesiones que son frecuentemente ulcerativas. Es más frecuente en hombres y en personas mayores, es predominante en áreas donde el CG es epidémico, y presenta generalmente un período precanceroso prolongado. Este tipo de tumor representa un 70% de los casos de CG en poblaciones de alto riesgo. Habitualmente este tipo de tumor se localiza en el antro.

El tipo difuso está caracterizado por nidos de células sin estructura glandular, son carcinomas mal diferenciados, que infiltran la pared gástrica en sábana, por cordones o pequeños nidos de células malignas individuales. Son más agresivos que los anteriores. Su frecuencia es similar en todos los países, por lo que se considera “endémico”. La forma difusa o infiltrativa es hallada predominantemente en mujeres y en personas más jóvenes, con peor pronóstico y, aunque no se precede de lesiones precursoras, parece tener cierta susceptibilidad genética o familiar. En este grupo se incluyen los adenocarcinomas de células en anillo de sello. Se habla de tipo indeterminado cuando no es posible tipificar la neoplasia en ninguno de estos tipos por sus características intermedias.

2.2 Clasificación de la OMS

El sistema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se viene utilizando desde 1977, es relativamente simple y ha obtenido una amplia aceptación. Este sistema clasifica los tumores sólo por su aspecto histológico. En la tabla 1 se detallan todos los tipos histológicos incluidos en la última edición de esta clasificación⁴¹.

Tabla 1. Clasificación de la OMS de los tumores de estómago (2010).

Tumores Epiteliales	Carcinoma neuroendocrino (CNE)
<i>Lesiones premalignas</i>	CNE de células pequeñas
Adenoma	CNE de células grandes
Neoplasia intraepitelial (displasia) de bajo grado	Carcinoma mixto adeno-neuroendocrino
Neoplasia intraepitelial (displasia) de alto grado	TNE de células enterocromafin, productor de serotonina
	TNE productor de gastrina (gastrinoma)
<i>Carcinoma</i>	
Adenocarcinoma	Tumores mesenquimales
Adenocarcinoma papilar	Tumor glómico
Adenocarcinoma tubular	Tumor de células granulares
Adenocarcinoma mucinoso	Leiomioma
Adenocarcinoma pobremente cohesivo (incluye carcinoma de células en anillo de sello y otras variantes)	Fibromixoma plexiforme
Adenocarcinoma mixto	Schwannoma
Carcinoma adenoescamoso	Tumor miofibroblástico inflamatorio
Carcinoma con estroma linfoide (carcinoma medular)	
Adenocarcinoma hepatoide	Tumor estromal gastrointestinal
Carcinoma de células escamosas	Sarcoma de Kaposi
Carcinoma indiferenciado	Leiomiosarcoma
	Sarcoma Sinovial
<i>Neoplasias neuroendocrinas</i>	
Tumor neuroendocrino (TNE)	Linfomas
TNE G1 (carcinoide)	
TNE G2	Tumores Secundarios

A pesar de su variabilidad histológica importante, en la mayoría de los tumores predomina uno de cuatro patrones principales, siendo el diagnóstico realizado en base a este patrón histológico predominante. Estos cuatro patrones principales serían:

Adenocarcinoma Tubular: contiene túbulos dilatados de manera prominente que varían en su diámetro pudiendo presentar estructuras acinares. Las células tumorales pueden ser columnares, cuboideas o aplanadas por mucina intraluminal. Pueden detectarse también células claras.

Adenocarcinoma Papilar: son tumores exofíticos bien diferenciados con procesos papilares/digitales alargados y recubiertos de células cilíndricas o cuboideas unidas a una matriz de tejido conectivo fibrovascular. Algunos de estos tumores pueden mostrar diferenciación tubular o, más raramente, una arquitectura micropapilar. Característicamente el borde tumoral suele estar delimitado de las estructuras adyacentes y el propio tumor puede estar infiltrado de manera aguda o crónica por células inflamatorias.

Adenocarcinoma Mucinoso: también denominados carcinomas coloides. Por definición el 50% de estos tumores contienen lagos de mucina extracelular. Dos tipos de crecimiento fundamental pueden verse: glándulas delimitadas por un epitelio columnar secretor de mucina, o cadenas o acúmulos de células flotando en lagos de mucina. Ocasionalmente pueden verse células en anillo de sello que no son predominantes en la muestra.

Carcinomas en células en anillo de sello: más del 50% del tumor está formado por células aisladas o pequeños grupos de células que contienen mucina intracitoplasmática. Estas células tumorales pueden tener 5 morfologías diferentes:

- a. Núcleo desplazado hacia la membrana celular provocando la clásica apariencia en anillo de sello debido a un citoplasma globoide y ópticamente claro. Este citoplasma contiene mucina ácida que se tiñe con Azul Alcian a un pH 2.5.
- b. Células tumorales con núcleo central que asemejan histiocitos con escasa o nula actividad mitótica.
- c. Células pequeñas profundamente eosinofílicas con pequeños pero prominentes citoplasmas granulares que contienen mucina neutra.
- d. Células pequeñas con escasa o sin mucina
- e. Células anaplásicas con escasa o nula presencia de mucina.

Estos cinco tipos celulares se entremezclan unos con otros en diversas proporciones en el seno del tumor. Asimismo los tumores de células en anillo de sello pueden presentar un patrón glandular trabecular junto a zonas de infiltración sólida y difusa. Los carcinomas de células en anillo de sello son por definición infiltrantes, con una relativamente pequeña

proporción de células malignas y abundante desmoplasia. Diversas tinciones pueden ayudar en su diagnóstico como son las de PAS, Muci-Carmina o Azul Alcian. Asimismo las técnicas inmunohistoquímicas basadas en anticuerpos anticitoqueratinas permiten identificar células tumorales aisladas y diseminadas de manera irregular en el estroma tumoral, consiguiendo detectar un mayor porcentaje de células malignas que las tinciones de mucina clásicas.

2.3 Clasificación según grado de diferenciación

La clasificación de los adenocarcinomas gástricos de acuerdo a su grado de diferenciación glandular en:

G1: tumor bien diferenciado (más del 95% del tumor esta compuesto por glándulas).

G2: tumor moderadamente diferenciado (50-95% del tumor compuesto por glándulas).

G3: tumor pobremente diferenciado (49% o menos del tumor compuesto por glándulas).

G4: tumor indiferenciado.

El adenocarcinoma tubular no es clasificado, pero es de bajo grado y corresponde al grado 1. Los carcinomas de anillo de sello son de alto grado y corresponde al grado 3. Carcinomas de células pequeñas y carcinomas indiferenciados son de alto grado y corresponden al grado 4.

3 DIAGNÓSTICO

3.1 Signos y síntomas

Los signos y síntomas del CG son muy variables, inespecíficos y de aparición tardía; dependen de su estadio clínico y su localización. Los síntomas más comunes son dolor abdominal (50-55%), disfagia (12-38%), náuseas (16-26%) y pérdida de peso (40%).

Los estudios observacionales indican que la mayoría de los pacientes con cáncer gástrico precoz refieren síntomas de tipo dispéptico (dolor epigástrico leve, recurrente, pirosis, con distensión abdominal o sin ella, náuseas o vómitos) y no presentan síntomas de alarma (anemia, disfagia, pérdida de peso), los cuales son indistinguibles de los sujetos con afecciones benignas. En la mayoría de los cánceres gástricos avanzados se presentan síntomas

de alarma, como dolor abdominal recurrente, anemia, pérdida de peso, vómitos y anorexia, y según la situación del tumor, disfagia o síndrome pilórico. Hay signos indicativos de enfermedad incurable, como el ganglio de Virchow, el signo de Blumberg, el ganglio de Irish, la ascitis, el signo de la hermana de Mary Joseph y tumor de Krukemberg (ovario) los cuales contraindican el tratamiento quirúrgico con intención curativa.

3.2 Estrategias de diagnóstico

Una vez realizado el diagnóstico de sospecha clínica, es necesario realizar el diagnóstico histológico y el de extensión.

La realización de Endoscopia, técnica diagnóstica de elección, junto con la toma de biopsia permitirá llegar al diagnóstico histológico. Una vez confirmado el mismo se debe llevar a cabo un estudio sistemático para precisar la posible diseminación metastásica. Este se puede realizar mediante tomografía axial computarizada (TAC) torácico abdominal o Rayos X de tórax y Ecografía abdominal para descartar metástasis pulmonares y hepáticas. En ocasiones, en pacientes con sospecha de tumor localmente avanzado, puede indicarse la realización de laparoscopia para la estadificación, evitando la realización de una laparotomía que no es curativa ni paliativa.

3.3 Estadiaje

Una estadificación precisa es imprescindible para acceder a una información pronóstica fiable y establecer unas recomendaciones terapéuticas comunes en los tumores que presentan características similares. El sistema más utilizado en Occidente es el TNM propuesto por la *International Union Against Cancer* (UICC) y la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). Esta clasificación categoriza los adenocarcinomas gástricos en cuatro estadios (I, II, III, IV) de acuerdo a la extensión del tumor primario (T), la existencia de metástasis ganglionares y su número (N) y la presencia o no de metástasis a distancia (M).

En la clasificación TNM 7.^a edición 2010⁴² se han producido una serie de modificaciones de las diferentes categorías en cada una de las definiciones para tumor

primario, ganglios regionales y metástasis a distancia, así como en su agrupación por estadios. (Tabla 2).

Las categorías T se modificó para corresponder a las del resto del tubo digestivo (esófago, intestino delgado, colon y recto), la categoría N presenta importantes cambios (Tabla 2) esta nueva forma de clasificar permite definir la afectación ganglionar de la misma forma que en el cáncer de esófago. No obstante, a diferencia del cáncer de esófago, en el gástrico la categoría N3 se subdivide en 3a y 3b. Otro aspecto a tener presente es que la citología peritoneal positiva, ha pasado a ser considerada como M1.

Tabla 2. Estadios TNM 7.ª edición 2010 (UICC/AJCC).

			M0					M1
			N0	N1	N2	N3a	N3b	
Profundidad			Nº ganglios afectados	0	1-2	3-6	7-15	>16
			M0	T1	Mucosa, submucosa	IA	IB	IIA
T2	Muscular propia	IB		IIA	IIB	IIIA		
T3	Submucosa	IIA		IIB	IIIA	IIIB		
T4a	Serosa	IIB		IIIA	IIIB	IIIC		
T4b	Estructuras adyacentes	IIIB		IIIB				
M1			IV					

4 FACTORES PRONÓSTICOS

Entre los factores pronósticos convencionales que han sido evaluados en el cáncer gástrico, se encuentran la edad y sexo de los pacientes, la localización tumoral, configuración macroscópica del tumor, estadio tumoral, tipo y grado histológico. El estadio tumoral, de acuerdo con la clasificación TNM, es el factor pronóstico más importante en los carcinomas gástricos resecables. La localización tumoral en cardias y en muñón gástrico de pacientes que fueron sometidos a gastrectomía parcial por enfermedad ulcerosa, también está asociada con un peor pronóstico. En general, la mayoría de los estudios indican que la configuración macroscópica del crecimiento de tipo linitis plástica (clasificación de Borrmann), el grado histológico indiferenciado, el tipo histológico difuso (criterio de Lauren), así como aspectos

histopatológicos tales como la invasión vascular, perineural o linfática, se asocian con un peor pronóstico del cáncer gástrico resecable.

4.1 Edad y Sexo

Ni la edad ni el sexo han demostrado de manera definitiva ser un factor pronóstico de importancia para la mortalidad en la enfermedad recidivante o metastásica⁴³⁻⁴⁵. Dos pequeños estudios retrospectivos identificaron la edad como una variable pronóstica significativa^{46,47} sin embargo, en otro estudio, la influencia de la edad no fue un factor pronóstico independiente⁴⁵. Este estudio determinó que la supervivencia fue determinada por el estadio y la resección completa.

4.2 Estadio

La profundidad de invasión tumoral y la afectación ganglionar son los factores pronósticos independientes más importantes en el carcinoma gástrico⁴⁸ y se confirman en el análisis retrospectivo de series amplias de tratamiento^{49,50}. El estadio ha mostrado ser de importancia pronóstica tanto para supervivencia a 5 años y en tasas de recurrencia local^{43,46,51,52}. Siewert *et al*⁴³, en un estudio prospectivo multicéntrico, encontró que una ratio ganglionar mayor de 20% fue el único factor pronóstico independiente más importante, seguido por el estado de tumor residual y la categoría T.

4.3 Tamaño

El tamaño del tumor primario ha sido identificado en varios estudios retrospectivos como factor pronóstico importante^{13,46,52}. Estos estudios sugieren que el incremento del diámetro del tumor está asociado con metástasis ganglionares y supervivencia a 5 años. Esto fue confirmado en un estudio randomizado que demostró que el tamaño del tumor puede ser un factor independiente en un análisis multivariante ($p= 0.0002$; IC 1.3-2.2) en pacientes con márgenes libres de tumor⁴³.

4.4 Localización tumoral

La localización del tumor tiene varias implicaciones importantes en el tratamiento y el pronóstico del cáncer gástrico. Aunque haya estudios que no han mostrado ninguna asociación entre la localización y el pronóstico^{44,46,47,53}, varios estudios han mostrado que el carcinoma del tercio proximal del estómago representa una entidad clínica distinta con implicaciones pronósticas^{13,46,52,54-56}.

4.5 Otros factores

En las últimas décadas diversos estudios han destacado el papel que las alteraciones genéticas tienen en el desarrollo y progresión del cáncer gástrico⁵⁷. El conocimiento de la patología molecular de esta neoplasia nos permite entender mejor la patogenia de la enfermedad y obtener marcadores pronósticos moleculares, algunos de los cuales tienen asimismo valor predictivo cuando se administra un tratamiento sistémico⁵⁸. Marcadores tumorales (*p53*, *E-cadherina*, *CD-34*, *c-erbB2*, *EGFR*, *VEGFR*) recientemente han ganado interés como indicadores pronósticos potenciales para predecir el comportamiento del tumor⁵⁹⁻⁶⁵.

5 TRATAMIENTO

5.1 Pronóstico y opciones de tratamiento

Además del tratamiento endoscópico para una minoría de tumores muy pequeños, la gastrectomía parcial o completa con linfadenectomía es el único tratamiento potencialmente curativo para el cáncer gástrico. Los tumores M0 en estadio I a III son principalmente resecables⁶⁶. Pero, aunque la cirugía conlleva una tasa de curación alta para los cánceres en estadio IA y IB, los resultados para los cánceres en estadio IIIA y IIIB son deficientes. Muchos pacientes con enfermedad avanzada, especialmente en estadios IIIA/B son técnicamente inoperables. En estos pacientes, la quimioterapia neoadyuvante y la radioterapia se encuentran bajo evaluación clínica. Lamentablemente, incluso después de una gastrectomía aparentemente “curativa”, las tasas de recidiva en los estudios prospectivos oscilan entre el 40% y el 60%^{66,67}. En el mundo occidental, se diagnostica a la mayoría de los pacientes en un

estadio avanzado, cuando el tumor es inoperable. Los pacientes con tumores inoperables, recurrentes o metastásicos tienen un pronóstico desalentador, con una media del tiempo de supervivencia de tres a cinco meses sin quimioterapia. Varios ensayos aleatorios pequeños proporcionaron pruebas sobre la mejora de la supervivencia en estos pacientes al aplicar quimioterapia sistémica^{68,69}.

5.2 Modalidades terapéuticas

5.2.1 Cirugía

Actualmente, la cirugía es la única alternativa terapéutica que ofrece posibilidades de curación del cáncer gástrico. Esto se observa en algunos estudios, donde la resección que conlleva la extirpación tumoral completa macroscópica y microscópica se comporta como un factor pronóstico favorable independiente⁴³.

La indicación quirúrgica ante un tumor de estómago depende de varios factores. En primer lugar, sobre la extensión del tumor además el tipo histológico de Lauren y el aspecto macroscópico se tienen en cuenta para tomar una decisión terapéutica. Los tipos de gastrectomía que se realizan son fundamentalmente cuatro: subtotal, total, proximal subtotal y gastrectomía ampliada.

La gastrectomía total es el procedimiento recomendado en el caso de lesiones localizadas en el estómago proximal, en el tercio medio del mismo o en aquellos casos de tipo difuso según la clasificación de Lauren. En aquellos casos en que el tumor está localizado a nivel del estómago distal, la realización de una gastrectomía total no ha demostrado aportar ningún beneficio frente a la realización de gastrectomías subtotales^{70,71}.

La disección ganglionar se define como D0 (disección nula o incompleta de los grupos ganglionares del nivel 1), D1 (disección completa de los grupos del nivel 1 pero no del nivel 2), D2 (disección completa de los grupos de los niveles 1 y 2 pero no del nivel 3) y D3 (disección de todos los ganglios de los niveles 1, 2 y 3). Hasta ahora, la definición de estos niveles se hacía en función de la localización del tumor primario, resultando en un sistema complejo y difícil de recordar. Por ello, la *Japanese Gastric Cancer Association* ha establecido una nueva definición de los diferentes tipos de linfadenectomías (D) que permite

un manejo más sencillo y que puede ser utilizado de forma más amplia⁷². La Japanese Classification 2010 elimina la localización del tumor primario para definir los diferentes niveles ganglionares y establece como nuevo criterio el tipo de gastrectomía (total, distal subtotal, distal con preservación pilórica o proximal). Otra novedad es la eliminación del concepto de linfadenectomía D3, como resultado del ensayo en que se demostraba que la linfadenectomía paraaórtica aumentaba la morbilidad sin mejorar la supervivencia respecto a la disección D2 (JCOG 9501)^{73,74}. No obstante, en los casos en que la disección incluya los grupos 13,14v y/o 16, se permite recoger la información como linfadenectomía D2+. En los tumores gástricos que invaden el esófago debe añadirse el grupo 110 a la linfadenectomía D1 y los grupos 19, 20, 110 y 111 a la linfadenectomía D2.

En todos los casos se recomienda la realización del análisis patológico microscópico de los márgenes de resección. En aquellos tumores con lesiones de patrón infiltrativo se debe lograr un margen quirúrgico proximal libre de tumor de 5cm, pudiéndose reducir este margen a 2 cm en los casos expansivos. A nivel distal el píloro parece actuar como una barrera natural y la infiltración del margen quirúrgico distal es excepcional, considerándose suficiente un margen de 2 a 3 cm.

5.2.2 Quimioterapia adyuvante

La necesidad de un tratamiento sistémico postoperatorio viene fundamentada en la estrecha relación entre la supervivencia de los pacientes y su estadio al diagnóstico. Es un tumor agresivo que se presenta en el 65% de los casos en forma avanzada (T3 o T4) y en 85% con ganglios comprometidos. La supervivencia global a 5 años de los pacientes con enfermedad reseçada es de 30% y en enfermedad avanzada la supervivencia media sin tratamiento es de 5.4 meses⁷⁵. Los esfuerzos para mejorar las tasas de supervivencia han conducido a numerosos ensayos de tratamiento adyuvante y neoadyuvante (descritos más adelante), a partir de la década de 1970.

Desde finales de 1970 se inició el uso de quimioterapia en cáncer gástrico. Tras el comienzo de la monoterapia con 5-fluoracilo (5-FU), se han ido utilizando una serie de agentes que conseguían al menos un 10% de respuesta objetiva en cáncer gástrico avanzado. Estos agentes, aparte del 5-FU fueron Mitomicina C, doxorubicina, epirrubicina, metrotexate,

etopoxido y cisplatino. Más recientemente, otros han mostrado su eficacia como monoterapia especialmente oxiplatino, paclitaxel, docetaxel e irinotecan. Dados los índices de respuesta limitados a la monoterapia, las combinaciones de quimioterápicos se perfilaban como una buena estrategia para cáncer gástrico avanzado, para mejorar la respuesta de los pacientes y su supervivencia. La primera combinación de quimioterápicos se denominó FAM (5-FU, doxorubicina y Mitomicina-C) publicado en 1980⁷⁶

Hasta 2002 se publicaron 6 metaanálisis⁷⁷⁻⁸² evaluando el beneficio de la quimioterapia adyuvante, y a raíz de los cuales se evidenció un modesto pero estadísticamente significativo beneficio en la supervivencia de aquellos pacientes que reciben tratamiento postoperatorio. Asimismo este beneficio parece ser mayor, pero no exclusivo, en los pacientes con afectación ganglionar, pero existe el problema de que se compararon diferentes regímenes de quimioterapia, principalmente basados en 5-fluoracilo, lo cual dificulta realizar una recomendación sobre un régimen en particular.

Al contrario de lo ocurrido con los estudios europeos de quimioterapia adyuvante un estudio japonés⁸³ en fase III con 1059 pacientes con cáncer gástrico reseado con disección D2, en estadios II y II, ha logrado un impacto positivo en la supervivencia con el uso de un derivado fluoropirimidínico de 4^a generación: S1. Los pacientes fueron randomizados a cirugía sola versus cirugía seguida de S-1 en monoterapia durante 1 año. Los datos finales mostraron un incremento significativo en la supervivencia global a los 3 años a favor del grupo que recibía S-1 (80% vs 70% HR 0.68 IC 95% 0.52 - 0.87, con p=0.003). Además el cumplimiento terapéutico (65.8%) fue notablemente superior a lo publicado en anteriores estudios, por lo que los autores recomiendan el empleo de S-1 como terapia adyuvante tras resección curativa de un neoplasia gástrica mediante linfadenectomía D2.

5.2.2.1 Quimiorradioterapia adyuvante

En el año 2001 el *Southwest Oncology Group* (SWOG) publicó los resultados de su estudio INT 0116⁶⁶. En este ensayo clínico 556 pacientes sometidos a una resección potencialmente curativa de su neoplasia gástrica. El régimen adyuvante incluyó quimioterapia administrada antes y después de la radioterapia. La radiación se administró en el lecho tumoral, los ganglios linfáticos regionales y 2 cm más allá de los márgenes proximal y distal

de la resección (45 Gy en 25 fracciones). Después de un seguimiento medio de 5 años, la duración media de la supervivencia del grupo con quimiorradiación fue de 36 meses, frente a 27 meses en el grupo con cirugía sola ($p=0.005$); con toxicidad de grado 3 y 4 hematológica en el 41% y gastrointestinal, en el 32% de los pacientes, y muertes tóxicas en el 1%.

Este esquema es considerado estándar en Estados Unidos, pero su aceptación mundial es menor, pues se realizó vaciamiento D2 en el 10%, D1 en el 36% y menos del 54% en D1 a los pacientes, por lo cual quedó a consideración que la quimiorradioterapia tuvo un efecto compensador sobre la linfadenectomía insuficiente, considerando que los menos beneficiados de la intervención fueron los pacientes con D2, y que en estudios con cirugía sola y vaciamiento D2 se publican tasas de supervivencia similares, sin manejo adyuvante.

Posteriormente un estudio retrospectivo sugiere el beneficio de la quimiorradioterapia adyuvante comparada con el control en pacientes con vaciamiento D2 que incluía 544 pacientes tratados mediante linfadenectomía D2 seguida de quimiorradioterapia con 5-FU y Leucovorin. Los resultados de este grupo se comparaban con los de 446 pacientes tratados sólo con cirugía. La administración de tratamiento quimiorradioterápico adyuvante demostró lograr un aumento en la supervivencia global mediana de 95 meses *vs* 62 meses; $p=0.02$), así como en la supervivencia libre de enfermedad (75 meses *vs* 52 meses $p = 0.016$)⁸⁴.

5.2.3 Quimioterapia neoadyuvante

El tratamiento neoadyuvante (preoperatorio) ha demostrado conseguir la reducción del tumor primario permitiendo resecciones potencialmente curativas en casos inicialmente de resecabilidad dudosa, sin comprometer por ello la supervivencia a largo plazo del paciente. Cuando la enfermedad es metastásica, y a pesar de que la quimioterapia ha demostrado mejorar la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes, el tratamiento debe considerarse como paliativo.

Se han publicado múltiples estudios en fase II no randomizados de quimioterapia neoadyuvante en pacientes con cáncer gástrico operable, no evidenciándose un aumento en la morbimortalidad perioperatoria y lográndose tasas de resecciones R0 entre el 72% y el 87%^{85,86}. En el año 2006 fue publicado el ensayo MAGIC⁸⁷ es un estudio fase III de pacientes

con adenocarcinomas resecables de estómago (75%), esófago distal (15%) y unión gastroesofágica (10%), donde la quimioterapia perioperatoria con esquema ECF (Epirubicina, Cisplatino, 5Fu) comparada con la cirugía sola, mejora la supervivencia global a 5 años (36% vs 23%) (HR 0.75; IC 95% 0.6 - 0.93; p= 0.009), como de la supervivencia libre de enfermedad (30% vs 18%) (HR 0.66; IC 95% 0.53 - 0.81; p= 0.001). Asimismo la tasa de resecciones consideradas curativas (R0) fueron superiores en el grupo que recibió tratamiento preoperatorio (79.3% vs 70% p= 0.03), sin evidenciarse ningún incremento en la morbimortalidad perioperatoria. Al año siguiente el FFCD 9703⁸⁸ es un estudio fase III de pacientes con adenocarcinomas gástrico y de esófago distal resecables; en los que los pacientes recibían 3 ciclos de Cisplatino y 5-FU de manera preoperatoria frente al tratamiento quirúrgico solamente. Al igual que en el estudio MAGIC, la administración de quimioterapia preoperatoria logró un aumento significativo en la supervivencia global a 5 años (38% vs 24%, HR 0.69 IC 95% 0.5-0.95 p=0.02). Con base en esta evidencia, las guías de manejo *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) y *European Society for Medical Oncology* (ESMO) recomiendan el esquema MAGIC y FFCD perioperatorio en pacientes con cáncer gástrico resecable^{89,90}

5.2.4 Tratamiento quimioterápico de la enfermedad avanzada metastásica

El tratamiento quimioterápico de los carcinomas gástricos metastáticos debe considerarse aun hoy en día como un tratamiento paliativo. A pesar de los diferentes esquemas terapéuticos empleados en los ensayos llevados a cabo en los últimos 30 años la supervivencia global de los pacientes sigue siendo pobre. En la tabla 3 se muestra un resumen de los estudios randomizados con diferentes esquemas de quimioterapia.

Entre los taxanos solo Docetaxel ha sido evaluado en el contexto de un ensayo clínico randomizado fase III. Este fue el ensayo V-325⁹¹, en el cual 445 pacientes fueron randomizados a recibir Docetaxel, Cisplatino y 5-FU (DCF) vs Cisplatino y 5-FU (CF). La adición de Docetaxel al esquema estándar CF logró una mejoría estadísticamente significativa en la supervivencia global de los pacientes (9.2 meses vs 8.6 meses p=0.02), así como en el intervalo libre de progresión (5.6 meses vs 37 meses p < 0.001) y en la tasa de respuestas objetivas (37% vs 25% con CF p=0.01). Asimismo, el esquema DCF mostró una mejoría en la

calidad de vida, pero a expensas de una mayor toxicidad, principalmente por neutropenia grado 3-4 del 82% vs 57%, y neutropenia febril del 29% vs 12%.

Tabla 3. Estudios randomizados que comparan esquemas de quimioterapia en cáncer gástrico avanzado.

Estudio	Tratamiento	n	R (%)	Tiempo de progresión mediana (meses)	Supervivencia mediana (meses)	p
Van Cutsem et al (V325) ⁹¹	C5-FU	224	25	3.7	8.6	0.02
	DC5-FU	221	37	5.6	9.2	
Dank et al (V306) ⁹²	C5-FU	163	26	4.2	8.7	NS
	I5-FU	170	32	5.0	9.0	
Kang et al (ML17302) ⁹³	C5-FU	137	29	5.0	9.3	NS
	CX	139	41	5.6	10.5	
Cunningham et al (REAL-2) ⁹⁴	EC5-FU	263	41	6.2	9.9	NS
	EO5-FU	245	42	6.5	9.3	
	ECX	250	46	6.7	9.9	
	EOX	244	48	7.0	11.2	
Boku et al (JCOG9912) ⁹⁵	5-FU	234	9	2.9	10.8	NS
	CI	236	38	4.8	12.3	
	S-1	234	28	4.2	11.4	
Kiozumi et al (SPIRITS) ⁹⁶	S-1	150	31	4.0	11.0	NS
	CS-1	148	54	6.0	13.0	

C: Cisplatino; D: Docetaxel; E: Epirrubicina; 5-FU: 5-fluoracilo; I: Irinotecan; O: Oxaliplatino; X: Capecitabina
R: Respuesta.

El ensayo REAL 2 es un estudio fase III randomizado con un diseño factorial 2x2 en el cual se distribuyeron los pacientes entre 4 grupos de tratamiento: ECF (Epirrubicina, Cisplatino, 5FU), EOF (Epirrubicina, Cisplatino, 5-FU), EOX (Epirrubicina, Oxaliplatino, Capecitabina) o ECX (Epirrubicina, cisplatino, Capecitabina). El estudio fue diseñado para demostrar la no inferioridad del oxaliplatino vs cisplatino, y la capecitavina vs 5-FU cuando se utilizan para el tratamiento del cáncer gástrico avanzado en un esquema con tres fármacos. Tras la inclusión de más de 1000 pacientes los resultados mostraron la no inferioridad de Capecitabina frente a 5-FU y de Oxaliplatino frente a Cisplatino. No se demostraron diferencias significativas en la tasa de respuestas entre los cuatro esquemas empleados; aunque sí una diferencia estadísticamente significativa a favor de EOX comparado con ECF en términos de supervivencia global (mediana 11.2 meses EOX vs 9.9 meses ECF p=0.02)⁹⁴. Este ensayo junto al publicado por Kang *et al*⁹³ demostró la equivalencia de 5-FU y Capecitabina cuando se administran en combinación con derivados del platino.

SPIRITS es un estudio fase III con pacientes, donde se evidenció que la combinación de cisplatino y S1 comparado a S1 mejoró la supervivencia global media 13 vs 11 meses así como el intervalo libre de progresión mediana 6 vs 4 meses y tasas de respuesta objetivas (54% vs 31%).

5.3 Quimioterapia dirigida a dianas específicas

El único ensayo clínico randomizado fase III comparando el tratamiento con un esquema quimioterápico estándar como Cisplatino/5-Fluoracilo ó Cisplatino/Capecitabina vs la combinación de quimioterapia y un agente dirigido frente a HER2 es el denominado ensayo ToGA (Trastuzumab on Gastric Cancer)⁹⁷.

Este estudio fue llevado a cabo de manera multicéntrica en 24 países de Asia, Sudáfrica, Australia, Europa, Centroamérica y América del Sur. En este ensayo se incluyeron pacientes con sobreexpresión 3+ de Her2 medida por IHQ o con amplificación de *HER2* determinada por FISH, ratio ≥ 2 . Tras realizar el cribado mediante IHQ y FISH a 3807 posibles candidatos, de los cuales 810 presentaron sobreexpresión del receptor o amplificación del gen *HER2*, se incluyeron en el estudio 594 pacientes. Éstos fueron randomizados a recibir Cisplatino y 5-FU o Cisplatino y Capecitabina (a criterio del investigador) ó el mismo esquema quimioterápico más Trastuzumab (dosis de carga 8mgr/Kg, seguido de 6mgr/Kg), todo ello administrado cada 3 semanas. El objetivo principal del estudio era encontrar una diferencia significativa en la supervivencia global de los pacientes a favor de la rama experimental con Trastuzumab y, entre los objetivos secundarios, un aumento en la tasa de respuestas objetivas al tratamiento y en el intervalo libre de progresión tumoral.

El resultado principal del estudio fue alcanzado, logrando la adición de Trastuzumab al tratamiento quimioterápico estándar un incremento en la supervivencia global de 2.7 meses (de 11.1 en la rama control a 13.8 en la rama experimental con Trastuzumab), lo que se corresponde con un Hazard Ratio (HR) de 0.74 (IC 95% 0.60-0.91, p=0.0046). De igual manera, se cumplieron los objetivos secundarios del estudio aumentando el tiempo libre de progresión tumoral de 5.5 meses a 6.7 meses (HR 0.71 IC 95% 0.59-0.85, p= 0.002), e

incrementando la tasa de respuestas tumorales objetivas del 35.5% en la rama de quimioterapia estándar al 47.3% en la rama que incluía Trastuzumab ($p=0.0017$).

El conocimiento más profundo de los factores moleculares de esta neoplasia esta contribuyendo al desarrollo de nuevos agentes que son dianas en aspectos críticos de la vías oncogénicas. En varios tipos de tumores, incluyendo neoplasias hematológicas, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer renal y tumores gastrointestinales muchas dianas moleculares han mostrado una significativa actividad antitumoral. Por lo tanto, la incorporación de estos agentes biológicos en los regímenes terapéuticos también está siendo investigada para pacientes con cáncer gástrico, entre los numerosos fármacos desarrollados se encuentran inhibidores de la angiogénesis, agentes frente al receptor de crecimiento epidérmico (EGFR), tal y como se resume en la tabla 4 y 5.

Tabla 4. Ensayos clínicos en curso, que incluyen combinaciones de diversos fármacos con Trastuzumab en cáncer gástrico avanzado HER2 positivo.

Fase	Esquema de tratamiento con Trastuzumab	Ptes	PF	Estado *	Código NCT/ nombre TRIAL
I	Docetaxel, oxaliplatino, capecitabina	15	DMT	ANR	NCT01295086
	Oxaliplatino, capecitabina, bevacizumab	36	RR	R	NCT01191697
II	Oxaliplatino, capecitabina	56	RR	R	NCT01396707
	Oxaliplatino, capecitabina	51	RR	R	NCT01364493
	Oxaliplatino, capecitabina	51	SG	R	NCT01503983/HerXO
	Oxaliplatino, capecitabina, quimioradioterapia	40	EA	R	NCT01748773/TOXAG
	Cisplatino, capecitabina, pertuzumab	30	EA	AcNR	NCT01461057
	Cisplatino, TS-1	30	RR	R	NCT01736410
III	Cisplatino, capecitabina, pertuzumab	400	SG	R	NCT01450696/HELOISE
	Pertuzumab, quimioterapia estandar	780	SG	R	NCT01774786
	Trastuzumab-DM1, taxano	412	SG	R	NCT01641939
IV	Quimioterapia estandar	30	SLP	R	NCT01260194
	Observacional trastuzumab	1500	RR/SLP	R	NCT01220934

PF: Punto final; DMT: Dosis máxima tolerable; ANR: Aun no reclutando; RR: Rata de respuesta; R: reclutando; SG: Supervivencia global; EA: Efectos adversos; AcNR: Activo no reclutando; SLP: Supervivencia libre progresión. * Disponible en: <http://clinicaltrials.gov> (visitado 17.06.13).

Tabla 5. Ensayos clínicos con nuevos fármacos dirigidos a dianas terapéuticas en pacientes con cáncer gástrico avanzado HER2 positivo.

Línea tratamiento	Fase	Esquema de tratamiento	Ptes	PF	Estado*	Código NCT/ nombre TRIAL
1. ^a	II	Lapatinib, capecitabina	76	RR	AcNR	NCT01145404
		Lapatinib, carboplatin, paclitaxel	43	EA/RR	AcNR	NCT01395537
		MM1, paclitaxel, trastuzumab, Lapatinib, capecitabina	180	SLP	R	NCT01774851
	III	Lapatinib, capecitabina	68	RR	AcNR	NCT00526669
		Oxaliplatino, capecitabina, lapatinib	535	SG	AcNR	NCT00680901/LOGIC
2. ^a	I**	²¹² Pb-TCMC-trastuzumab	36	EA	R	NCT01384253
		MGAH22	30	EA	R	NCT01148849
		LJM716	50	DMT	R	NCT01598077
		HER2 dominio intracelular	5-25	RI	T	NCT00005956
	MVF-vacuna HER2	12	RI/EA	NS	NCT00017537	
	HER2-ECD vacuna	40	RI/EA	R	NCT01526473	
	CUDC-101	40	EA	T	NCT01171924	
	Lapatinib, Nab-paclitaxel	15	DMT	R	NCT00313599	
	II	Afatinib (BIBW 2992)	27	RR	R	NCT01522768
		AUY92, trastuzumab	48	RR	T	NCT01402401
Lapatinib, capecitabina		76	RR	AcNR	NCT01145404/GastroLap	
III	Lapatinib, paclitaxel	273	SG	T	NCT00486954/TYTAN	

PF: Punto final; RR: Rata de respuesta; AcNR: Activo no reclutando; EA: Efectos adversos; SLP: Supervivencia libre progresión; R: Reclutando; SG: Supervivencia global; DMT: Dosis máxima tolerable; RI: Respuesta inmune; T: Terminado; NS: No se sabe. * Disponible en: <http://clinicaltrials.gov> (visitado 17.06.13). **Tumores gástricos y otro tipo de tumores HER2 positivo.

6 ALTERACIONES GENÉTICAS EN ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS

En el momento actual, se reconoce que la transformación neoplásica constituye el resultado de una cascada de eventos moleculares que conducen a la pérdida del control normal sobre la proliferación, la diferenciación y/o la supervivencia celulares, así como de las interacciones normales de la célula alterada con el micromedioambiente en el que se localiza; en este proceso, las alteraciones genéticas desempeñan un papel ontogénico clave^{98,99}, acumulándose de forma progresiva en las células neoplásicas del tumor. Esto es debido a la existencia de inestabilidad genética y/o cromosómica, que habitualmente se manifiesta mediante la aparición y coexistencia de múltiples alteraciones cromosómicas y/o moleculares en las células tumorales de cada paciente. En las dos últimas décadas se ha incrementado de forma notable el número de estudios en los que se analizan las características citogenéticas de los adenocarcinomas gástricos¹⁰⁰⁻¹⁰⁸. La caracterización citogenética de estos tumores se ha realizado mediante técnicas cariotípicas convencionales¹⁰⁰⁻¹⁰⁹ complementadas a lo largo de

los últimos años con técnicas moleculares. En este sentido, se han empleado técnicas de hibridación in situ fluorescente sobre núcleos interfásicos (iFISH)¹¹⁰⁻¹¹⁹, hibridación genómica comparada (CGH)¹²⁰⁻¹³⁵ y SKY¹³⁶⁻¹³⁸. Más recientemente, a esta batería de aproximaciones metodológicas, se han añadido técnicas de “arrays”, tanto de expresión (arrays de oligonucleotidos) como de ganancias y pérdidas cromosómicas (polimorfismo de nucleótido único SNPs), con estas nuevas aproximaciones se logra un análisis masivo de alta resolución de las alteraciones genéticas presentes en las células tumorales de los ADC gástricos.

En su conjunto, estos estudios han identificado cambios cromosómicos recurrentes, entre cabe destacar ganancias de las regiones cromosómicas 3q, 7p, 7q, 8q, 13q, 17q, 20p, 20q y pérdidas de 4q, 9p, 17p y 18q^{120-122,124,125,139} siendo la anomalía más frecuente la pérdida (monosomía) del cromosoma 17 o la delección del brazo corto de este cromosoma (17p⁻)^{105,115,124,131,140}. Estos resultados indicarían que algunos genes localizados en el brazo corto del cromosoma 17 podrían estar involucrados en las numerosas etapas del proceso de transformación neoplasia de la mucosa normal. Estos hallazgos han sido confirmados reciente mediante estudios de iFISH, LOH y CGH que muestran la existencia de una elevada proporción de cáncer gástrico de anomalías estructurales que afecta tanto a regiones centroméricas¹⁴¹⁻¹⁴⁶ como a fragmentos localizados telómericamente a 17p13 (donde se localiza el gen *TP53*, asociados a la pérdida del brazo corto del cromosoma 17)¹⁴⁷⁻¹⁵¹. Otros estudios demostraron que, además de las alteraciones del cromosoma 17, con frecuencia se observa la presencia de cariotipos complejos definidos por la coexistencia de alteraciones numéricas y/o estructurales de otros cromosomas, asociados o no a la pérdida de 17/17p⁻. Estas alteraciones incluyen principalmente pérdidas de los cromosomas 1p^{108,109,142}, 3p^{105,108,152}, 13q^{105,108,153}, junto con deleciones a nivel de los cromosomas 6q^{102,106,108,154-157} y de los cromosomas sexuales^{102,105}. Por el contrario, las alteraciones genéticas asociadas a ganancias son menos frecuentes y afectan preferentemente a los cromosomas 7p^{100,105,158}, 8q^{100,159}, 11p^{106,109}. Estos hallazgos indican que, como ocurre en otros tipos de tumores, los ADC gástricos representan un grupo de neoplasias citogenéticamente heterogéneas. Además la heterogeneidad genética, existe una gran variabilidad en la literatura en relación con la incidencia exacta de cada anomalía genética concreta. Por ejemplo, la incidencia de pérdida de 17p13, oscila en la literatura entre el 48% y 63 %^{124,131}, dependiendo de las serie analizadas. Aunque, no se conocen con precisión las causas de esta variabilidad, se cree que puede estar relacionadas con cuestiones metodológicas, los criterios empleados para definir la existencia de anomalía en este cromosoma y el pequeño numero de pacientes en una

importante proporción de trabajos. Más adelante se discuten de forma más precisa en esta introducción, las ventajas y limitaciones de las distintas técnicas utilizadas habitualmente para el estudio de las aberraciones citogenéticas en adenocarcinomas gástricos.

6.1 Alteraciones genéticas

En la figura 3 se representa de forma esquemática un modelo hipotético de la progresión desde el epitelio normal al carcinoma invasor, reconociéndose una secuencia epitelio normal-metaplasia-adenoma-carcinoma y metástasis^{25,160} de acuerdo con la secuencia de alteraciones genéticas que hipotéticamente se acumularían en la célula neoplásica. En dicho modelo, se propone una vía de carcinogénesis relacionada con el fallo de los mecanismos moleculares subyacentes a la enfermedad que incluyen anomalías en oncogenes, genes supresores de tumores, moléculas de adhesión celular y reguladores del ciclo celular. Las diferentes alteraciones genéticas encontradas en cáncer gástrico según la clasificación de Lauren y sus implicaciones en el comportamiento clínico y biológico de la enfermedad se resumen en la tabla 6.

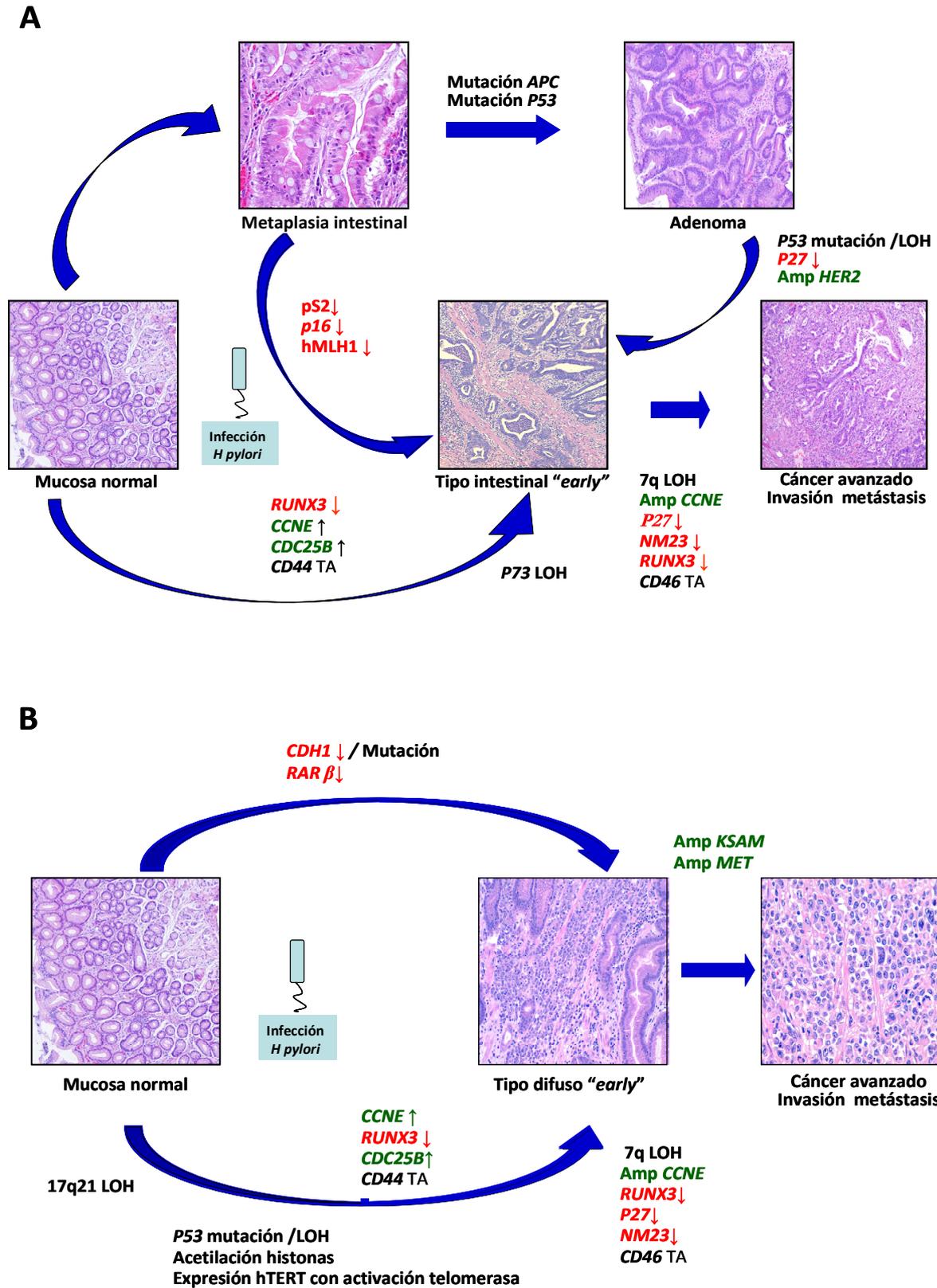


Figura 3. Modelo hipotético de progresión tumoral según los cambios genéticos y epigenéticos asociados a adenocarcinomas gástricos (A) tipo intestinal, (B) tipo difuso, descritos en la literatura^{25,160}

Tabla 6. Genes y sus alteraciones asociadas a cáncer gástrico.

Gen	Papel fisiológico	Alteración	Frecuencia (%)		Progresión Local	Metástasis a distancia	Pronóstico	Supervivencia prolongada	Referencias
			Intestinal	Difuso					
<i>TP53</i>	Ciclo celular y Apoptosis	Mutación/LOH/hipermetilación/sobreexpresión	~8-65		Si	Si	No correlación	No	64,65,161,162
<i>APC</i>	Control del crecimiento celular, proliferación Vías wnt/ β -catenina/TGF β	Mutación/LOH	~50		No	No	Pobre	No	163-165
<i>RUNX3</i>	Factor transcripción	Deleción hemicigota/hipermetilación/pérdida de la expresión	15-45	40-80	Si	Si	Pobre	No	166-168
<i>DCC</i>	Adhesión celular	LOH	50		Si	Si	Resultados discordantes	Si	169,170
<i>KRAS</i>	Transducción de señales	Mutación	10		No	No	No correlación	No	171
<i>ERBB2</i>	Receptor transmembrana protein-quinasa	Amplificación/sobreexpresión	~10-30	~2-6	Si	Si	Pobre	No	59-61
<i>MET</i>	Receptor factor crecimiento hepatocito	Amplificación/sobreexpresión	20	40	Si	No	Pobre	No	172
<i>KSAM</i>	Receptor factor crecimiento	Amplificación/sobreexpresión	~35		Si	No	Pobre	No	173
<i>CDH1</i>	Adhesión celular y migración vía TGF β	LOH/Mutación/hipermetilación/pérdida de la expresión	~20-90		Si	Si	Pobre	No	174-176
<i>CD44</i>	Adhesión celular	Hipermetilación	31-72	17-48	Si	Si	Pobre	No	177
<i>NM23</i>	Supresor de metástasis	Disminución	3-25	30-70	Si	Si	Pobre	Resultados discordantes	178-180

Tabla 6. Genes y sus alteraciones asociadas a cáncer gástrico.

Gen	Papel fisiológico	Alteración	Frecuencia (%)		Progresión Local	Metástasis a distancia	Pronóstico	Supervivencia prolongada	Referencias
			Intestinal	Difuso					
<i>CCNE1</i>	Ciclo celular	Amplificación/ sobreexpresión	~15-20		Si	Si	Pobre	No	181
<i>CDKN1B</i>	Ciclo celular	Disminución de la expresión	~40-50		Si	Si	Pobre	No	182,183
<i>FHIT</i>	Supresor tumoral	Pérdida de la expresión proteica (LOH, MSI)	35-65	20-80	Si	Si	Pobre	No	184,185
<i>COX2</i>	Enzima síntesis prostaglandinas	Sobreexpresión	60-70	30-70	Si	Si	Resultados discordantes	No	186-188
<i>VEGF</i>	Factor de crecimiento	Sobreexpresión	65	34-45	Si	Si	Pobre	No	186,189,190
<i>RBI</i>	Ciclo celular	Expresión disminuida	60	50	No aplica	No aplica	Pobre	No	181
<i>CDKN1A</i>	Ciclo celular	Pérdida	60		Si	Si	Pobre	No	181,191,192
<i>PRL-3</i>	Señalización celular	Sobreexpresión	30-40	25-60	Si	Resultados discordantes	Pobre	No	193-195
<i>MYC</i>	Ciclo celular, susceptibilidad apoptosis	Amplificación/ sobreexpresión	~40-45		Posible	Posible	Pobre	No	196-199
<i>BCL2</i>	Inhibidor de apoptosis	LOH/sobreexpresión	~12-35		No	No	Bueno	Si	200
<i>CDKN2A</i>	Ciclo celular	Metilación/LOH	~12-30		Si	Si	Pobre	No	201,202
<i>BAX</i>	Inhibidor de apoptosis	Expresión disminuida	10	5	No aplica	Si	Pobre	No	203
<i>PTEN</i>	Ciclo celular	LOH/mutación			Si	Si	No correlación	No	204,205

6.1.1 Cáncer gástrico de tipo Intestinal

Los tumores de tipo intestinal se caracterizan por la acumulación progresiva de alteraciones genéticas, que tienen lugar paralelamente a la evolución de la alteración histológica que se inicia de acuerdo con el modelo postulado por Correa *et al*²⁰⁶, como una mucosa gástrica normal con hiperproliferación epitelial y se transforma en gastritis crónica con varios grados de atrofia, metaplasia intestinal, displasia y, finalmente, carcinoma (Figura 3A). Asimismo, la inactivación de los genes supresores *TP53*, *APC*, *DCC* y *RUNX3*^{160,161,166,207-209} debido a mutaciones y/o pérdida de la heterocigosidad (LOH) son las alteraciones genéticas más frecuentemente encontradas, la activación de los oncogenes *HER2* y *KRAS*^{59-61,210-212}.

La alteración genética más frecuentemente encontrada en ADC gástricos consiste en alteraciones genéticas que afectan al gen supresor *TP53*, localizado en la región cromosómica 17p13.1 y que están presentes en aproximadamente en el 60% de los casos independientemente del tipo histológico, observándose con frecuencia en lesiones precursoras como metaplasia intestinal, displasia y adenomas^{142,213-216}. De acuerdo con ello, los estudios citogenéticos señalan que la alteración cromosómica más frecuente en los ADC gástricos es la pérdida total o parcial del cromosoma 17 y que esta podría constituir uno de los primeros cambios que ocurren en el desarrollo de este tipo de tumores^{120,127}. Esta observación ha sido corroborada empleando marcadores polimórficos mediante la comprobación de la existencia de LOH a nivel de 17p en alrededor de 3% a 65% de los casos de cáncer de estómago²¹⁷. Desde el punto de vista patogénico, merece destacar que la mayor parte de las mutaciones encontradas en el gen *TP53*, con llevan a la pérdida de función del gen, produciendo una proteína anómala más estable que la hace detectable mediante técnicas inmunohistoquímicas (IHQ), habiéndose encontrado una frecuencia de alteraciones que oscila entre un 13-54%^{178,218,219}. La influencia de una expresión anómala de *TP53* en el pronóstico es controvertida, encontrándose resultados discordantes en los diferentes trabajos encontrados en la literatura, algunos de los cuales asocian la positividad de p53 a un peor pronóstico^{178,218,220}, mientras que otros estudios no encontraron esta asociación^{221,222}. *TP53* funciona como un factor de transcripción, activando la expresión de genes que controlan la transición entre diferentes fases del ciclo celular, la apoptosis, la reparación del ADN y la angiogénesis²²³. En este sentido, se observan alteraciones de *TP73* en el 38% de los cánceres gástricos, gen

supresor tumoral asociado con *TP53*, las alteraciones de este gen junto con la expresión de pS2 son más frecuentes en los cánceres gástricos de tipo foveolar²²⁴. La proteína pS2 es expresada normalmente por las células epiteliales foveolares gástricas. A nivel gástrico pS2 se cree que actúa como un supresor tumoral. Fujimoto *et al*²²⁵ observó que la positividad de pS2 se asocia con tumores gástricos bien diferenciados, constatándose hipermetilación del promotor en los casos pS2 negativo sugiriendo el importante papel de pS2 en las fases iniciales de la transformación maligna gástrica del tipo intestinal²²⁵.

Además de *TP53*, se han identificado la presencia de otros genes supresores de tumor en este tipo histológico. Así, mutaciones a nivel del gen supresor tumoral *APC* (*adenomatous polyposis coli*), localizado en el brazo largo del cromosoma 5, se observa hasta en el 60% de los tumores gástricos de tipo intestinal, pero no en el tipo difuso²²⁶. Además, se encuentra alterado en el 6% de metaplasia intestinal^{226,227}. Normalmente, en el citoplasma de una célula, *APC* junto con GSK-3 β se unen a β -catenina. Mutaciones en *APC*, hacen que no se una a β -catenina y quede libre en el citoplasma. Así, β -catenina libre, trasloca al núcleo donde forma un complejo con el factor de células T (TCF), activando la expresión oncogénica lo que conlleva a una proliferación anormal²²⁸.

Otro gen supresor de tumor frecuentemente alterado en cáncer gástrico es *RUNX3*, localizado en 1p36.11, región cromosómica frecuentemente afectada por pérdida de heterocigosidad en diferentes tipos de tumores sólidos²²⁹. Li *et al*²³⁰ estudiaron ratones knockout para *RUNX3* y demostraron que la mucosa gástrica de estos animales presenta hiperplasia por un aumento de proliferación y supresión de apoptosis. Entre el 45-60% de los tumores gástricos presentan una disminución en la expresión de este gen debido a LOH e hipermetilación del promotor²³⁰. La metilación de *RUNX3* también se encuentra en el 8% de las gastritis crónica, 28% de las metaplasias intestinales y 27% de adenomas gástricos²³¹. Funcionalmente este gen codifica para un factor de transcripción que es diana de la vía de transducción de señal de TGF- β ²³². Esto sugiere que *RUNX3* es una diana para el silenciamiento de genes epigenéticos en la carcinogénesis gástrica^{230,233}.

La pérdida de la región cromosómica 18q21, donde se ubica el gen *DCC* (*deleted in colorectal carcinoma*) es muy importante en la tumorigénesis colorrectal, encontrándose también implicado en cáncer gástrico²³⁴⁻²³⁶. El gen *DCC* codifica una proteína de membrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas²³⁷. Diferentes estudios encuentran pérdida de la

expresión en el 12-49% de los casos de cáncer gástrico y se relaciona con el tipo intestinal en estadios avanzados^{236,238}.

Desde el punto de vista citogenético, la pérdida de 1q y 7q representa una de las primeras anomalías en el tipo intestinal, mientras que la pérdida de 1p se encuentra más frecuentemente en el tipo difuso¹⁴², donde se encuentran otros genes supresores de tumor. No obstante, queda por conocer el papel específico de ellos en el origen y progresión de los ADC gástricos.

Diferentes estudios han demostrado que la infección crónica de *H. pylori* puede causar o intuir alteraciones genéticas definidas por mutaciones puntuales, en distintos oncogenes, uno de los más estudiados en el ADC gástrico es *KRAS* una proteína de membrana con actividad GTPasa que afectan la proliferación celular²³⁹. En cáncer gástrico se ha detectado la presencia de mutaciones principalmente en el codón 12 en el tipo intestinal y sus lesiones precursoras, metaplasia intestinal y adenoma, pero no en el ADC de tipo difuso^{142,211,212}. Sin embargo, otros estudios demostraron que las mutaciones en el codon 12 es un evento infrecuente en cáncer gástrico^{211,240,241}.

Los receptores tirosina quinasa son una subclase de receptores para factores de crecimiento con una actividad quinasa intrínseca controlada por ligando. Estos receptores regulan diversas funciones en la célula normal y tienen un papel crucial en la oncogénesis²⁴². A esta familia de receptores pertenece el oncogén *ErbB2* (Erythroblastic leucemia viral oncogen B 2), también conocido como *HER2/NEU*, *c-erb-B2* o *HER2* localizado en el cromosoma 17q21 y codifica para una proteína transmembrana de 185 kDa y no se ha descrito ningún ligando conocido capaz de unirse con alta afinidad al ectodominio del receptor HER2. Desde los primeros trabajos^{238,243-245} realizados analizando el estado de *HER2* en cáncer gástrico se observó una mayor incidencia de casos con sobreexpresión proteica y/o amplificación del gen en los tumores tipo histológico intestinal según Lauren. Existe un rango muy amplio de positividad ente los diferentes estudios que van desde el 8%²⁴⁶ hasta el 53%⁶⁰. En relación con el posible carácter pronóstico de la expresión y/o amplificación de *HER2* en cáncer gástrico es un tema controvertido por los diferentes resultados entre unos estudios y otros a la hora de determinar la existencia o no de una asociación entre la progresión de la enfermedad y la sobreexpresión y/o amplificación del mismo. Algunos estudios no encuentran ninguna relación significativa entre la expresión de *HER2* y el pronóstico de los pacientes con

cáncer gástrico^{247,248}, por el contrario, otros estudios^{63,249,250} han descrito una asociación entre la presencia de sobreexpresión de *HER2* o su amplificación génica y un pronóstico adverso determinado fundamentalmente por una mayor incidencia de metástasis ganglionares, un tamaño tumoral mayor y una supervivencia a los 10 años inferior en aquellos pacientes con sobreexpresión/amplificación positiva.

6.1.2 Cáncer gástrico difuso

El tipo difuso de ADC gástrico no parece seguir un proceso multipaso de desarrollo y aparentemente se inicia desde una mucosa gástrica sana sin cambios tisulares previos^{25,160} (Figura 3B). En una elevada proporción de los tumores de tipo difuso se detecta inestabilidad de microsátelites, además de una alta frecuencia de amplificación de factores de crecimiento tales como *MET* y *K-SAM*.

En este sentido el gen *MET* codifica un receptor para el factor de crecimiento de hepatocitos. Especialmente interesante resulta el hallazgo de que la frecuencia de alteraciones de *MET* varía en los subtipos histológicos más comunes de ADC gástricos. Así, mientras que en los de tipo difuso se detecta la presencia de alteraciones de *MET* en aproximadamente el 39% de los casos, en los de tipo intestinal, éstas tan sólo se encuentran en un 19%.²⁵¹ Se ha encontrado una relación estadísticamente significativa entre la amplificación de *MET* con estadio tumoral, metástasis ganglionares y profundidad de la invasión tumoral en la pared gástrica^{250,252}. La sobreexpresión se asocia a estadios avanzados de la enfermedad y menor supervivencia^{253,254}. El oncogen *KSAM* se encuentra frecuentemente activado exclusivamente en carcinomas gástricos de tipo difuso y su sobreexpresión se asocia con un peor pronóstico²⁵⁵.

En el proceso de diseminación y metástasis del ADC gástrico resultan determinantes las interacciones de las células neoplásicas entre sí con las células estromales y endoteliales y con los componentes de la matriz extracelular²⁵⁶⁻²⁵⁸. Las cadherinas, una superfamilia de glicoproteínas de membrana dependientes de calcio, son responsables de la adhesión homofílica célula-célula. El gen supresor *CDHI*, localizado en 16q22.1, codifica para la E-cadherina cuya principal función es preservar la integridad epitelial a través del mantenimiento de la adhesión intercelular y la polaridad celular^{259,260}. Mutaciones en *CDHI*

son exclusivas de los tumores difusos esporádicos²⁶¹ y se presentan en el 50% de los casos. En pacientes con cáncer gástrico difuso hereditario se ha identificado más de 14 mutaciones en la línea germinal de uno de los alelos del gen *CDHI*²⁶² que afectan a 8 de sus 16 exones²⁶³. El riesgo de desarrollar cáncer gástrico a lo largo de su vida en las personas portadoras de una mutación del gen *CDHI* es del 67% en hombres y del 83% en mujeres²⁶⁴. La pérdida de expresión de E-cadherina, se ha asociado a tumores más invasivos, con mayor capacidad metastásica y menor supervivencia global^{265,266}.

Hasta la fecha se han identificado la presencia de otros genes involucrados en las primeras etapas del proceso de transformación maligna de la mucosa normal, entre ellos se incluye el *CD44*, localizado a nivel de 11p13 y que codifica para una familia de molécula que interviene en la adhesión intercelular y con la matriz extracelular. En tumores primarios y recidivas se encuentra una sobreexpresión de isoformas alteradas de CD44 y la frecuencia de estos transcriptos anormales varían según los subtipos histológicos²⁶⁷. Así se encuentran una sobreexpresión de CD44 en el 60% de las metaplasias intestinales y ausente en la mucosa normal²⁶⁸. La osteoponina (OPN), es un ligando de la proteína CD44, que se sobreexpresa en el 73% de los carcinomas gástricos y cuando se co-expresa con CD44v9 se asocia con invasión linfática y metástasis^{269,270}.

Otras anomalías genéticas implicadas en la progresión tumoral, incluyen alteraciones a nivel del gen *NM23* (*nucleoside diphosphate kinase*), considerado un gen supresor del proceso metastásico. La expresión alterada de este gen en carcinoma gástrico y su significación es controvertido. Mientras unos autores encuentran una relación inversa entre la expresión del gen y el potencial metastásico²⁷¹ y con supervivencia prolongada¹⁷⁸; otros estudios no encuentran ninguna correlación que sugieran que es un supresor de metástasis y correlación con metástasis^{179,180}.

Anomalías en los reguladores del ciclo celular también están involucrados en el desarrollo y progresión del cáncer gástrico a través de la proliferación celular incontrolada²⁷². Específicamente, las alteraciones genéticas y la expresión anómala de las ciclinas y de las diversas quinasas ciclina dependientes (CDK), así como los inhibidores de CDK, juegan un papel en la patogénesis del cáncer gástrico. La amplificación de *Ciclina E* se ha observa en el 10 y 20% de los cánceres gástricos de tipo difuso e intestinal, respectivamente²⁷³. Además, la sobreexpresión de ciclina E se correlaciona con estadio tumoral avanzado, invasividad y

grado histológico²⁷³. Por otra parte, se ha sugerido que p27 es una proteína inhibidora de las quinasas dependientes de ciclinas en la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular, tiene importancia pronóstica en cáncer gástrico. La pérdida de la expresión de p27 se detecta en aproximadamente el 40-50% de los cánceres gástricos²⁷⁴. Algunos estudios han relacionado la baja expresión de la proteína p27 con tumores pobremente diferenciados y estadios avanzados^{182,183}. Sin embargo, otros autores no encuentran una asociación estadísticamente significativa entre la supervivencia global (SG) de los pacientes con una alta o baja expresión de esta proteína.²⁷⁵

6.2 Impacto pronóstico de las alteraciones cromosómicas en los ADC gástricos

En las últimas décadas se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de las características citogenéticas de los adenocarcinomas gástricos^{120,124,126,131,145,276-278}. Con ello, además de conocerse la frecuencia relativa de cada una de las anomalías detectadas, se han identificado asociaciones clínicas y pronósticas relevantes, confirmando la naturaleza heterogénea de los adenocarcinomas gástricos, desde el punto de vista genético^{121,122,128,279,280}. No obstante, pese a la gran cantidad y heterogeneidad de las alteraciones genéticas descritas hasta la fecha en los ADC gástricos y su frecuente asociación con el grado histológico del tumor, siguen siendo pocos los trabajos en los que se demuestra de forma fehaciente su asociación con el pronóstico de la enfermedad. Diversos estudios realizados empleando la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) han mostrado la existencia de cambios citogenéticos relacionados directamente con el comportamiento biológico de los ADC gástrico¹¹⁴⁻¹¹⁹. En este sentido, Onchi *et al*¹¹⁴, encontraron la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de metástasis ganglionares y ganancias a nivel del cromosoma 17. En esta misma línea, se encuentran los resultados observados por Terada *et al*¹¹⁵, describieron que las anomalías del cromosoma 17 se asocian con profundidad de la invasión, metástasis ganglionares, invasión linfática y venosa. Así mismo, merece destacar el trabajo realizado por Kitayama *et al*¹¹⁸, donde se observa que las anomalías numéricas que afectan a los cromosomas 3, 10, 11, 12, 17 y Y se asocian con un pronóstico adverso de la enfermedad. Por el contrario, otros estudios no encuentran ninguna asociación entre las distintas alteraciones cromosómicas y las características clínico-patológicas de la enfermedad^{116,117}.

La mayoría de los estudios referidos en la literatura en los que se ha analizado el impacto pronóstico muestran que los ADC gástricos que presentaban ganancias en los cromosomas 18q y 20q correspondían con mayor frecuencia a tumores histológicos de tipo intestinal, mientras que en los de tipo difuso las ganancias más frecuentes se encontraban en los cromosomas 8q, 13q y 17q¹²⁰. En esta misma línea, se encuentran los resultados observados por Wu *et al*¹²¹, quienes analizaron por CGH un grupo de 53 tumores gástricos, observaron que los tumores de tipo intestinal presentan con mayor frecuencia ganancias en los cromosomas 8q, 17q y pérdidas en 3p y 5q que los tipo difuso, mientras las ganancias en 13q son más frecuentes en el tipo difuso. Estos resultados coinciden con observaciones previas de otros autores^{122,281} que indican que los ADC de tipo intestinal presentan con mayor frecuencia anomalías en los cromosomas 8q y 17q, mientras que ganancias en 13q han sido previamente reportadas por Koizumi *et al*¹²⁷, en los carcinomas de tipo difuso. No obstante, esto no ha podido ser confirmado por otros estudios^{129,130} que no han encontrado una asociación estadísticamente significativa entre las alteraciones cromosómicas y el tipo histológico según Lauren.

Desde el punto de vista clínico, Kang *et al*¹³² han descrito dos regiones cromosómicas asociadas con la presencia de metástasis ganglionares (9p23, 14q31) y dos regiones en (4q23 y 4q28) con metástasis a distancia. Además, las ganancias en 5p14, 7q21, 7q31 y 7q36 y/o pérdidas en 22q11 se relacionan con la presencia de metástasis peritoneal y/o citología peritoneal positiva¹³³.

6.3 Métodos de estudio de las alteraciones genéticas de los adenocarcinomas gástricos

En la actualidad, disponemos de una amplia batería metodológica para el análisis de las alteraciones genéticas de los adenocarcinomas gástricos, que van desde las técnicas convencionales de citogenética y biología molecular, al análisis de ácidos nucleicos mediante microarrays de oligonucleotidos. No obstante, mientras que hasta la fecha algunos de estos métodos se han aplicado ampliamente al estudio de los adenocarcinomas, esto no ha ocurrido con otras técnicas.

6.3.1 Técnicas citogenéticas y moleculares convencionales

6.3.1.1 Técnicas de hibridación *in situ* fluorescente

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH, del inglés, Fluorescence *in situ* hybridization) es una técnica que permite la detección y localización de secuencias específicas de ADN o RNA sobre preparaciones cromosómicas, extensiones celulares y cortes de tejido conservando su estructura morfológica. El método se basa en el emparejamiento específico de dos secuencias de ácidos nucleicos complementarias, en el que una sonda marcada forma un híbrido con la secuencia de ADN diana frente a la que va dirigida. Dicho híbrido puede visualizarse tras un revelado inmunológico. Para ello, una vez obtenido el material celular es necesario disponer de sondas marcadas frente a la secuencia de ADN o ARN problema y de forma secuencial hacer accesible a la sonda, la secuencia de ácido nucleico que se pretende detectar - pretratamiento de la muestra-, desnaturalizar el ADN - desnaturalización - , permitir la hibridación de los ácidos nucleicos, y visualizar la reacción - revelado inmunológico- para proceder a su lectura en un microscopio de fluorescencia.

Uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la citogenética convencional es la ausencia de metafases; su gran ventaja reside en ser una técnica que permite el análisis simultáneo de todo el genoma. La técnica de FISH ha resuelto, al menos en parte, el primer problema al permitir analizar núcleos en interfase; en cambio su gran limitación reside en que no se puede emplear como una técnica de rastreo diagnóstico, como en el cariotipo, ya que sólo detecta las alteraciones genéticas de forma dirigida. Así, aunque el FISH no permite obtener una información global del genoma, facilita el estudio simultáneo de varias regiones del genoma, de forma rápida, sensible, específica y reproducible tanto sobre núcleos interfásicos como en cromosomas metafásicos.

6.3.1.2 Arrays genómicos

En la última década la técnica de los arrays genómicos (CGH-array o Array-CGH) ha permitido conocer con más profundidad los cambios genómicos presentes en las diferentes tipos de neoplasias. Esta metodología combina la resolución del FISH y la capacidad de analizar todo el genoma. Por consiguiente, el array genómico es una herramienta muy válida para el análisis de los cambios en el número de copias del ADN, para la localización e

identificación de regiones genómicas o de genes relacionados con la enfermedad y con posibilidades de ser utilizada en la clasificación del cáncer²⁸²⁻²⁸⁵.

La CGH se fundamenta en la hibridación competitiva de dos ADNs, el ADN tumoral y un ADN control normal, cada uno marcado con un fluorocromo distinto. Ambos ADNs se mezclan en cantidades equimolares y son hibridados sobre cromosomas metafásicos normales. Estos ADNs compiten por hibridar en los mismos lugares cromosómicos. En condiciones normales (tumor sin alteraciones genéticas), como la cantidad de ADN marcado con ambos fluorocromos es la misma, el resultado final son cromosomas en los que no se observa predominio de ningún fluorocromo. En condiciones patológicas, si el tumor contiene alguna ganancia o pérdida cromosómica, la cantidad de ADN tumoral disponible para hibridar es mayor o menor, respectivamente y la hibridación de esa zona resultará en una mayor o menor proporción de fluorocromo del tumor^{282,286}.

En los arrays genómicos las metafases de los cromosomas usadas en la CGH convencional son reemplazadas por fragmentos clonados de ADN (± 100 - 200 kb) de los que se conocen su localización exacta gracias al Proyecto Genoma Humano (HUGO, *International Human Genome Sequencing Consortium 2001*)²⁸⁷⁻²⁹⁰. La localización física de cada uno de los fragmentos de ADN clonados, que en ocasiones se solapan, dan lugar al mapa físico de cada uno de los cromosomas. La cartografía del genoma humano requiere la disponibilidad de librerías de clones de ADN en los vectores apropiados. En un principio las librerías se insertaron en YAC (cromosoma artificial de levadura), que permitían clonar fragmentos de más de 500 Kb²⁹¹. Sin embargo, presentaban dificultades de manipulación y grandes lagunas genómicas²⁹²⁻²⁹⁴ por lo que el sistema de clonación de BAC (cromosoma artificial bacteriano) fue una alternativa ideal y se usó en la mayoría de los laboratorios²⁹⁵. El sistema de los BAC está basado en el “vector de clonación F” de *Escherichia coli*, cuya replicación está estrictamente controlada por lo que el plásmido F se mantiene en bajo número de copias (una o dos copias por célula) reduciendo su potencial de recombinación entre los fragmentos de ADN del plásmido. Hay otros sistemas para la clonación de fragmentos largos como es el sistema basado en el bacteriófago P-1(PAC)²⁹⁶, sin embargo, la capacidad máxima de clonación de este vector es de 100Kb. Por el contrario, el tamaño de los clones de BAC (150Kb), además de conferir una unión consistente y específica a la superficie del array, hace posible determinar con más precisión el número de copias, lo que les hace muy apropiados para emplearlos como sondas de CGH-array^{282,283,297}. En la tabla 7 se recogen de forma

genérica las principales ventajas y limitaciones de esta técnica, respecto a la CGH convencional y FISH.

Tabla 7. Análisis comparativo de las principales ventajas y limitaciones de las técnicas de FISH y CGH.

	Ventajas	Limitaciones
FISH	Aplicable tanto en metafase como en interfase	Sólo aporta información sobre la región del genoma analizado
	Rapidez	Restringido a la disponibilidad de las sondas comerciales
	Permite el análisis de todas las células del tumor	Coste moderado en reactivos
	Alta sensibilidad y especificidad	
CGH convencional	No requiere células en división	No detectan alteraciones citogenéticas equilibradas
	Requieren poca cantidad de ADN	No dan información de ploidía ni de la localización de las secuencias reorganizadas responsables del cambio en el número de copias
	Permiten estudiar material congelado o en parafina	No detectan desequilibrios <3Mb
	Permiten detectar ganancias y pérdidas de ADN de todo el genoma en un único experimento	
CGH array	Alta resolución (depende del tamaño y el espacio de los clones utilizados en el array)	La muestra a analizar debe tener entre 30% - 50% de células tumorales
	No precisa dianas específicas	Los cambios se delimitan por regiones y no por secuencias anotadas
	Detecta desequilibrios 45Kb-1Mb	Resolución limitada para cambios de menos 100Kb
	No es muy dependiente de desarrollo de software	No detecta reorganizaciones equilibradas
	Validación muy accesible por FISH a partir de los clones BAC alterados	Detección de falsas anomalías (polimorfismos) Disponibilidad limitada de sondas para un diseño de alta cobertura El método de producción introduce variables intrínsecas

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Al igual que ocurre en otras neoplasias, el cáncer gástrico constituye una enfermedad en la que se ve afectado el material genético influyendo en ello dos vías principales, la inestabilidad genética y la inestabilidad cromosómica, que de forma progresiva, conducen a una alteración en el control de la proliferación y diferenciación celular. En este sentido, se ha postulado que el adenocarcinoma gástrico se produciría por la aparición de forma secuencial de anomalías a nivel genético que, desde un estadio pre-neoplásico conducirían a una alteración generalizada del genoma. La mayoría de los adenocarcinomas gástricos muestran algún tipo de alteración citogenética, desconociéndose en gran medida la frecuencia exacta de muchas de ellas y sus implicaciones en el comportamiento clínico de la enfermedad. En parte, esto es debido a las limitaciones asociadas a las técnicas citogenéticas convencionales, que, por su baja sensibilidad, no permiten detectar pequeñas deleciones de material genético. Con el desarrollo de técnicas de alta resolución como los “arrays” de CGH y los “microarrays” de expresión hemos pasado a disponer de nuevas herramientas que por su alta sensibilidad facilitan la identificación y delimitación de regiones cromosómicas delecionadas, incluso cuando la alteración genética afecta a secuencias relativamente cortas de ADN. Hasta la fecha, pocos son los estudios de arrays genómicos que se han realizado en cáncer gástrico y estos incluyen un bajo número de casos. Además, el estudio de la heterogeneidad genética en cáncer gástrico debe ser analizada mediante técnicas que examinan las células individualmente. La técnica de FISH se perfila como ideal para este tipo de estudio y permite, además, la validación de las alteraciones genéticas detectadas mediante CGH. El potencial pronóstico de esas regiones o genes de interés, como de sus productos de expresión, puede ser evaluado de forma rápida sobre un número de muestras elevado gracias a la tecnología de los TMAs.

En el presente trabajo nuestra hipótesis se ha basado en que el uso de los CGH-arrays en adenocarcinomas gástricos podría identificar nuevos marcadores genéticos que tuvieran relación con las características clínico-patológicas y el comportamiento evolutivo del tumor.

Ante estos antecedentes, nos planteamos los siguientes objetivos:

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo General

Profundizar en el conocimiento de las anomalías genéticas del adenocarcinoma gástrico implicadas en el desarrollo y progresión de la enfermedad, investigando además las implicaciones clínicas y biológicas de las anomalías cromosómicas encontradas.

2.2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar la incidencia de alteraciones cromosómicas mediante técnica de CGH array en una serie amplia de pacientes diagnosticados de cáncer gástrico.
2. Identificar las posibles correlaciones entre las alteraciones individuales de cada cromosoma o gen estudiado con los datos clínico-patológicos de los adenocarcinomas gástricos.
3. Identificar regiones cromosómicas con valor pronóstico en cuanto a la supervivencia global y supervivencia libre de recaída.
4. Evaluar la expresión proteica de los genes *HER2/neu*, *TP53*, *EGFR* y *P21* entre las en muestras de tumor primario y sus correspondientes metástasis ganglionares.
5. Determinar cuáles son las vías de evolución clonal intratumoral, debidas a la inestabilidad cromosómica más frecuentemente observadas en los carcinomas gástricos.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Muestras

El presente estudio comprende una serie de 157 casos con diagnóstico de adenocarcinoma gástrico a los que se practicó una resección quirúrgica de la neoplasia, con intención curativa o paliativa, en el Servicio de Cirugía General y Digestiva del Hospital Universitario de Salamanca, en el periodo comprendido desde Diciembre de 1999 hasta Enero de 2007. El diagnóstico se estableció en todos los casos de acuerdo a criterios morfológicos fijados por la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁴¹ y la clasificación de Lauren⁴⁰, la estadificación se basó en el sistema TNM del “*American Joint Committee on Cancer*” (UICC/AJCC) 7^a edición 2010⁴².

La recogida de datos clínicos fue llevada a cabo mediante la revisión de las historias clínicas de toda la serie para la obtención de las variables epidemiológicas, anatomopatológicas y clínicas tras la realización de la gastrectomía correspondientes al estadio patológico de la enfermedad, tipo de cirugía, el estado de los márgenes de resección quirúrgicos, la instauración de tratamiento complementario y datos de seguimiento clínico incluyendo supervivencia global, supervivencia libre de recidiva y evolución.

Los pacientes según la cirugía realizada con intención curativa o cirugía paliativa, nos permite determinar que pacientes seleccionamos a la hora del análisis de los factores de riesgo en la supervivencia y en la recidiva de la enfermedad. Así, para el análisis descriptivo general se utilizarán el total de pacientes, mientras que para el análisis de supervivencia y recidiva se tendrán en cuenta aquellos pacientes intervenidos con intención curativa, es decir, aquellos en los que se extirpa todo el tumor visible, con confirmación posterior de la existencia de márgenes quirúrgicos libres de neoplasia.

La recidiva se definió como la primera evidencia documentada mediante la realización de pruebas de diagnóstico por la imagen de una nueva manifestación de la enfermedad bien sea locorregional, peritoneal a distancia o una combinación. Se considera recidiva locorregional a la evidencia de enfermedad en el lecho o muñón gástrico, a nivel retroperitoneal o en ganglios linfáticos perigástricos, retropancreáticos, mesentéricos, paraaórticos y hepatoduodenales. La recidiva a distancia incluyeron: ganglios supraclaviculares y otros órganos sólidos como hígado, pulmón, pleura, hueso, sistema

nervioso central y también a la piel, médula ósea. La recurrencia peritoneal fue documentada por citología positiva en líquido ascítico. La presencia del tumor de Krukenberg se considera como recidiva peritoneal²⁹⁸.

De acuerdo con los diferentes tipos de metodologías empleadas en este trabajo de tesis doctoral se consideraron dos grupos de muestras:

- 138 ADN extraídos de muestras procedentes de tejido fresco almacenadas en el Banco de tumores del Hospital Universitario de Salamanca de las que se han realizado los estudios de aCGH.
- Para el estudio y validación de los resultados detectados por aCGH y expresión proteica se construyeron cuatro arrays de tejidos.

Las principales técnicas y métodos utilizados en los diferentes estudios son descritos a continuación:

3.2 Hibridación genómica comparada BAC array

La técnica de los BAC-arrays se puede dividir en cuatro bloques bien diferenciados: 1) diseño del BAC-array, 2) preparación del ADN a hibridar o sonda, 3) hibridación del ADN sobre el BAC-array y 4) adquisición de imágenes.

3.2.1 Diseño del BAC-array

El BAC-array sobre el que se realizaron las hibridaciones de las muestras comprende una representación de la librería genómica humana desarrollada por el Instituto Sanger (“The Wellcome Trust Sanger Institute”, Hinxton, GB), de libre distribución, conocida como la librería “1Mb clone set”. La librería contiene elementos genómicos de secuencia y posición conocida espaciados 1 Mb en el genoma humano, clonados en vectores de gran capacidad conocidos como BAC, que admiten como media insertos de unos 150 kb, estando compuesta en total por alrededor de 3500 clones BAC contenidos en un hospedador bacteriano (*E. coli*). El genoma humano no está por tanto representado de forma exhaustiva, sino que existe un inserto de 150 kb clonado en un vector BAC por cada mb de genoma no cubierto por la

librería. Aunque esta resolución pueda parecer baja supone una notable mejora respecto a la resolución del mCGH y, además, la librería de 1Mb está enriquecida con una sub-librería que comprende cientos de clones BAC específicamente seleccionados para cubrir los *loci* de los principales genes involucrados en cáncer.

La replicación de esta librería se realizó en el “Leids Universitair Medisch Centrum” (LUMC, Leiden), haciendo uso del biorrobot allí disponible y partiendo de una colección de minipreps (construcciones BAC ya extraídas del hospedador bacteriano *E. coli*). Esta replicación, mediante técnicas de PCR detalladas en el siguiente apartado, es necesaria debido a que los clones BAC son vectores de copia única cuyo cultivo bacteriano rinde una cantidad de ADN insuficiente para la creación del microarray.

3.2.1.1 Amplificación del ADN por DOP-PCR y Aminolinking PCR

El objetivo de estas técnicas de amplificación es producir una representación de la secuencia humana contenida en las construcciones BAC, obteniendo la suficiente cantidad de producto para construir el microarray. Para ello, las construcciones son amplificadas primero mediante DOP-PCR (“degenerated oligo-primed PCR”), que utiliza oligonucleótidos con secuencia parcial al azar, y posteriormente se reamplifica este primer producto con una segunda PCR que hace uso de cebadores con modificación química amino en el extremo 5’, con lo que se obtiene un producto final de amplificación amino-modificado. El grupo amino añadido se requiere para la unión del producto a la superficie donde se construye el microarray.

Los cebadores usados en la DOP-PCR han sido además diseñados para diferenciar el inserto, de secuencia genómica humana, de la secuencia del vector BAC²⁹⁹. La estructura y secuencia de los cebadores oligonucleotídicos es la que se explica en el siguiente esquema (secuencias en sentido 5’-3’):



Para maximizar la proporción del inserto humano del clon BAC representado en la mezcla de secuencias amplificadas se realizan 3 DOP-PCRs independientes, cada una de las cuales usa un cebador de secuencia distinta en su porción discriminante del inserto genómico humano.

Reactivos y Soluciones:

- Solución TAPS: 6.08 gr de TAPS (“N-tris[hydroxymethyl]methyl-3-amino-propanesulphonic acid” Sigma), 2.20 gr (NH₄)₂SO₄, 2.5 ml MgCl₂ 1M, 60 ml de agua milliQ. Ajustar el pH a 9.3 con una solución de KOH 2M. Filtrar con jeringa y filtro de 0.22 µm y esterilizar con ultravioleta. Guardar a -20 °C. Una alícuota de 1 ml será suficiente para hacer dos placas de 96 pocillos.

Cada vez que se utilice el TAPS es necesario añadir: β Mercapto-etanol (βME) y una solución de BSA al 5% en agua (filtrado a través de 0.22 µm y esterilizado con Luz UV). Para 1 volumen final de TAPS: 960 µl de solución TAPS + 33 µl de BSA 5% + 7.5 µl de βME.

- Solución W-1 (Polioxietileno ether W1, 1%): 0.25 g de W-1 ó Brij 58 (“Polyethylene glycol hexadecyl ether”, antes llamado por SIGMA W-1 y ahora Brij58) en 25 ml de agua milliQ. Filtrar con jeringa y filtro de 0.22 µm y esterilizar con luz UV. Hacer alícuotas de 1 ml y conservar a -20°C.

- Cebadores (Thermo, Electron Corporation)

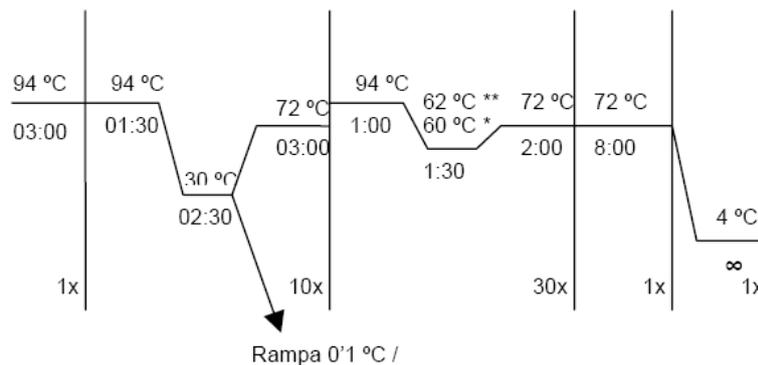
- Taq- Polimerasa [5U/µl], (Applied Biosystems)

Procedimiento

Se dispensa en una placa de 96 pocillos “Axygen” (Bonsai Technologies) 1 µl del ADN del BAC y se añade por cada pocillo la siguiente mezcla:

Solución TAPS-BSA-βME	5 µl
Cebador DOP (20 µM)	5 µl
dNTPs (10 mM cada uno)	1.25 µl
Solución W-1	2.5 µl
Taq polimerasa	0.5 µl
H ₂ O	34.75 µl
ADN del clon BAC	1 µl
Total	50 µl

El programa de PCR usado es el siguiente:



* Temperatura de anillamiento para los cebadores DOP1 y DOP3

** Temperatura de anillamiento para el cebador DOP2

Los 10 primeros ciclos de esta PCR están diseñados para amplificación de múltiples secuencias, para lo cual se programa una rampa creciente de temperatura de anillamiento que favorecerá en cada ciclo a un subconjunto distinto de los cebadores con secuencia al azar.

El resultado de la PCR se comprueba corriendo una pequeña porción (2 μ l) en un gel de agarosa al 1%. Debe observarse una colección de bandas de entre 200 pb y 2 kb.

Tras la realización de DOP-PCR, el producto es reamplificado mediante “Aminolinking PCR”, partiendo de 2 μ l del producto de DOP-PCR en un volumen total de reacción de 50 μ l.

Reactivos y soluciones:

- Solución de Aminolinking: 0.5 ml de Tris-HCl 1M pH 8.5 (50 mM en la solución final), 0.25 ml de MgCl₂ 1M (25 mM en la solución final), 1.67 ml KCl 3M (500 mM en la solución final), 7.58 ml de agua milliQ autoclavada. Filtrar con jeringa y filtro de 0.22 μ m y esterilizar con luz UV durante 30 min.

- El cebador para la reacción de aminolinking PCR debe pedirse a las casas comerciales con modificación amino en el extremo 5', en el carbono C6.

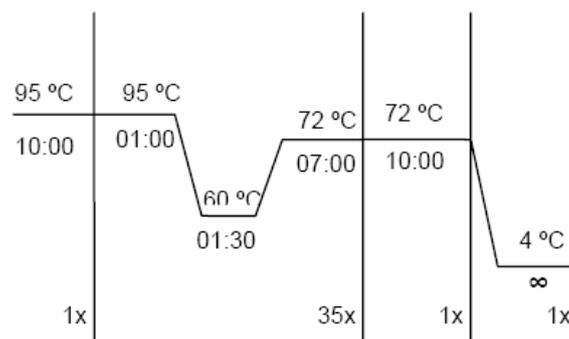
Todos los cebadores una vez recibidos se resuspenden en agua milliQ a una concentración de 100 pmoles/ μ l (100 μ M). A partir de este vial stock se hacen alícuotas de 20 μ M para trabajar con ellas.

Procedimiento

Por cada pocillo de una placa de 96 la reacción comprende:

ADN DOP-PCR	2 µl
(mezcla de los productos DOP1, DOP2 y DOP3)	
Solución Aminolinking	5 µl
Cebador Aminolinking (20 µM)	4.16 µl
dNTPs (10mM cada uno)	1.25 µl
AmpliTaq polimerasa (Applied Biosystems)	0.5 µl
H ₂ O	37.09 µl
Total	50 µl

El programa de PCR es el siguiente:



Se comprueba el resultado de la PCR en un gel de agarosa al 1%. El patrón de bandas debe ser semejante al obtenido tras correr la DOP-PCR ya que la aminolinking PCR es tan solo una re-amplificación de los productos de la DOP-PCR.

A 25 µl de producto de Aminolinking-PCR se le añade 8.3 µl de solución fosfato 1M pH 8.5 y se añaden los volúmenes de estas PCRs a placas de 384 pocillos, que se mantienen a -20°C.

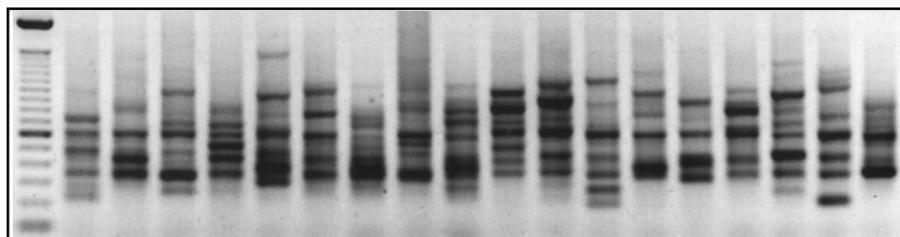


Figura 4. Imagen del producto de varias Aminolinking PCR en un gel de agarosa.

El primer carril es el marcador de peso molecular y el resto son productos obtenidos de la reamplificación de los productos de DOP1-3 PCR de un clon BAC diferente. Los tamaños de los fragmentos generados oscilan entre los 200 pb y las 2 kb.

3.2.1.2 Depósito de los ADN de los BACs sobre un soporte sólido de vidrio con recubrimiento de amino-silano

En general, el proceso de depósito de los ADN en los portas consiste en su colocación ordenada en un portaobjetos, previamente tratado, para que se una a su superficie. El mejor sustrato para realizar los BAC-array es el vidrio debido a su disponibilidad, fácil manejo, baja fluorescencia intrínseca, transparencia, resistencia a las altas temperaturas, rigidez física y a la gran posibilidad de variar el recubrimiento químico de su superficie. La naturaleza no porosa del vidrio hace posible que las muestras que se hibridan tengan contacto directo con los clones evitando una difusión interna y reduciendo los problemas del ruido de fondo.

El depósito de los clones en la superficie del porta ultragaps se realizó mediante la técnica de pin deposition con el robot Microgrid II (Biorobotics Ltd., Cambridge, Inglaterra). En esta técnica se emplean unas agujas o pins que, por capilaridad toma una gota de la solución que contiene la muestra resuspendida, y al hacer contacto el extremo de la aguja con la superficie del array, se imprime una gota en una posición determinada de la superficie. El proceso de depósito requiere unas condiciones idóneas de temperatura, 20-22°C y de humedad, entre el 45 y 55%.

Una vez depositados los clones en el portaobjetos el ADN del clon se fija a la superficie del porta a través de calor. En los ultragaps la unión inicial de los productos de DOP-PCR a la superficie es de tipo electrostático entre los grupos amino del portaobjetos y los fosfodiéster de los clones. Posteriormente por la acción del calor o de la radiación ultravioleta, se generan los enlaces covalentes mediados por una reacción radicaliaria entre los residuos de timidina de los productos de DOP-PCR y los carbonos del aminoalquil del portaobjetos. Después de este proceso es recomendable guardar los portas en un desecador a temperatura ambiente y evitar el contacto directo con la luz.

Procedimiento

Una vez que tenemos las placas de 384 con los productos de DOP-PCR, resuspendidos, se procede al depósito robotizado y por triplicado de estos clones sobre los portaobjetos. Para ser

microdepositada debe precalentarse a 37°C durante unos 5 minutos y ser agitada suavemente durante 5 minutos (en un agitador horizontal).

La microdeposición la realiza el biorrobot “MicroGrid II” (Genomic Solutions). Es necesario ajustar la humedad relativa de la cámara a 45-50%. La microdeposición se hace por triplicados de cada PCR (cada representación de un clon BAC) con una separación entre puntos de 0.225 μm , sobre portas “Codelink” (Surmodics). El biorrobot tiene un programa informático asociado (“TAS Application Suite”) que, tras introducirle los identificadores de cada pocillo del microarray (nombre del clon BAC, posición genómica, etc.) crea en un archivo informático una matriz o malla con la información referente a la identidad y posición de cada punto del microarray, que será utilizada posteriormente en el análisis. Para comprobar que el proceso de depósito ha sido correcto, los portaobjetos se escanean usando el “*scanner GenePix 4000B*” (Axon Instruments, Burlingame, California).

Tras la microdeposición los microarrays creados se mantienen en una atmósfera de humedad saturada al 75%, durante 20-24 horas (en un recipiente hermético con un centímetro de agua y sal en el fondo). De esta manera las “nanogotas” depositadas no se evaporan durante este tiempo, lo cual es de vital importancia para que tenga lugar la reacción química de unión del grupo amino del producto de PCR con los grupos químicos de la superficie del porta.

Una vez pasado este tiempo los microarrays se sumergen en una solución al 1% de Amoniaco en agitación suave (100 rpm) durante 5 minutos. De este modo se bloquean los grupos químicos que no han reaccionado con el ADN depositado. Tras ello se lavan 2-3 veces los portas con agua destilada y se sumergen en una solución de 0.1% SDS en agua, en agitación suave (100 rpm) durante 5 minutos.

De ahí los portas se pasan directamente a agua milliQ hirviendo, lo que causa que las hebras de ADN se separen, obteniéndose un microarray compuesto principalmente de cadenas de ADN simples, con una mayor capacidad de hibridación. Tras un par de lavados en agua los portas se secan por centrifugación y se almacenan en un desecador (la ausencia de humedad es muy importante para el almacenamiento durante 1 año).

3.2.2 Preparación del ADN para la hibridación (sonda)

El siguiente apartado en el proceso del array genómico es la preparación de la sonda que posteriormente se hibridará sobre el array

3.2.2.1 Extracción y purificación del ADN

La extracción de ADN a partir de tejido fresco tumoral se utilizó el kit comercial *QIAMamp® DNA Mini Kit* (QIAGEN). El ADN de referencia, es un pool de 100 muestras de ADN individuos sanos (50 hombres y 50 mujeres) obtenidos del Banco Nacional de ADN de Salamanca tras aprobación del Comité Científico Externo del Banco Nacional de ADN.

Reactivos y Soluciones:

El kit está compuesto por columnas de purificación, tubos colectores, soluciones de lavado AW1 y AW2, solución ATL, solución AL y proteinasa K. Etanol absoluto (Merck)

Procedimiento

1. Pesar 50 mg de células disgregadas del tejido fresco.
2. Añadir 360 µl de buffer ATL y 40 µl de proteinasa K
3. Incubar en un baño a 56°C durante toda la noche para que la proteinasa K digiera todo el tejido. Si se ha obtenido una buena digestión, continuar con la extracción, si no se debe dejar más tiempo a 56°C.
4. Añadir 400 µl de la solución AL al tubo cónico. Remover por agitación durante 15 segundos. Incubar durante 10 minutos a 70°C.
5. Agregar 400 µl de etanol absoluto. Agitar durante 15 segundos. Añadir 500 µl de la solución AW1 y pasar a las columnas de purificación.
6. Centrifugar 1 minuto a 8.000 rpm
7. Descargar el contenido del tubo colector. Añadir 500 µl de la solución AW2.
8. Centrifugar durante 3 minutos a 14.000 rpm. Repetir el proceso de centrifugación si la columna no ha quedado suficientemente seca.
9. Colocar la columna en un tubo estéril y añadir 100 µl de solución AE.

10. Dejar hidratando la columna durante 5 minutos a temperatura ambiente.
11. Centrifugar durante 1 minuto a 8.000 rpm para obtener el ADN.
12. Testar en un gel de agarosa al 1% y medir la concentración en el espectrofotómetro. . El ADN debe presentar una ratio mínima 260/280 de 1.70 y una ratio 260/230 de al menos 1.6. Almacenar a -20°C. (Figura 5).

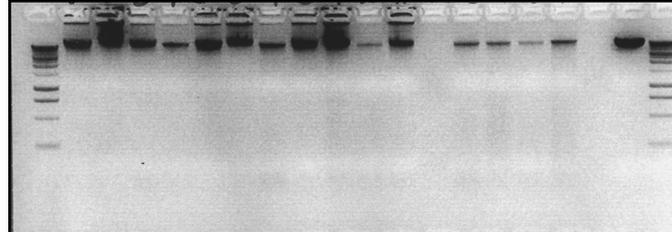


Figura 5. Imagen del gel de agarosa de los ADN procedentes de material fresco congelado.

En la figura se representan el marcador de peso molecular (carril de la izquierda) y los diferentes ADNs extraídos a partir de material fresco congelado (parte derecha de la figura).

3.2.2.2 Marcaje del ADN

El marcaje consiste en una reacción tipo “Random Priming” para lo cual se utilizan oligonucleótidos de secuencia al azar (“Random Octamers”) resuspendidos en el tampón de reacción de la enzima DNA polimerasa de marcaje, “Exo-Minus Klenow”.

Al ADN desnaturalizado se le unen los *Random Primers*. Estos cebadores se unen aleatoriamente al ADN y van extendiendo la hebra en una reacción de polimerización empleando elevadas concentraciones de la enzima *Exo-klenow* polimerasa I, nucleótidos sin fluorescencia y nucleótidos marcados con fluorescencia. El producto resultante tiene una elevada incorporación de nucleótidos fluorescentes y una amplificación de 7 a 10 veces más del material de partida. La enzima *Exo-Klenow* polimerasa I va realizando cortes en la hebra previamente desnaturalizada del ADN mediante su actividad exonucleasa 3'- 5'. Además esta enzima posee actividad 5'- 3' para sintetizar junto con los cebadores y la mezcla de nucleótidos una nueva hebra de ADN a la que se van incorporando de forma aleatoria los fluorocromos (Cy3 y Cy5).

Reactivos y Soluciones:

- Random Primers (cebadores oligodesoxirribonucleótidos. (Thermo VWR)
- 10x dCTPmix (2mM dATP, dGTP, dTTP y 1mM dCTP)(Eppendorf HUCOA)
- Exo-Klenow [50U/μl] (Epicentre Ecogen)
- Buffer Stop (0,5 M EDTA pH 8.0)
- Cy3 – dCTP (Cianina 3- dCTP) (CyDye™ 3- dCTP. Amersham Biosciences)
- Cy5 - dCTP (Cianina 5- dCTP) (CyDye™ 5- dCTP. Amersham Biosciences)

Procedimiento

1. Se parte de 500 ng de ADN, tanto de la muestra tumoral como de referencia.
2. La reacción de marcaje se compone de:

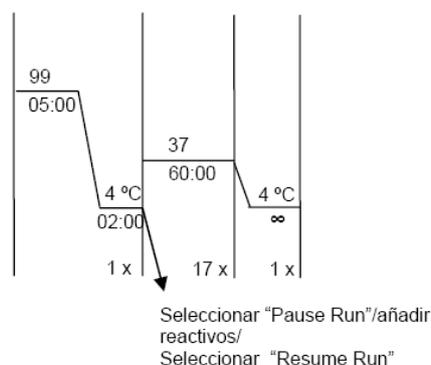
Agua	21 – x μl
ADN (x = volumen correspondiente a 500 ng)	x μl
NaCl 1M	1 μl
“Random Octamers” en solución de reacción 2.5x	20 μl

3. Incubar 5 minutos a 99°C
4. Retirar los tubos del termociclador, pasar a hielo y añadir:

Solución 10x dCTPmix	5 μl
dCTP-Cy3 o dCTP-Cy5	2 μl
Enzima Exo-Minus Klenow	1 μl

La muestra tumoral se marca con el fluorocromo Cy5 y la muestra de referencia con Cy3.

5. Programa de marcaje para el termociclador (iCycler, BIO-RAD):



Tras esta incubación inicial, se continúa el programa de marcaje que incluye una incubación durante 18 horas.

6. Añadir 5 µl de EDTA 0.5 M pH 8.0 para bloquear la reacción

3.2.2.2.1 Purificación de la sonda marcada

Mediante este proceso se eliminan los nucleótidos fluorescentes que no se hayan incorporado, así como el resto de los componentes de la reacción que no se han utilizado durante el transcurso de la misma.

Reactivos y soluciones:

Kit de columnas “G-50 Microspin Columns” (Amersham, GE)

Procedimiento

Se preparan las columnas sometiéndolas a vórtex y centrifugándolas a 735 G durante 1 minuto, para eliminar el tampón de equilibrado. Tras ello se aplica la muestra sobre la resina, con la columna situada sobre un microtubo opaco (para proteger al ADN finalmente marcado de la luz) y centrifugar durante 2 minutos a 735 G.

3.2.3 Hibridación de las sondas sobre el BAC-array

El último paso es la hibridación competitiva junto con ADN Cot-1 humano de los ADNs marcados con los fluorocromos sobre el BAC-array. Ambos componentes de la hibridación necesitan del pretratamiento para que la hibridación se efectúe de forma adecuada.

Reactivos y Soluciones:

- ADN Cot-1 humano [1µg/µl]: Cot Human DNA (Invitrogen)
- Acetato sódico 3M pH 5.2
- Etanol absoluto y etanol al 80% (Merck)
- Yeast- tRNA [50mg] (Invitrogen)
- Esperma de arenque. (Sigma)

- Solución de hibridación: 25 ml Formamida (50% Formamida) (Merck), 5 g Dextrán Sulfato (10% Dextrán sulfato, SIGMA), 50 µl Tween 20 (0.1% Tween 20) (Sigma), 5 ml SSC 20x (2x SSC), 500 µl Tris 1M pH 7.4 (10 mM Tris pH 7.4)
- Solución humidificadora: 40 ml Formamida (20% Formamida), 10 ml 20xSSC (2xSSC), 50 ml H₂O.

Procedimiento

1. Tubo 1 Muestra: Todo el producto marcado con Cy5 purificado, todo el producto marcado con Cy3 purificado y 100µl de Cot-1
Tubo 2 Muestra de referencia: 80 µl de esperma de salmón, 80 µl de Cot-1
1. Añadir el 10% del volumen total de la mezcla anterior, de acetato sódico 3M, pH 5.2. Añadir 2.5 volúmenes de etanol al 100% (-20°C)
2. Incubar 30 minutos a -80°C
3. Centrifugar 20 minutos a 13.200 rpm a 4°C.
4. Decantar y añadir 500 µl de etanol al 70% frío (-20°C)
5. Centrifugar 5 minutos a 13.200 rpm a 4°C
6. Decantar y dejar secar totalmente el sedimento.
7. Añadir
Tubo 1: 84 µl solución de hibridación, 6 µl de *Yeast- tRNA*
Tubo 2: 90 µl de solución de hibridación
8. Incubar 15 minutos a 70°C.
9. Aplicar la solución de prehibridación (tubo 2) sobre el BAC-array y cubrir con un cubreobjetos de 24x60mm.
10. Introducir las preparaciones en la cámara de hibridación (papel de celulosa empapado con la solución humidificadora). Incubar a 37°C en la estufa durante 1 hora y 30 minutos.
11. El tubo 1 con la mezcla de ADN se incuba a 37 °C durante 1 hora y 30 minutos.

3.2.3.1 Hibridación

La hibridación del BAC-array junto con la sonda, se realizó de la siguiente manera

- Sacar el porta de la cámara de hibridación, retirar el cubre y aplicar la mezcla de hibridación.
- Introducir de nuevo el porta en la cámara de hibridación.

- Incubar a 42°C durante 48 horas.

3.2.3.2 Lavados post-hibridación

Reactivos y soluciones:

- Solución de lavado 1: 65 ml Formamida (50% Formamida), 13 ml SSC 20x (2x SSC), 52 ml H₂O milliQ Ajustar a pH7.

- Solución de lavado 2: 350 ml PBS, 350 µl Tween 20 (0.1% Tween 20)

Procedimiento

En una cubeta de vidrio se añaden 130 ml de solución de lavado 2 y se agita 10 minutos en un agitador horizontal a 250 rpm. Se pasa luego a una segunda cubeta, con 130 ml de solución de lavado 1 precalentada, que se agita esta vez durante 30 minutos a 48°C, tras lo cual se repite el primer lavado en solución 2. Por último se secan los portas por centrifugación (1500 - 2000 rpm, listos para ser escaneados).

3.2.4 Adquisición de las imágenes

Una vez finalizado el proceso de hibridación, el BAC-array se escaneó simultáneamente a 532 y 635 nm, longitudes de onda para el Cy3 y Cy5 respectivamente, usando el escáner GenePix 4000 B (Axon Instruments, Burlingame, California, EEUU).

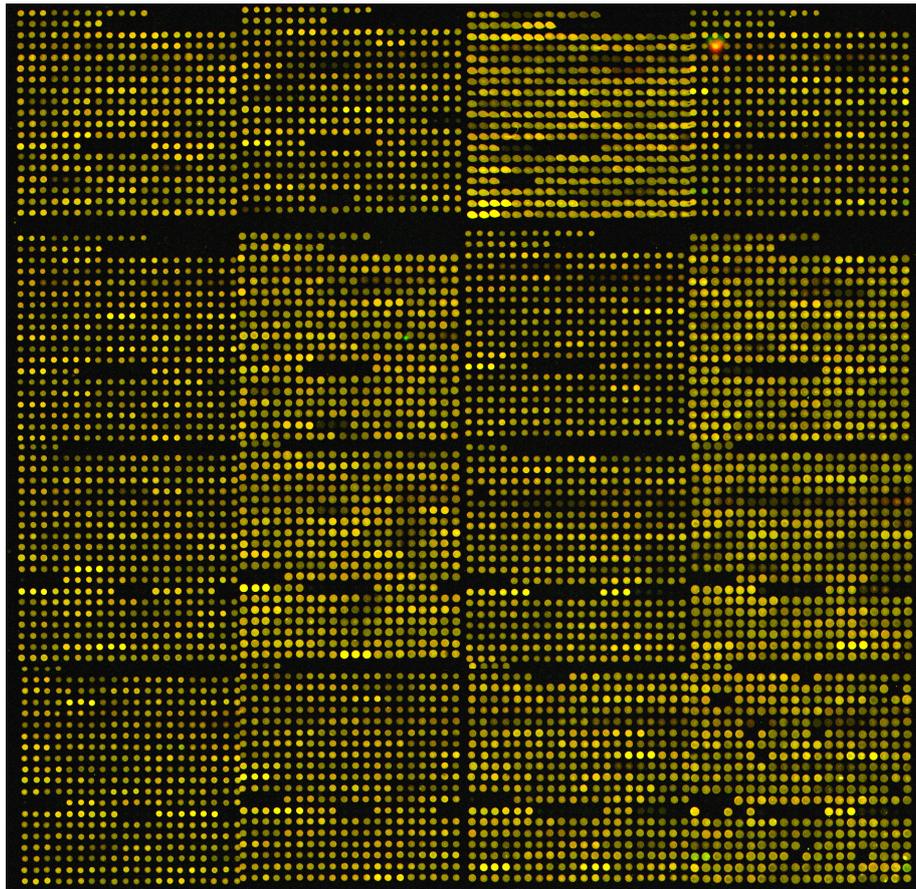


Figura 6. Ejemplo de una imagen adquirida tras el proceso de escaneado del BAC-array de la “librería Sanger 1Mb clone set”, hibridado con el ADN marcado de una muestra tumoral.
La imagen corresponde a la mitad del microarray completo (compuesto por otro cuadrante similar de 16 bloques de puntos)

3.2.5 Análisis de los datos de los aCGH

Los microarrays hibridados son escaneados en un equipo “Axon 3000B” (Axon laboratories), que obtiene las intensidades de señal de cada canal de fluorescencia y exporta multitud de datos numéricos, entre ellos el valor \log_2 ratio (ratio de las señales logaritmizada en base 2). El primer procesado de los datos crudos se hace con el programa informático “GenePix” (Molecular Devices): cada microarray es normalizado usando la media de la mediana de los ratios de todos los clones correspondientes a secuencias de cromosomas autosómicos y sin incluir los puntos marcados como de baja calidad, para lo cual se han establecido unos criterios de intensidad mínima de señal (“flagging scripts” implementados en GenePix). En aquellos casos en que este método de normalización es claramente incapaz de centrar correctamente la gráfica (lo cual pasa cuando se obtiene una gráfica especialmente

alterada) se recurre a renormalizar los datos usando la mediana del valor \log_2 ratio de las regiones no alteradas, tomando como referencia el estado de los cromosomas X e Y.

Los archivos “.gpr” producidos por el programa informático Genepix son posteriormente sometidos a análisis bioestadístico y bioinformático en R³⁰⁰, haciendo uso de los paquetes “snapCGH”³⁰¹ y “CGHcall”³⁰², obtenidos del repositorio bioinformático “Bioconductor”³⁰³. El paquete “CGHcall” permite realizar el siguiente procesamiento de los datos:

- Segmentación de los datos, reduciendo su complejidad de modo que se establecen fragmentos de genoma con un mismo estado de número de copia. Aunque en el paquete se implementan varios algoritmos de segmentación, en este trabajo se ha usado “DNAcopy”, basado en el algoritmo de segmentación binaria circular³⁰⁴, puesto que, a pesar de que los algoritmos basados en modelos de markov oculto (“hidden markov model”, HMM) están más extendidos, se ha demostrado que la segmentación binaria circular tiene un mejor rendimiento³⁰⁵.

- Proceso de “calling”, mediante el cual se atribuye a los segmentos genómicos establecidos por el algoritmo de segmentación un estado de número de copia respecto al estado 0 (sin alteración de número de copia). Para ello el programa realiza comparaciones en los datos intra e inter muestra. Permite además introducir un valor de porcentaje de celularidad tumoral para cada muestra.

Para un procesamiento posterior de los datos se utilizan los siguientes paquetes de Bioconductor:

- “CGHregions”³⁰⁶, que realiza una reducción de la complejidad de los datos al eliminar los valores de los clones intermedios de cada segmento, manteniendo el valor final de estado de número de copias del segmento y su posición genómica (del primer y último clon BAC del segmento).

- “WECCA”³⁰⁷, paquete especialmente diseñado para estudios de clusterización jerárquica a partir de los datos de los estudios de ANC, que contempla las peculiaridades de este tipo de datos (los valores procesados por el algoritmo de “calling” se reducen a pérdida, ganancia, amplificación, lo cual no sucede con datos de expresión, que presentan valores continuos).

- “CGHtest”³⁰⁸, utilizado en las correlaciones con los datos clínicos. Incluye los “scripts” “CGHPermutations”, que permite encontrar las alteraciones genómicas de número de copia distintivas de un subgrupo clínico (comparaciones pareadas o múltiples, hace uso de pruebas no paramétricas), y “CGHlogrank”, que establece el impacto en supervivencia de cualquier alteración detectada, mediante un estudio Kaplan-Meier Log-Rank. Aparte de los test estadísticos citados, ambos “scripts” establecen una tasa de falsos positivos (“false discovery rate”, FDR) mediante miles de permutaciones de los elementos respecto a los grupos definidos por el usuario.

- El “script” “CGH altered genome”³⁰⁹, permite valorar el tamaño global del genoma afectado por alteraciones genómicas de número de copia partiendo del archivo generado por el paquete “CGHcall”. El “script” comienza numerando ordinalmente cada segmento definido por el algoritmo “DNAcopy”, cromosoma por cromosoma, y calculando su tamaño (la posición genómica del último BAC del segmento menos la posición del primer BAC). Calcula después el tamaño genómico total que conforman todos los segmentos a los que el algoritmo de “calling” ha atribuido un estado de número de copia alterado (pérdidas y ganancias), así como el número total de estos segmentos, parámetro al que llamaremos número total de alteraciones de número de copia (NTA) finalmente, calcula el porcentaje que el tamaño total de genoma alterado representa, en cada muestra, respecto al tamaño total de genoma representado en el BAC-array, parámetro al que llamaremos porcentaje de genoma alterado (PGA).

3.3 Elaboración de las matrices tisulares

Para el presente estudio, construimos cuatro matrices tisulares en las que se incluyeron:

- a) 157 piezas de gastrectomía correspondientes a tumores primarios y 97 ganglios metastáticos.
- b) Se incluyeron muestras de tejido normal: mucosa de estómago, ganglio linfático, próstata, páncreas y amígdala
- c) Controles positivos de reactividad conocida: Cáncer de mama, linfoma de alto grado y cáncer de pulmón.

3.3.1 Selección de muestras

Para la selección de muestras se utilizaron las preparaciones teñidas con Hematoxilina-Eosina (H&E) y los bloques de parafina correspondientes a dichos cristales. Posteriormente se realizó lo siguiente:

1. Con ayuda del microscopio y sobre las preparaciones con H&E, se hizo la selección de las dos zonas más representativas de cada tumor, que cumplieran con las características morfológicas propias de un ADC gástrico de acuerdo a los criterios descritos por Lauren.
2. Esto mismo se realizó con los bloques de parafina que contenían los demás focos tumorales de las afectaciones ganglionares.

3.3.2 Protocolo para la construcción de las matrices de tejidos

Previo a la construcción de la matriz tisular, se preparó el siguiente material:

1. Bloques de parafina seleccionados.
2. Plantilla indicando la posición exacta de cada muestra de adenocarcinoma gástrico, los controles positivos y los tejidos normales.
3. Bloque de receptor de parafina blanca.

Una vez preparado el material así como la puesta a punto de las medidas en los X e Y en el equipo (MTA-1 *Manual Tissue Arrayer*, Beecher, Instruments, USA) utilizado para la construcción de las matrices tisulares, procedimos a la construcción de las mismas, siguiendo los pasos que describimos a continuación (Figura 7).

1. En primer lugar se alisa la superficie del bloque receptor antes de empezar a introducir los cilindros de tejido, desbastando un poco el bloque de parafina en el microtomo para que así todos los cilindros tengan el mismo ángulo. Colocamos el bloque receptor en la base del equipo y lo fijamos correctamente.

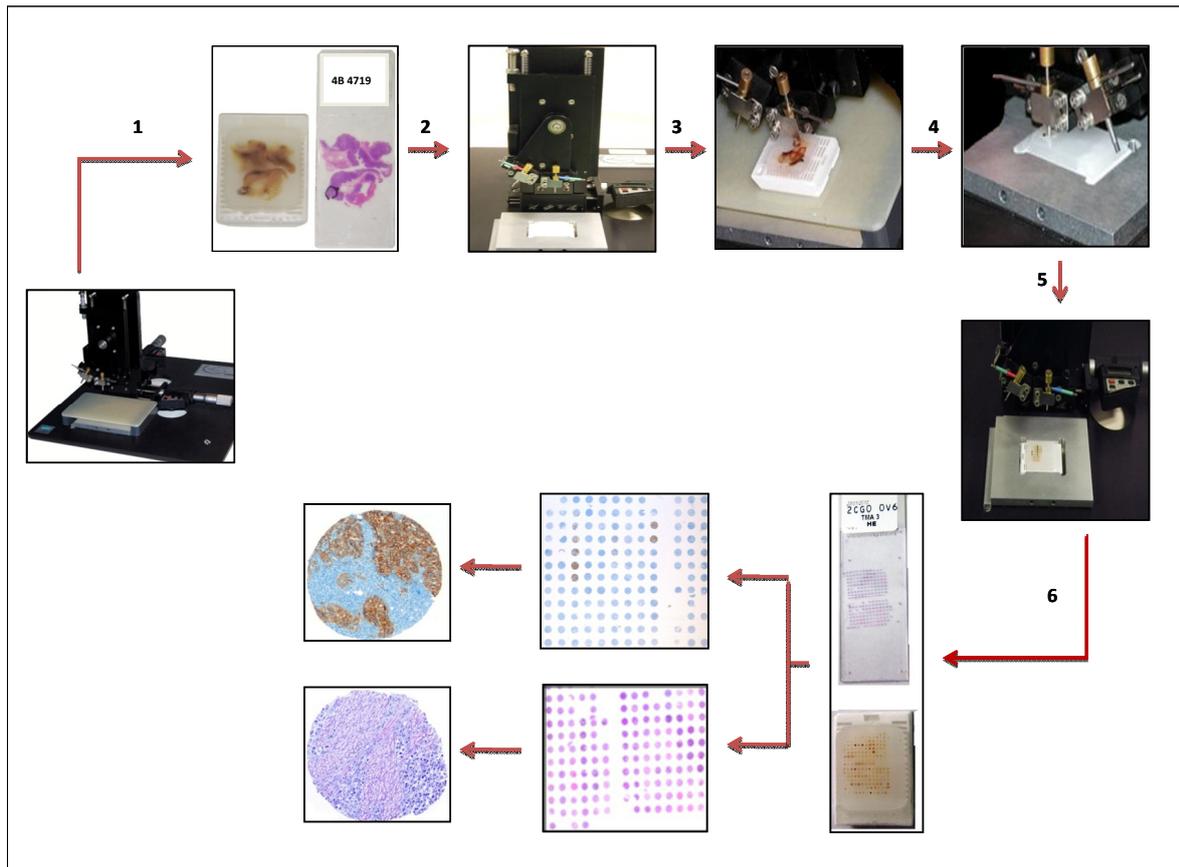


Figura 7. Esquema general de la construcción de un array de tejidos.

1. Selección de la muestra 2. Bloque receptor 3. Perforación del bloque de parafina donante. 4. Inserción y ajuste del cilindro de tejido en el bloque receptor 5. Bloque de parafina tissue array. 6. Tissue array y su correspondiente hematoxilina.

2. Se elige el juego de agujas apropiado, en este caso de 0.6 mm de diámetro. Situamos a la izquierda la más gruesa que tomaría el cilindro de tejido del bloque donador y, a la derecha, la aguja que perforara el bloque receptor.
3. Ajustar a cero los micrómetros que fijaran la alineación de las filas y columnas de los cilindros.
4. Realizar la primera perforación en el bloque receptor.
5. A continuación colocar el bloque de tejido donador sobre el puente, cambiar de aguja y tomar el tejido tumoral o normal demarcado.
6. Retirar el puente con el bloque donador y expulsar el cilindro de tejido exactamente encima del orificio hecho en la parafina, sin hundirlo. Colocar encima del orificio un portaobjetos para alisar la superficie del cilindro y nivelarla con la parafina.
7. Cambiar la medida del micrómetro a la siguiente posición para hacer la siguiente perforación con la respectiva aguja.

8. Todo este procedimiento se realiza sucesivamente hasta completar un total de 13 cilindros por fila, obteniéndose un total de 17 columnas por bloque, con 2 mm de separación entre cada cilindro. Cada bloque de parafina o matriz de tejido, constituye un total de 212 cilindros.
Obteniéndose un total de 4 matrices de tejido (tres matrices de tejido de 129 muestras y una matriz de tejido de 28 muestras).
9. Una vez terminado el bloque, de la matriz de tejido, éste se introdujo en una estufa a 60°C por 10 minutos, lo cual permitió que la parafina de los cilindros de tejido se mezclara con la parafina del bloque receptor.
10. Transcurrido el tiempo se extrajo el bloque de la estufa y se dejó enfriar a temperatura ambiente, evitando así cambios bruscos de temperatura.
11. Por último se realizaron cortes de 3µm de grosor de cada bloque de matrices de tejido, mediante un microtomo; una vez cortado el bloque de matrices de tejido, las preparaciones fueron cubiertas con una capa de parafina para su conservación.

Estos cuatro tissue microarrays fueron utilizados para la realización de estudios de FISH e inmunohistoquímica.

3.4 Hibridación in situ fluorescente

Esta técnica se ha utilizado para el análisis de la inestabilidad cromosómica, para la validación de regiones detectadas por aCGH. Como sondas para FISH se utilizaron sondas comerciales específicas de locus (Vysis Inc., Chicago, IL, USA) de las regiones 4p16.3/*WHSC1*, 7p12/*EGFR*, 7q31/*D7S486*, 13q14/*RBI*, 13q34/*LAMP1*, 17p13/*TP53*, 17q11/*HER2*, 17q21/*TOP2A*, 20q13.2/*ZNF217* y sondas no comerciales a partir de BACs marcados por Nick Translation mediante marcaje directo (Ver apartado 3.4.1). Los clones BAC empleados en este trabajo fueron: RP5-973N23 (41802166 - 41918671pb) para el mapeo de 6p21.1/*CCND3* y CTD-2174 F1 (25309396 - 25423472) para 12p.1/*KRAS*. (Figura 8-9).

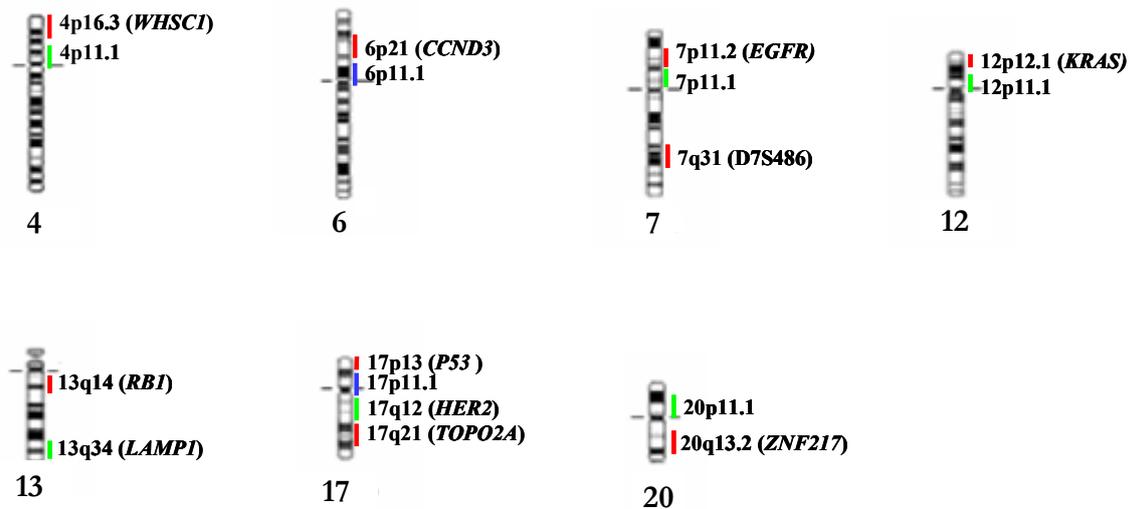


Figura 8. Conjunto de sondas de ADN de secuencia homóloga a genes, locus y centrómeros de siete cromosomas diferentes marcados en tres tipos de fluorescencia (verde, roja y azul).

Las líneas verdes, rojas y azules corresponden a los fluorocromos Spectrum Green, Spectrum Orange y Aqua respectivamente.

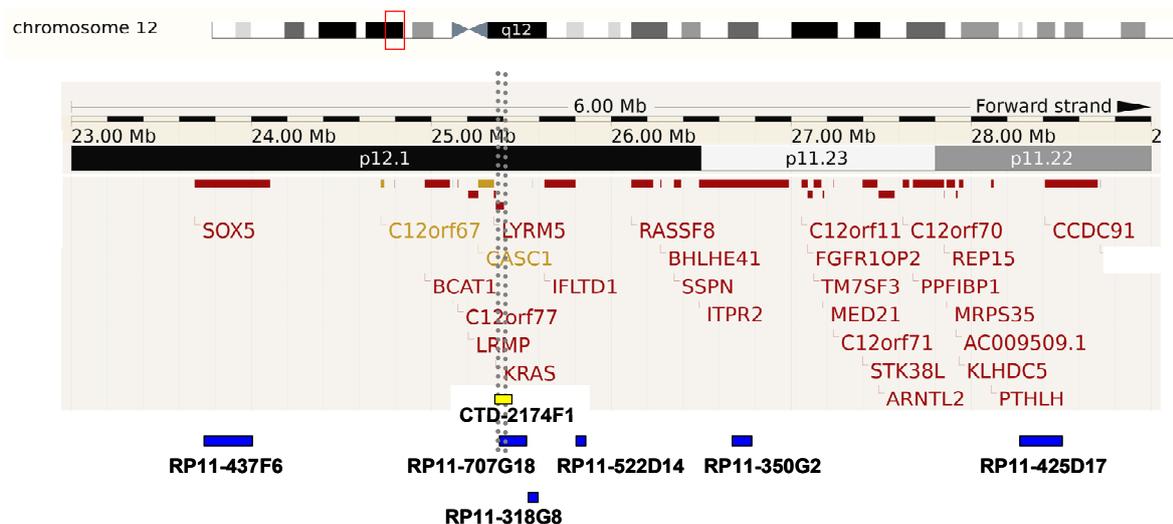


Figura 9. Esquema representativo del BAC CTD-2174F1 que localiza en la región 12p12.1 y contiene el gen *KRAS*.

Las líneas azules corresponden a los BAC del aCGH que identifican esta región y amarillo al BAC CTD-2174F1

3.4.1 FISH: Marcaje directo de sondas no comerciales mediante *nick translation*.

El ADN de las bacterias se extrajo con una lisis alcalina estándar con el kit comercial de Qiagen mediante minipreps (Qiagen Plasmid mini Kit), siguiendo el protocolo del proveedor. El ADN clonado fue marcado mediante *nick translation* con spectrum Green dUTP o Spectrum Orange dUTP, mediante el kit de marcaje directo de Abbott a partir de 1µg de ADN.

Reactivos y soluciones:

- 0.2 mM Spectrum Green dUTP (Abbott Molecular)
- 0.2 mM Spectrum Orange dUTP (Abbott Molecular)
- *FISH nick translation kit* (Abbott Molecular Inc): nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), Buffer Nick (10XNT) y enzima.

Procedimiento

1. Las cantidades de los reactivos utilizados están calculados para realizar el marcaje de 1µg de ADN con lo que se obtiene un total de 50 µl de la mezcla de reacción. Todo el proceso debe hacerse en frío

- ADN [1 µg]	X µl
- 10xNT	5 µl
- dNTP	10 µl
- dTTP	5 µl
- Spectrum Green/Orange	2.5 µl
- H ₂ O (ajustar hasta 50 µl)	Y µl
- Buffer Nick	5 µl
- Enzima	5 µl

2. Incubar la mezcla aproximadamente 16 horas a 15°C.

3. Colocar los tubos eppendorf en el congelador a -20°C durante 10-15 minutos.

4. Valorar la digestión de la sonda en un gel de agarosa al 2%. Si la digestión es adecuada, se observará un *smear* entre 300 - 600 pb. Si se aprecia una banda de ADN sin cortar se añade de nuevo enzima y se vuelve a incubar durante 1 hora más.
5. Si el tamaño de la sonda es el deseado, en torno a 300 pb, se inactiva la enzima incubando en un baño durante 10 minutos a 70°C.
6. Precipitar el ADN marcado y purificar

Reactivos y soluciones:

- Sonda de ADN marcada con “spectrum green” o “spectrum orange”
- ADN Cot-1 humano (Roche)
- Acetato sódico 3M, pH 5.2
- Etanol al 100% a -20°C y etanol al 80% a temperatura ambiente (Merck)

Procedimiento

1. Colocar en un tubo 1 µg de sonda y 10 µl Cot-1.
2. Precipitar la sonda añadiendo 10 µl de acetato sódico 3M pH 5.2 y 250 µl Etanol al 100% - 20°C. Mezclar bien e incubar -80°C durante 30 minutos.
3. Centrifugar a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
4. Decantar el sobrenadante. Añadir 250 µl de etanol al 80% y centrifugar a 10.000 rpm durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y dejar secar.
5. Resuspender el ADN con 11µl de agua precalentada a 70°C.

Como resultado se obtiene la sonda marcada de forma directa a una concentración aproximada de 90 ng/µl. A continuación se puede utilizar en la hibridación o almacenar a - 20°C.

Las sondas *KRAS* y *CCND3* han sido evaluadas en forma individual y en conjunto para confirmar su hibridación específica. Para excluir toda hibridación cruzada en cromosomas que no fueran el cromosoma 12 y 6 respectivamente, se realizaron estudios en extendido metafásicos. Un total de 5 extendidos metafásicos se evaluaron para realizar hibridación específica de las mezclas de sondas de ADN *KRAS* y CEP-12, ADN *CCND3* y CEP-6. En la totalidad de los 5 casos, la hibridación fue específica para el cromosoma 12 y 6

respectivamente. En ninguno de ellos se observó hibridación cruzada en locus de otros cromosomas.

3.4.2 Procedimiento FISH

El protocolo de esta técnica se puede subdividir en 3 apartados: pre-hibridación, hibridación y post-hibridación. A continuación se describen los pasos realizados sobre los cortes de parafina de las matrices de tejido de 3µm de grosor.

3.4.2.1 Pre-hibridación

Reactivos y soluciones:

- Pepsina (Sigma)
- Formaldehído 1%
- Etanol al 70%, etanol al 80% y etanol al 100% (Merck)
- Solución de Pretratamiento Dako
- Xilol

Procedimiento

1. Colocar las preparaciones en la estufa a 65°C por 24 horas.
2. Solución de pepsina: precalentar en un baño a 37°C.
3. Solución de pretratamiento: precalentar en un baño a 99°C.
4. Desparafinar los portaobjetos en Xilol 3 veces x 10 minutos.
5. Lavar con etanol al 100%, 80% y 70% durante 5 minutos.
6. Lavar con abundante H₂O destilada.
7. Colocar los portaobjetos en un recipiente con la solución de pretratamiento durante 10 minutos.
8. Lavar los portaobjetos con 2xSSC.
9. Incubar los portaobjetos en una solución de pepsina al 0.1mg/ml 0.01 N de HCl, durante 10 minutos en un baño a 37C en agitación.
10. Lavar los portaobjetos con 2xSSC durante 5 minutos a temperatura ambiente.

11. Introducir los portaobjetos en una jarra couplin con formaldehído al 1% durante 10 minutos a temperatura ambiente.
12. Lavar los portaobjetos con 2xSSC durante 10 minutos a temperatura ambiente.
13. Deshidratar los portaobjetos en etanol al 70%, 80% y 100%, incubándolos 5 minutos en cada recipiente y posteriormente dejarlos secar a temperatura ambiente.
14. Agregar 10µl de la sonda sobre el portaobjetos.
15. Cubrir con un cubreobjetos y sellar con pegamento.

3.4.2.2 Hibridación

Introducir las preparaciones en la estación de hibridación HYbrite (Vysis) para la realización de la desnaturalización de la sonda, 75°C durante 6 minutos, y de la hibridación, 16 horas a 37°C.

3.4.2.3 Post-hibridación

Reactivos y Soluciones

- Formamida al 50% / 2XSSC pH 7.0
- Solución de contratinción: DAPI (4,6 – diamidino – 2- fenilindol)
- “*Vectashield*” (Laboratorios Vector)

Procedimiento

1. Precalentar la solución de formamida al 50% en un baño a 46°C.
2. Eliminar suavemente el pegamento con unas pinzas e igualmente los cubreobjetos de las preparaciones, introducirlas en el recipiente que contiene la solución de formamida 50% a 46°C durante 5 minutos.
3. Realizar un lavado de 2 minutos en la solución de 2XSSC
4. Mantener en DAPI durante 2 minutos y añadir “*Vectashield*”[®]. Mantener las preparaciones a 4°C y protegidas de la luz.

3.4.3 Criterios de evaluación

El número de señales de hibridación/célula se cuantificó utilizando un microscopio de fluorescencia (Leitz Wetzlar, Alemania) equipado con un objetivo de inmersión de 100x; se realizó un conteo de 100 núcleos no solapantes de células tumorales por muestra.

Las diferentes alteraciones numéricas en los diferentes genes fueron definidas por la pérdida, ganancia o amplificación de las correspondientes señales de fluorescencia en más del 15% de los núcleos³¹⁰, para establecer un intervalo de resultados se analizó la frecuencia de aparición de células con un número de señales de hibridación de bajo o alto (respecto a lo esperado), en un grupo de tejidos normales incluidas en los tissue microarrays.

El análisis del estado de los genes objeto del estudio se realizó teniendo en cuenta el número de copias de cada gen respecto al número de copias del centrómero del cromosoma en el que se localiza. En lo que se refiere al número de copias de *EGFR* y del centrómero del cromosoma 7 se realizó siguiendo los criterios de Hirsch *et al*³¹¹. Se realizó la siguiente categorización basada en los criterios descritos en la literatura^{97,311-315} (Tabla 8).

Tabla 8. Criterios FISH para la alteración en el número de copias de los diferentes marcadores genéticos.

Estado	Descripción
Normal	Igual número de señales específicas del gen que señales del centrómero. Ratio de señales del gen específico frente a señales del centrómero >0.8 a <1.2
Ganancia	El número de señales específicas del gen entre 1 a 4 veces más en relación con el número de señales del centrómero Ratio de señales del gen específico frente a señales del centrómero ≥ 1.2
Delección	Una señal específica del gen y al menos 2 señales del centrómero Ratio de señales del gen específico frente a señales del centrómero ≤ 0.8
Amplificación	El número de señales específicas del gen es más de 4 veces el número de señales del centrómero. Numerosas señales (más de 10) separadas como (sucede con los dobles minutos) o un cluster de señales compacto o en forma de cadena (HSR). Ratio de señales del gen específico frente a señales del centrómero ≥ 2 .

3.5 Inmunohistoquímica

En nuestro trabajo la técnica de inmunohistoquímica fue realizada en los cortes de tejido embebidos en parafina obtenidos de los tissue microarrays. Todas las tinciones inmunohistoquímicas fueron llevadas a cabo en la plataforma automática Leica Bond III™ (A. Menarini Diagnostics, San Diego, USA). A continuación, se describe el protocolo seguido para la realización de la técnica: Bond System (Leica Microsystems (UK) Ltd, Milton Keynes UK). El estudio para la determinación de la proteína HER2 en la plataforma automatizada BenchMark ULTRA® (Ventana Medical Systems, Inc, Tucson, AZ).

Procedimiento

- Colocar las preparaciones en la estufa a 65°C durante 24 horas.
- Colocación de los portaobjetos, con sus controles correspondientes, en el teñidor automático, en donde siguen el siguiente proceso:
 - Incubación con *Bond Dewash solution* durante 10 minutos a 72°C.
 - Rehidratación en una serie de alcoholes decrecientes.
 - Lavado con Bond Wash Solution.
 - Incubación con *Bond Epitope Retrieval 1* durante 15 minutos.
 - Lavado con Bond Wash Solution.
 - Incubación con Peroxide Block al 3% durante 10 minutos.
 - Lavado con Bond Wash Solution.
 - Incubación con el anticuerpo primario.
 - Lavado con Bond Wash Solution.
 - Incubación con Post-Primary durante 8 minutos.
 - Lavado con Bond Wash Solution.
 - Incubación con Bond Polymer durante 8 minutos.
 - Lavado con Bond Wash Solution.
 - Incubación con Mixed DAB Refine durante 10 minutos.
 - Lavado con agua destilada.
 - Contratación con hematoxilina de Harris.
 - Lavado con agua destilada.
 - Lavado con Bond Wash solution.
 - Lavado con agua destilada.
- Deshidratar y montar: Deshidratación en alcoholes de gradación creciente, inmersión en xilol y montaje permanente con “DEXPEX” (Merck).

El proceso descrito anteriormente es el indicado por el fabricante del procesador, por tanto, es el mismo para todos los anticuerpos estudiados. Lo que varía es el tiempo de incubación del anticuerpo primario, y la dilución, que son diferentes para cada anticuerpo. La tabla 9 muestra las características de cada uno de los anticuerpos utilizados.

Tabla 9. Características técnicas de la metodología inmunohistoquímica.

	HER2/neu	p53	p21^{WAF1/Cip1}	EGFR
Casa comercial	Ventana	Novocastra (Newcastle, UK)	Master Diagnostica (Granada, España)	Dako (Glostrup, Dinamarca)
Clon	4B5	DO-7	CP74	2-18C19
Tipo	Monoclonal	Monoclonal	Monoclonal	Monoclonal
Recuperación antigénica	CC1	Bond Epitope Retrieval Solution1	Bond Epitope Retrieval Solution1	Proteinasa K
Dilución	Prediluido	1/100	1/50	Prediluido
Tiempo de incubación (min)	16	8	8	30
Método de visualización	Ultraview Universal DAB	Bond Polymer Refine Detection	Bond Polymer Refine Detection	Bond Polymer Refine Detection
Expresión	Membrana	Nuclear	Nuclear	Membrana

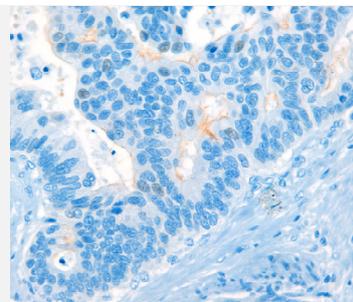
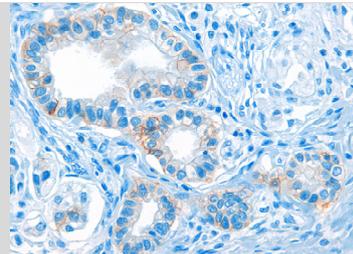
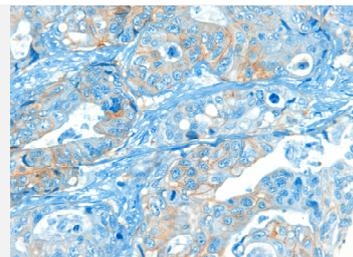
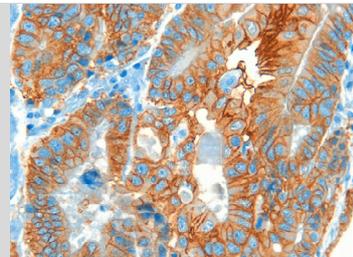
3.5.1 Valoración de la expresión Inmunohistoquímica

Realizamos el estudio semicuantitativo de la expresión de las distintas moléculas objeto del estudio. Siguiendo criterios previamente establecidos^{311,316,317} cuantificamos el porcentaje de células positivas para el anticuerpo utilizando la intensidad de la tinción, teniendo en cuenta la localización celular (membrana, núcleo) y las características de la expresión del anticuerpo estudiado. La expresión inmunohistoquímica, fue evaluada tanto en los focos tumorales como en las afectaciones ganglionares, observando los siguientes patrones de tinción para las cuatro proteínas evaluadas.

3.5.1.1 HER2/neu

La puntuación para valorar el grado de expresión de la proteína HER2/neu se realizó siguiendo los criterios de Hofmann *et al*³¹⁶ en los que se establece una escala de 0 a 3+ (Tabla 10). Se consideró el receptor HER2 positivo sólo cuando presentaba una puntuación 3+.

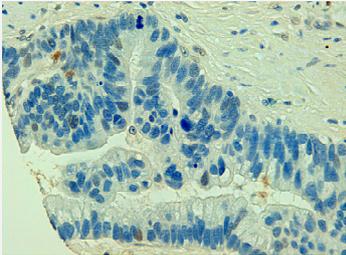
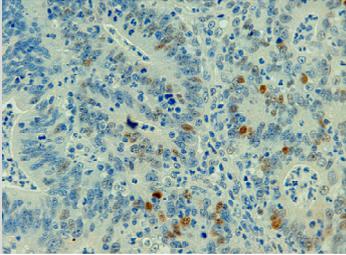
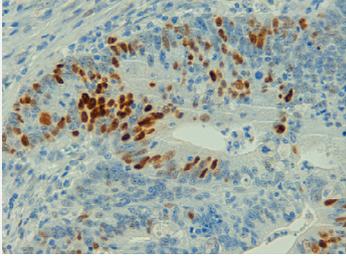
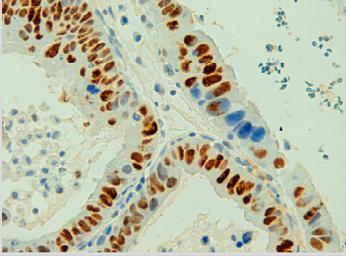
Tabla 10. Criterios de intensidad de tinción de membrana para HER2/neu.

	Puntuación	Patrón de tinción	Valoración de la sobreexpresión
	0	Ausencia de tinción o tinción basolateral o lateral de membrana en menos del 10% de las células tumorales	Negativa
	1+	Tinción de membrana basolateral o lateral, de intensidad muy débil en >10% de las células tumorales	Negativa
	2+	Tinción de membrana basolateral o lateral, de intensidad débil-moderada en >10% de las células tumorales	Indeterminado
	3+	Tinción de membrana basolateral o lateral, de intensidad fuerte en >10% de las células tumorales.	Positivo

3.5.1.2 p53 y p21^{WAF1/Cip1}

Los puntos de corte seleccionados coincidían con los más frecuentemente utilizados en la literatura para cada molécula^{317,318}. Así, se consideró que la expresión de p53 era positiva o alterada cuando el porcentaje de núcleos teñidos fue >10%; la de p21 negativa (estado alterado) cuando el porcentaje de núcleos fue ≤10% (Tabla 11).

Tabla 11. Interpretación de la tinción inmunohistoquímica de p53 y p21.

	Puntuación	Patrón de Tinción	Valoración de la expresión
	0	Ausencia de tinción o tinción en menos del 5% de las células tumorales	Negativo
	1+	Tinción nuclear entre el 5% al 10% de las células tumorales	Negativo
	2+	Tinción nuclear entre el 10% al 50% de las células tumorales	Positivo
	3+	Tinción nuclear en más del 50% de las células tumorales	Positivo

3.5.1.3 EGFR

La expresión de EGFR fue valorada siguiendo el sistema de cinco grados propuesto por Hirsch *et al*³¹¹ que tiene en cuenta dos parámetros: el porcentaje y la intensidad de las células tumorales marcadas. Para valorar la intensidad se realizó una valoración semicuantitativa 0: Ausencia de tinción, 1: Tinción apenas perceptible, 2: Tinción moderada, 3: Tinción intensa, 4: Tinción muy fuerte. Posteriormente se realizó una estimación del porcentaje de células positivas para cada intensidad se puntuó como: 0-100%. La valoración final se obtuvo multiplicando el porcentaje de células positivas por la intensidad de la tinción obteniendo un valor que oscilaba de 0 a 400 (Figura 10). Finalmente, para análisis estadístico el score de 0-200 fue considerado negativo/baja expresión, y score de 201-400 fue considerado positivo / alta expresión.

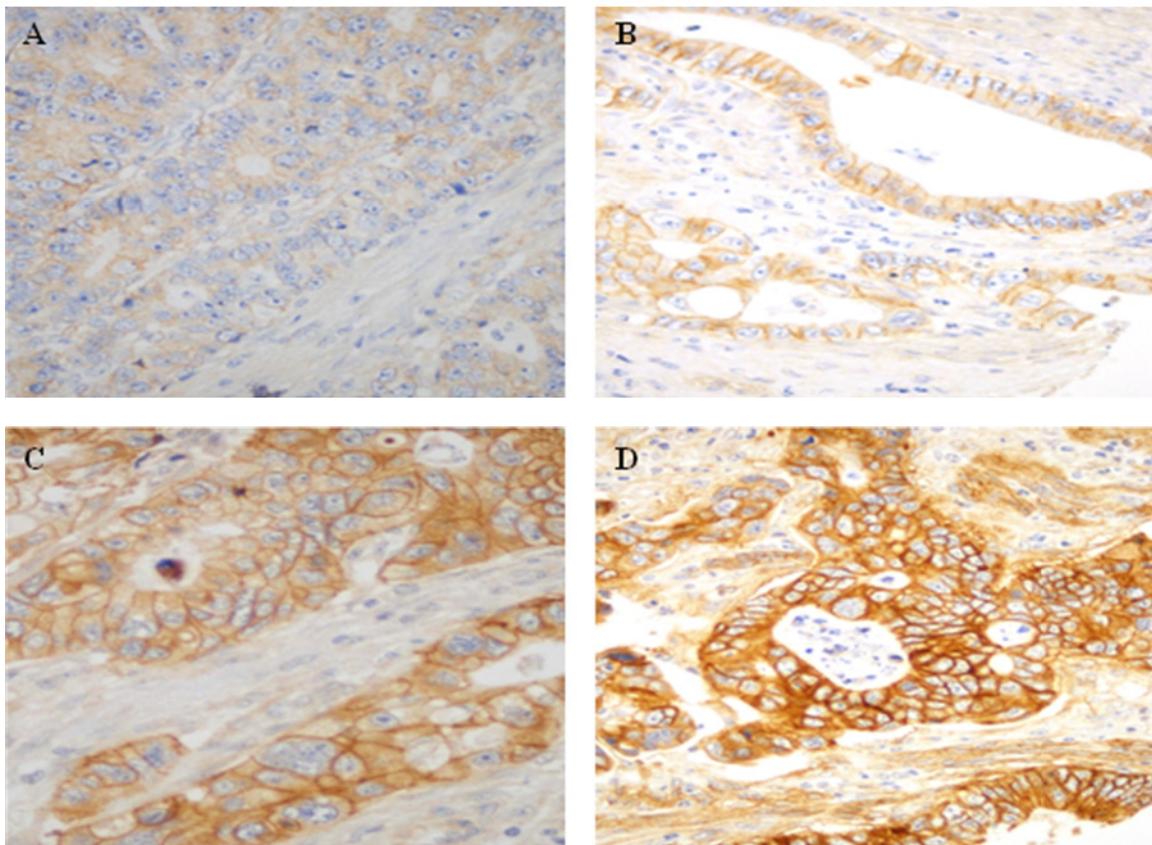


Figura 10. Inmunohistoquímica de las diferentes intensidades en la expresión de EGFR.

(A) 100 (Patrón de intensidad 1 en el 100% de las células), (B) 180 (Patrón 2 en el 90% de las células), (C) 300 (Patrón 3 en el 100% de las células), (D) 400 (Patrón 4 en el 100% de las células. Imágenes tomadas con objetivo 400x.

El laboratorio de Patología Molecular y otros tumores obtuvo con fecha de 30 de Marzo del 2007, la certificación de su sistema de gestión de calidad según la norma ISO-9001:2000, habiendo pasado con distinción el primer control anual a fecha del 2008, continuando con la certificación hasta Diciembre del 2010. Con la actualización de la norma ISO-9001:2008, por tanto todos los protocolos de trabajo (PNTS) descritos en este apartado de material y métodos estaban en la elaboración de esta tesis certificados.

3.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de todas las variables incluidas en este trabajo, se realizó con el programa informático SPSS 15.0 (Software Programs, Chicago, IL, USA). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas con una $p \leq 0.05$. El estudio estadístico comprendió tres aspectos. Un primer apartado descriptivo, un segundo apartado centrado en la estadística comparativa y un tercero, dedicado al análisis de supervivencia y la aparición de recidiva tumoral.

En el apartado descriptivo se realizó un análisis de la distribución de frecuencias o de porcentaje en el caso de variables cualitativas, determinación de media \pm desviación estándar, mediana, rango de las variables cuantitativas.

La comparación entre variables cualitativas se realizó mediante el test de Chi cuadrado (χ^2) de Pearson, cuando los casos esperados fueron menor que 5, se aplicó el test exacto de Fisher. Para la comparación entre variables cuantitativas hemos utilizado el test *t-student* si la variable categórica es dicotoma o el test *ANOVA* (análisis de varianza) en caso de presentar más categorías.

En cuanto al análisis de supervivencia, para calcular el valor pronóstico de las distintas variables se ha utilizado en primer lugar, un estudio univariante de supervivencia mediante curvas de Kaplan-Meier. De este modo se realiza un análisis estadístico para obtener información relativa a la probabilidad de sobrevivir a lo largo del tiempo ante la presencia de una enfermedad, luego comparar la influencia de ciertas variables con poder predictivo o pronóstico sobre la supervivencia. El test Log-Rank (Mantel-Cox) aporta la significación estadística de la influencia de cada una de las variables analizadas por separado.

Para el análisis de los factores pronósticos que influían en la supervivencia de nuestra serie, se seleccionó la regresión múltiple de riesgos proporcionales de Cox como método estadístico más adecuado para determinar la asociación entre un conjunto de variables predictoras continuas o categóricas y una variable respuesta cuantitativa continua (supervivencia, recidiva). Para el modelo de regresión se determinaron como estadísticos, el estadístico de la razón de verosimilitud y el Chi cuadrado global.

4 RESULTADOS

En la presente sección se describen los pacientes estudiados y los resultados obtenidos en relación con cada uno de los objetivos propuestos, i) análisis de las alteraciones genéticas detectadas mediante array CGH (aCGH), ii) validación mediante técnicas de FISH de las alteraciones cromosómicas más frecuentemente detectadas por los arrays genómicos, iii) expresión inmunohistoquímica de los biomarcadores seleccionados para este estudio y finalmente, iv) las vías de evolución clonal a nivel intratumoral en adenocarcinomas gástricos.

4.1 Características clínico-biológicas de la serie de pacientes analizados mediante array de CGH

En el presente estudio se analizaron 138 pacientes diagnosticados entre 1997 y 2007 en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca (Tabla 12). De los 138 pacientes, 80 (58%) fueron varones y 58 (42%) mujeres, con edades comprendidas entre los 28 y 91 años (media de 71 ± 11 años). Desde el punto de vista de su localización, el tercio distal fue el lugar afectado con mayor frecuencia (81 casos; 64%). El tamaño medio del eje mayor del tumor fue de 6 cm (rango, 1-12 cm). Desde el punto de vista histopatológico, de acuerdo con la clasificación de Lauren, 65% de los tumores fueron clasificados como de tipo intestinal, 27% de tipo difuso, 6% mixto y un 2% indeterminado. En base al grado de diferenciación, se clasificaron de bajo grado (bien-moderadamente diferenciado) y alto grado (pobremente e indiferenciado) el 54% y 46% de los casos, respectivamente. En cuanto a la profundidad de infiltración de la pared gástrica predominaron los tumores T3 y T4 (84%). Se encontraron metástasis ganglionares en 100 de 132 casos (76%). En el momento del diagnóstico se detectaron metástasis a distancia (M1) en 20 (14%) pacientes. Dentro de la clasificación de la *American Joint Committee on Cancer* (TNM-UICC 2010) puede observarse que la mayoría de los casos se presentaron en estadio III (41%), y en estadio II (34%). Cabe destacar que una pequeña parte de los tumores se diagnosticaron en estadios precoces (10%). La tabla 10 muestra las técnicas quirúrgicas empleadas y la intención de las mismas, siendo curativa en el 74% de los pacientes y paliativa en el 26% restante. Se llevaron a cabo 87 gastrectomías subtotales y un total de 51 gastrectomías totales.

Tabla 12. Características clínico-patológicas de los pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=138).

Variable	n (%)
Sexo	
Hombres	80 (58%)
Mujeres	58 (42%)
Edad (años) *	74 (28 - 91)
Localización del tumor ** (n=132)	
Tercio superior	28 (22%)
Tercio medio	14 (11%)
Tercio inferior	81 (64%)
Afectación generalizada	3 (3%)
Tamaño del tumor (cm) *	6 (1 - 12)
Tipo histológico Lauren (n=134) ^a	
Intestinal	86 (65%)
Difuso	37 (27%)
Mixto	8 (6%)
Indeterminado	3 (2%)
Grado histológico (n=134) ^a	
Bajo grado	72 (54%)
Alto grado	62 (46%)
Clasificación TNM patológica	
Profundidad de invasión de la pared (pT)	
T1-T2	22 (16%)
T3-T4	116 (84%)
Afectación ganglionar (pN) ** (n=132)	
N0	32 (24%)
N1-N3	100 (76%)
Metástasis a distancia (pM)	
M0	118 (86%)
M1	20 (14%)
Estadio TNM ** (n=134)	
I	13 (10%)
II	45 (34%)
III	56 (41%)
IV	20 (15%)
Tipo de gastrectomía	
Total	51 (37%)
Subtotal	87 (63%)
Tipo de linfadenectomía	
<D2	116 (84%)
≥D2	22 (16%)
Tipo de resección	
R0	102 (74%)
R1-R2	36 (26%)
Quimioterapia adyuvante	
Sí	64 (47%)
No	73 (53%)
Recidiva *** (n=84)	
Sí	41 (49%)
No	43 (51%)
Supervivencia global * (meses)	34 (2 - 93)
Exitus ** (n=122)	
Sí	74 (61%)
No	48 (39%)

* Resultados expresados como mediana (rango)

** Omisión de casos debido a falta de información clínica

*** Sólo se estudiaron aquellos pacientes con resección R0

^a El tipo mucinoso no fue incluido

Contamos con información de seguimiento en 122 de los 138 pacientes analizados, la mediana de supervivencia global fue de 34 meses (rango, 2-93). De entre ellos, contamos con 93 pacientes que se trataron con intención curativa; a su vez en 84 de ellos disponemos de datos de seguimiento. En el momento de cerrar el estudio (2008), aproximadamente la mitad de estos 84 pacientes habían recidivado, siendo la mediana de intervalo libre de recidiva de 25 meses (rango entre 22 y 77 meses). La mediana de supervivencia libre de enfermedad de los pacientes que recidivaron fue de 16 meses (rango entre 2 y 58 meses).

4.2 Incidencia de las alteraciones genéticas en adenocarcinoma gástrico detectados mediante BAC-arrays

Es interesante señalar que todos los pacientes analizados mostraron anomalías para, al menos, dos regiones cromosómicas. La mediana de alteraciones por paciente fue de 13 (rango de 2 a 40), y la mediana del porcentaje de genoma alterado fue del 16%.

Como se muestra en la figura 11 las pérdidas cromosómicas fueron más frecuentes que las ganancias (94 % vs 63 %, respectivamente). Los resultados más relevantes en relación con las pérdidas y ganancias cromosómicas quedan reflejados en las tablas 13 y 14, respectivamente. Como puede observarse, las pérdidas genéticas más frecuentes se localizaron en las regiones cromosómicas 17p13.3-p13.1 (130/138; 94%), 16q22.1-q24.3 (120/138; 87%), 12q24.23-q24.31 (100/138; 73%), 22q13.1-q13.2 (77/138%; 56%), 7q11.22-q11.23 (67/138;49%) y 15q21.1-q22.31 (43/138;31%), mientras que las ganancias cromosómicas correspondieron a las regiones 13q21.33-q32.1 (86/138; 63%), 20p12.1-p11.21 (65/138; 47%), 10q21.2-q21.3 (61/138; 44%), 20q13.2-q13.33 (44/138; 32%), 1q31.1-q31.3 (28/138; 20%) y 6p12.3-p11.2 (21/138; 15%). Con menor frecuencia se detectaron amplificaciones a nivel de 12p12.1 (5/138; 4%), 12q15 (5/138; 4%), 11q13.2-q13.3 (4/138; 3%), 20q13.2 (4/138; 3%), 6p21.1 (2/138; 1%), 8p23.1(2/138; 1%), 17q12(2/138; 1%), 20p12.3-p12.1(2/138; 1%), 18q11.1-q11.2 (1/138; 1%).

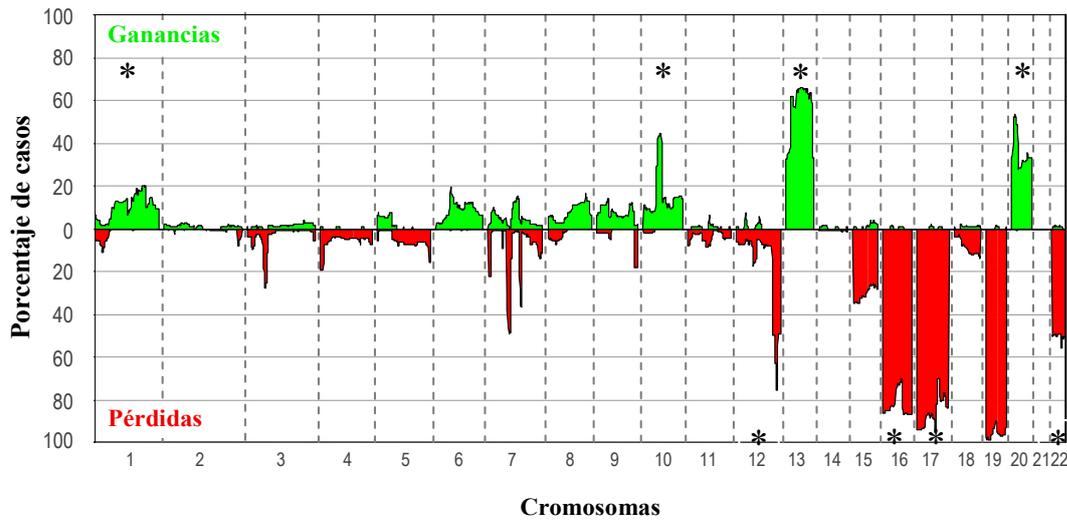


Figura 11. Frecuencia de las alteraciones cromosómicas detectadas mediante aCGH en pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=138).

* Anomalías cromosómicas frecuentes (>50% de los casos).

Fue interesante observar que en estas regiones se ubican genes relacionados en: i) procesos neoplásicos del tracto gastrointestinal (*BCL7A*, *ERBB2*, *FGFR3*, *FLT1*, *HDGF*, *KRAS* y *TNFRSF6B*), ii) crecimiento celular y proliferación (*CDK2AP1*, *CYP1A1*, *DIABLO*, *FLT3*, *KLF5*, *FOXA2* y *ZNF217*) y iii) ciclo celular (*CCND3*, *CDK1*, *IFI16*, *IQGAP3*, *PML*, *RBI* y *TP53*). (Tablas 13 y 14).

Tabla 13. Pérdidas cromosómicas en pacientes con adenocarcinoma gástrico detectadas por aCGH (n=138).

Región cromosómica	BAC Inicio/ Final	Nº de clones	Tamaño (pb)	Frecuencia (%)	Genes candidatos*
17p13.3-p13.1	GS-202-L17/ RP11-401O9	21	10.055.064	94	TP53, EFN3, SHBG, TRPV1, XAF1, CDH3
16q22.1-q24.3	RP11-123C5/ GS-191-P24	27	21.273.956	87	WWOX, USP10, IRF8, ZFH3, GCSH, IL17C, CDH13, TERF2IP, ADAMTS18
17q12-q21.2	RP11-390P24/ RP11-156E6	6	2.213.827	86	BRCA1, THRA, RARA, GRB7, STARD3
16p13.3-p13.11	RP11-167B4/ CTD-2504F3	17	9.817.970	85	SOCS1, ERCC4, A2BP1, MYH11, USP7, EMP2, LITAF GSPT1
12q24.23-q24.31	RP11-144B2/ RP11-338K17	6	3.576.834	73	BCL7A, DIABLO, RSR2, CIT, CDK2AP1, CLIP1, KNTC1, PXN, RHOF, RNF34, SBNO1, K2API, SFRS9, FBXL10, ZCCHC8
12q24.22-q24.23	RP11-497G19/ RP11-322N7	4	2.572.179	63	NOS1, KSR2, HRK
22q13.1-q13.2	CTA-229 A8/ RP5-979N1	6	717.122	56	ST13, RBX1, MKL1
12q24.31-q24.33	RP11-214K3/ GS-221-K18	12	9.396.014	49	CHFR, NCOR2, FZD10
7q11.22-q11.23	RP4-715F13/ RP11-107I23	7	5.866.520	49	BCL7B, CLDN4, CLDN3, FZD9, LIMK1, RFC2, GTF2I, EIF4H, WBSR22
15q21.1-q22.31	RP11-154J22/ RP11-302G2	22	17.576.995	31	TRPM7, MAPK6, RFX7, CYP19, DAPK2, CYP19A1, SLC12A1, SMAD6, CCNB2
15q22.31-q24.1	RP11-321F6/ RP11-78M2	15	9.871.174	29	TLE3, SMAD3, CYP1A1, CSK, PTPN9, NEO1, PML, NEIL1, PIAS1, RAB11A
3p21.31	RP4-544D10/ RP11-78O10	6	2.459.835	28	DAG1, IMPDH2, LAMB2, RHOA, GPX1, IP6K2, APEH, MAP4, PLXNB1
15q26.1-q26.3	RP11-266O8/ RP11-262P8	8	5.675.238	26	IGF1R, NR2F2, SIN3A
4p16.3-p16.1	GS-118-B13/ RP11-338K13	11	8.004.636	20	RNF4, TACC3, FGFR3, S100P, DOK7, GAK, TMEM129, CTBP1
9q33.3-q34.3	RP11-205K6/ RP11-417A4	13	11.383.170	18	FPGS, CIZ1, FNBP1, ASS1
5q35.2-q35.3	CTB-87L24/ GS-240-G13	8	4.805.819	16	FGFR4, UNC5A, GRK6, DBN1, DOK3

* Genes asociados a procesos neoplásicos y/o involucrados en cáncer gástrico (negrita)

Tabla 14. Ganancias cromosómicas en pacientes con adenocarcinoma gástrico detectadas por aCGH (n=138).

Región cromosómica	BAC Inicio/ Final	Nº de clones	Tamaño (pb)	Frecuencia (%)	Genes candidatos*
13q21.33-q32.1	RP11-321F20/ RP11-235O20	17	28.248.521	63	<i>DZIP1, GPC5, SCEL, KLF5, KLF12, LMO7, KCTD12, PIBF1, RAP2A, DACHI</i>
20p12.1-p11.21	RP3-348M17/ RP5-1025A1	8	8.347.761	47	<i>FOXA2, SNX5, SSTR4</i>
10q21.2-q21.3	RP11-166B18/ RP11-176H12	5	3.797.437	44	<i>EGR2, CDC2, ZNF365, JMJD1C</i>
13q12.13-q12.3	RP11-11167/ RP11-95G6	6	2.702.202	36	<i>FLT3, FLT1, RASL11A, CDX2</i>
20q13.2-q13.33	RP4-715N11/ GS-81-F12	19	11.718.589	32	<i>ZNF217, AURKA, BMP7, NTSR1, OGFR, RTEL1, ZGPAT, TNFRSF6B, RAE1, BCAS1, GNAS, LAMA5, STX16, CYP24A1, GATA5, TFAP2C, OPRL1, PSMA7, ADRM1, PMEPA1, BIRC7</i>
10q11.22	RP11-292F22/ RP11-463P17	2	898.263	29	<i>ANXA8</i>
1q31.1- q31.3	RP11-336D15/ RP11-404H1	11	9.313.505	20	<i>UCHL5, TMEM183A</i>
1q22-q25.1	RP11-206M24/ RP3-433G19	17	16.951.199	16	<i>HDGF, CRABP2, IFI16, B4GALT3, IQGAP3, APOA1BP</i>
6p12.3-p11.2	RP11-334H12/ RP3-422B11	10	8.467.895	15	<i>GSTA3, RAB23, BAG2</i>
8q24.13-q24.3	RP11-495D4/ RP11-526P7	18	13.487.390	13	<i>MYC, WISP1, ASAP1</i>
7p21.3-p21.2	RP11-352E12/ RP11-547G15	8	4.621.868	9	<i>ETV1, SCIN</i>
7p22.1-p21.3	RP4-733B9/ RP11-304A10	3	1.774.168	7	<i>RPA3, ICA1</i>

* Genes asociados a procesos neoplásicos y/o involucrados en cáncer gástrico (negrita)

4.3 Significado de los cambios genómicos detectados mediante aCGH en el comportamiento clínico-patológico y evolutivo de la enfermedad

La tabla 15 muestra las características clínicas, histopatológicas y biológicas de los 138 pacientes con ADC gástrico asociadas a las alteraciones genéticas detectadas mediante aCGH. Queremos destacar que los pacientes con pérdidas en 4p16.3-p16.1, 12q24.22-q24.23, 15q22.31-q24.1 y/o ganancias en 6p12.3-p11.2, 7p22.1-p21.3, 13q31.3-q32.1 y 20p12.1-p11.21, mostraron tumores en estadios avanzados (III/IV). En esta misma línea, los pacientes con ganancias a nivel de 20p12.1-p11.21 y 10q11.22 se asociaron a tumores metastáticos y a tumores de tipo histológico intestinal, respectivamente. Desde el punto de vista pronóstico, las ganancias de 7p22.1-p21.3, 10q11.22, así como las pérdidas en 4p16.3-p16.1 correspondían a tumores recidivantes y alto grado de diferenciación ($p \leq 0.05$).

Se identificaron un total de 15 regiones cromosómicas que se asociaron con el comportamiento clínico y biológico de la enfermedad. Estas regiones contienen 110 posibles genes candidatos. De esta lista de genes se realizó un análisis de las posibles interacciones y redes en los que están involucrados con el software *Ingenuity Pathways Analysis*® (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, EEUU) (<http://www.ingenuity.com>). El programa detectó que 14 de los 110 genes estaban interconectados formando parte de una red común. Esta red está relacionada con el ciclo celular, el cáncer y las enfermedades respiratorias (Figura 12). Además, se conoce que siete de estos genes están involucrados en la progresión del ciclo celular y se sabe que seis de ellos juegan un papel importante en cáncer de pulmón y del tracto gastrointestinal: *AURKA*³¹⁹⁻³³³, *CCNB2*³³⁴⁻³³⁸, *EGFR*³³⁹⁻³⁴³, *IGF1R*³⁴⁴⁻³⁴⁷, *TOP2A*³⁴³ y *TP53*³⁴⁸⁻³⁵⁰.

Las tres rutas canónicas más importantes relacionadas con los genes identificados fueron: los mecanismos moleculares en cáncer, señalización en cáncer de vejiga y señalización en cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Tabla 15. Relación entre las alteraciones genéticas detectadas mediante aCGH y las características clínico-patológicas de la enfermedad (n=138).

Región cromosómica	Estadio		Diferenciación		Lauren		Metástasis a distancia		Recidiva	
	III/IV (n=76) (%)	<i>P</i>	Alto grado (n=62) (%)	<i>P</i>	Intestinal (n=86) (%)	<i>P</i>	M1 (n=20) (%)	<i>P</i>	Sí (n=41) (%)	<i>P</i>
PERDIDAS										
4p16.3-p16.1										
Pérdida	22/28 (79%)	0.009	19/28 (68%)	0.01	13/23 (57%)	0.1	7/28 (25%)	0.1	11/15 (73%)	0.05
Normal	54/106 (51%)		43/106 (41%)		73/99 (74%)		13/110 (12%)		30/69 (44%)	
12q24.22-q24.23										
Pérdida	54/84 (64%)	0.02	40/85 (47%)	0.8	54/78 (69%)	0.7	14/87 (16%)	0.5	27/51 (53%)	0.3
Normal	22/50 (44%)		22/49 (45%)		32/44 (73%)		6/51 (12%)		14/33 (42%)	
12q24.23-q24.31										
Pérdida	61/98 (62%)	0.03	47/98 (48%)	0.5	62/89 (70%)	0.7	16/101 (16%)	0.6	31/58 (53%)	0.2
Normal	15/36 (42%)		15/36 (42%)		24/33 (73%)		4/37 (11%)		10/26 (39%)	
12q24.32-q24.33										
Pérdida	42/66 (64%)	0.1	33/67 (49%)	0.5	42/63 (68%)	0.3	11/68 (16%)	0.6	21/37 (57%)	0.2
Normal	34/68 (50%)		29/67 (43%)		44/59 (75%)		9/70 (13%)		20/47 (43%)	
15q21.1-q22.31										
Pérdida	31/42 (74%)	0.007	20/41 (49%)	0.7	25/38 (66%)	0.4	9/43 (21%)	0.1	16/27 (59%)	0.2
Normal	45/92 (49%)		42/93 (45%)		61/84 (73%)		11/95 (12%)		25/57 (44%)	
15q22.31-q24.1										
Pérdida	30/39 (77%)	0.002	19/38 (50%)	0.6	22/35 (63%)	0.2	9/39 (23%)	0.1	14/23 (61%)	0.2
Normal	46/95 (48%)		43/96 (45%)		64/87 (74%)		11/99 (11%)		27/61 (44%)	
15q26.1-q26.2										
Pérdida	29/36 (81%)	0.001	17/34 (50%)	0.6	19/32 (59%)	0.1	8/36 (22%)	0.1	13/22 (59%)	0.3
Normal	47/98 (48%)		45/100 (45%)		67/90 (74%)		12/102 (12%)		28/62 (45%)	
22q13.1-q13.2										
Pérdida	47/74 (64%)	0.1	37/74 (50%)	0.4	46/65 (71%)	0.9	14/76 (18%)	0.1	26/44 (59%)	0.05
Normal	29/60 (48%)		65/60 (42%)		40/57 (70%)		6/62 (10%)		15/40 (38%)	

Tabla 15. Relación entre las alteraciones genéticas detectadas mediante aCGH y las características clínico-patológicas de la enfermedad (n=138).

Región cromosómica	Estadio		Diferenciación		Lauren		Metástasis a distancia		Recidiva	
	III/IV (n=76) (%)	P	Alto grado (n=62) (%)	P	Intestinal (n=86) (%)	P	M1 (n=20) (%)	P	Sí (n=41) (%)	P
GANANCIAS										
1q22-q25.1										
Ganancia	13/18 (72%)	0.2	9/18 (50%)	0.7	10/15 (67%)	0.7	3/19 (16%)	1.0	9/12 (75%)	0.1
Normal	63/116 (54%)		53/116 (46%)		76/107 (71%)		17/119 (14%)		32/72 (44%)	
6p12.3-p11.2										
Ganancia	16/21 (76%)	0.05	13/21 (62%)	0.1	12/20 (60%)	0.3	3/21 (14%)	1.0	6/10 (60%)	0.5
Normal	60/113 (53%)		49/113 (43%)		74/102 (73%)		17/117 (15%)		35/74 (47%)	
7p22.1-p21.3										
Ganancia	9/10 (90%)	0.03	8/10 (80%)	0.04	5/7 (71%)	1.0	3/10 (30%)	0.2	5/5 (100%)	0.02
Normal	67/124 (54%)		54/124 (44%)		81/115 (70%)		17/128 (13%)		36/79 (46%)	
7p21.3-p21.2										
Ganancia	10/12 (83%)	0.1	10/12 (83%)	0.01	5/9 (56%)	0.4	3/12 (25%)	0.4	5/7 (71%)	0.3
Normal	66/122 (54%)		52/122 (43%)		81/113 (72%)		17/126 (14%)		36/77 (47%)	
10q11.22										
Ganancia	24/40 (60%)	0.6	26/39 (67%)	0.002	19/33 (58%)	0.05	4/40 (10%)	0.4	19/30 (63%)	0.05
Normal	52/94 (55%)		36/95 (38%)		67/89 (75%)		16/98 (16%)		22/64 (41%)	
13q31.3-q32.1										
Ganancia	53/84 (63%)	0.05	38 /86 (44%)	0.5	55/80 (69%)	0.6	14/87 (16%)	0.5	24/47 (51%)	0.6
Normal	23/50 (46%)		24/48 (50%)		31/42 (74%)		6/51 (12%)		17/37(46%)	
20p12.1-p11.21										
Ganancia	46/64 (72%)	0.001	30/63 (48%)	0.8	41/56 (73%)	0.5	15/65 (23%)	0.007	20/34 (59%)	0.1
Normal	30/70 (43%)		32/71 (45%)		45/66 (68%)		5/73 (7%)		21/50 (42%)	

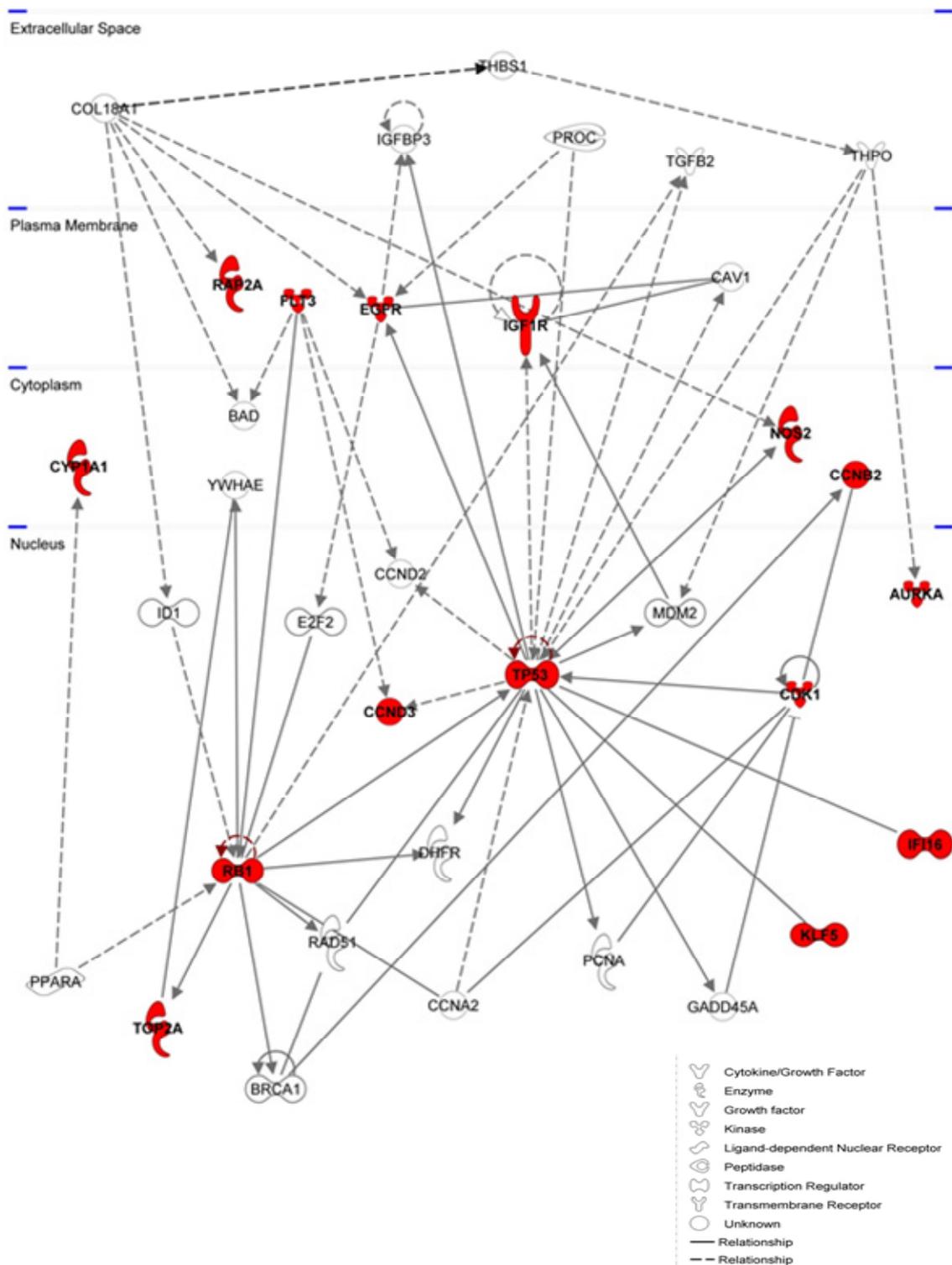


Figura 12. Representación esquemática de las vías de señalización alteradas en cáncer gástrico en base al análisis de los resultados obtenidos mediante array de CGH

En rojo se muestran los genes alterados encontrados en nuestro estudio. Las líneas sólidas entre nodos representan interacciones directas, las punteadas son indirectas. Las flechas de un nodo hacia otro indican que ese nodo actúa sobre el otro. Las líneas sin flecha representan enlaces. Los genes sin color no fueron identificados en nuestro análisis y se han integrado debido a su relevancia en esta red. En el cuadro de la parte inferior se muestra la clave que indica el tipo de molécula que aparece en cada nodo de la red.

4.4 Impacto de las características clínico-patológicas y de las alteraciones genéticas en la supervivencia libre de enfermedad

Cuarenta y uno de un total de 84 pacientes intervenidos con intención curativa (R0), habían recaído a los 5 años tras la cirugía. De ellos, 30 pacientes (73%) presentaron un patrón único de recurrencia (es decir, en un solo sitio, ya sea locorregional, a distancia o peritoneal); 9 pacientes (22%) presentaron recurrencia con dos patrones, y 2 pacientes (5%) presentaron simultáneamente los tres patrones de recurrencia (Figura 13).

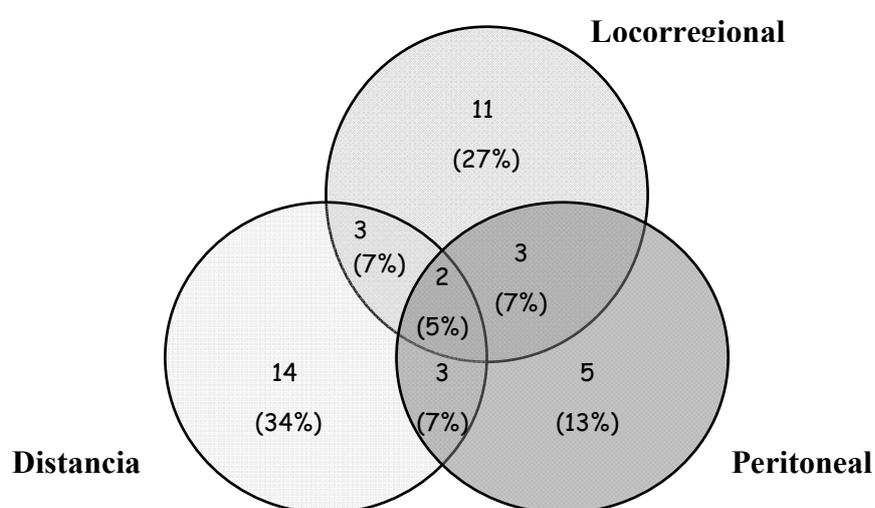


Figura 13. Patrones de recurrencia encontrados en 41 de 84 pacientes operados con intención curativa (R0).

La tabla 16 muestra las características clínico-patológicas relevantes de la enfermedad que tienen valor pronóstico en la aparición de una recidiva. Así, podemos observar que los pacientes con tumores gástricos de tipo histológico difuso muestran una supervivencia libre de enfermedad significativamente más corta que los tumores de tipo intestinal (mediana 20 vs 38 meses; $p < 0.001$). De forma similar, presentaron un peor pronóstico los tumores de alto grado (mediana 20 vs no alcanzada; $p=0.02$), los tumores con afectación ganglionar (mediana 20 vs no alcanzada; $p=0.001$), y los tumores en estadios avanzados (estadio III) (mediana 17 vs 55; $p=0.001$) (Figura 14). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en la supervivencia libre de recidiva al comparar el sexo, la edad, el tamaño del tumor, la profundidad de invasión de la pared, el tipo de gastrectomía o linfadenectomía y el tratamiento adyuvante recibido.

Tabla 16. Adenocarcinomas gástricos (n=84): Características clínico-patológicas y genéticas con impacto pronóstico sobre la supervivencia libre de recaída.

Variable	N° de casos	% recidivas	Mediana Supervivencia libre de enfermedad (Meses)	Análisis univariante P	Análisis multivariante P
Sexo					
Hombres	45	56	37	NS	—
Mujeres	39	41	29		
Edad (años)					
≤ 74	41	56	37	NS	—
> 74	43	42	27		
Tamaño del tumor (cm)* (n= 80)					
≤ 6	48	48	38	NS	—
> 6	32	50	21		
Tipo Histológico Lauren (n=79)^a					
Intestinal	49	41	38	<0.001	NS
Difuso	23	52	20		
Mixto	5	60	9		
Indeterminado	2	50	5		
Grado Histológico (n=79)^a					
Bajo grado	40	35	NA	0.02	NS
Alto grado	39	56	20		
Clasificación TNM patológica					
Profundidad de invasión de la pared (pT)					
T1-T2	18	33	58	NS	—
T3-T4	66	53	23		
Afectación ganglionar (pN)* (n=81)					
N0	23	17	NA	0.001	<0.001
N1-N3	58	62	20		
Estadio (TNM)* (n= 81)					
I	10	20	NA	0.001	NS
II	37	38	55		
III	34	71	17		
Tipo de Gastrectomía					
Total	27	48	23	NS	—
Subtotal	57	49	37		
Tipo de Linfadenectomía					
<D2	67	52	27	NS	—
≥D2	17	35	38		
Quimioterapia adyuvante					
Sí	42	52	37	NS	—
No	42	45	27		
Alteración número de copias					
≥ 10	35	31	55	0.02	—
> 10	49	61	22		
Porcentaje de genoma alterado					
< 16%	44	36	55	0.01	—
≥ 16%	40	63	21		
1q22-q25.1					
Ganancia	12	75	14	0.03	NS
Normal	72	44	37		
4p16.3-p16.1					
Pérdida	15	73	14	0.009	NS
Normal	69	44	37		
7p22.1-p21.3					
Ganancia	5	100	11	<0.001	0.005
Normal	79	46	37		
10q11.22-q21.3					
Ganancia	38	63	21	0.05	NS
Normal	46	37	55		
12q24.31-q24.33					
Pérdida	37	57	20	NS	—
Normal	47	43	44		
15q22.31-q23					
Pérdida	24	63	17	0.02	0.02
Normal	60	43	44		

NS: Diferencias estadísticamente no significativas (p> .05) NA: No alcanzada

* Omisión de casos debido a falta de información clínica

^a El tipo mucinoso no fue incluido.

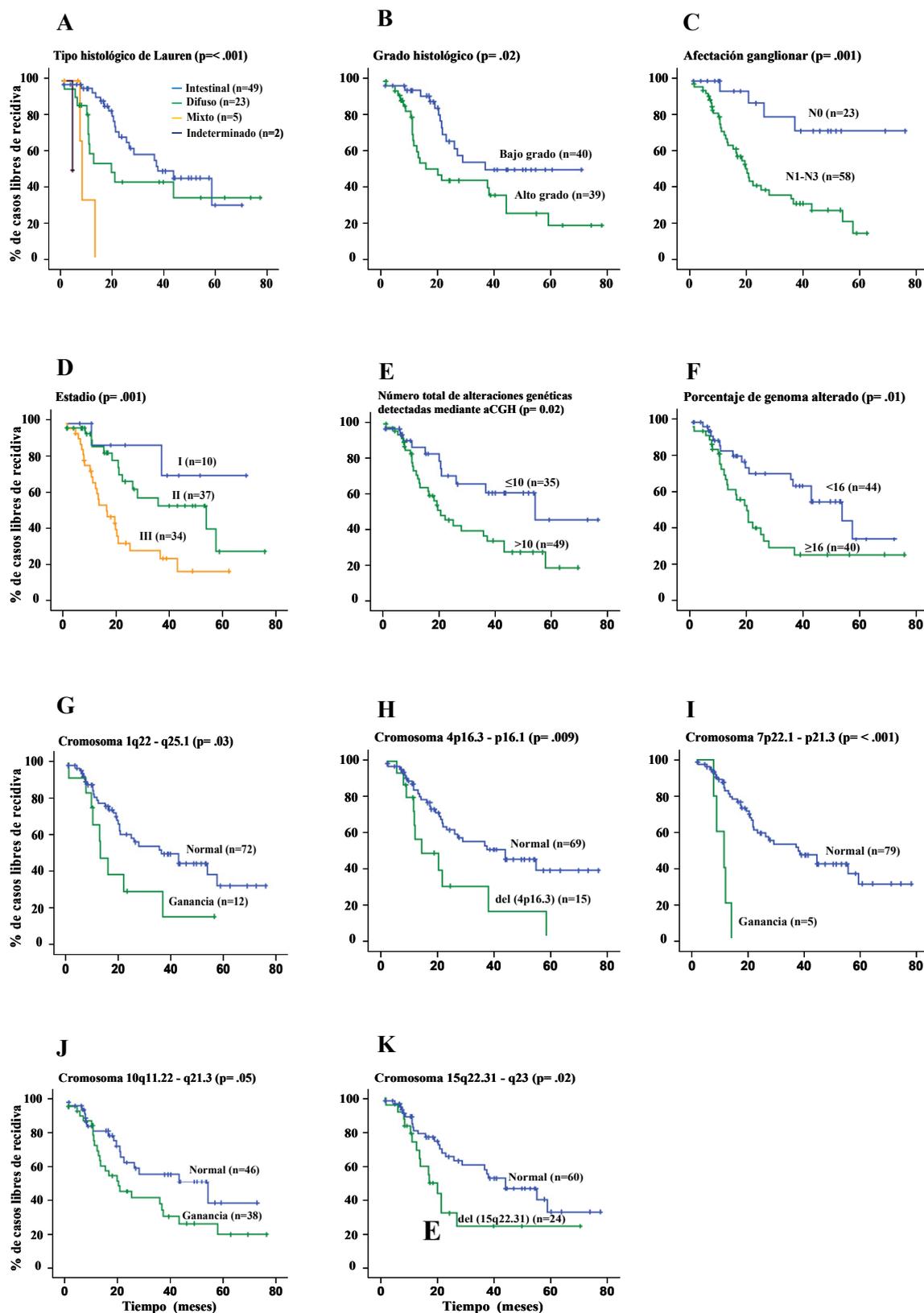


Figura 14. Características clínico-patológicas y genéticas con impacto sobre la supervivencia libre de recaída en pacientes con resección R0

(A) Tipo histológico de Lauren, (B) Grado histológico, (C) Afectación ganglionar, (D) Estadio, (E) Número total de alteraciones genéticas detectadas mediante aCGH, (F) Porcentaje de genoma alterado, (G) Cromosoma 1q22, (H) Cromosoma 4p16.3, (I) Cromosoma 7p22.1, (J) Cromosoma 10q11.22, (K) Cromosoma 15q22.31

A pesar de no alcanzar la significación estadística, los pacientes con mayor profundidad de infiltración de la pared gástrica (T3-T4) presentaron una tendencia a una supervivencia más corta que los casos T1-T2.

Además de las características clínico-patológicas, algunas alteraciones genéticas estudiadas también mostraron una asociación estadísticamente significativa con el tiempo libre de recaída, entre ellas, ganancias de 1q22-q25.1 (mediana 14 vs 37 meses; $p=0.03$), de 7p22.1-p21.3 (mediana 11 vs 37 meses; $p<0.001$), de 10q11.22-q21.3 (mediana 21 vs 55 meses, $p=0.05$) o de las pérdidas en 4p16.3-p16.1 (mediana 14 vs 37 meses; $p=0.009$), o de 15q22.31-q23 (mediana 17 vs 44 meses; $p=0.02$). (Figura 14).

A la hora de seguir evaluando el impacto clínico de las diversas alteraciones cromosómicas en la supervivencia libre de recaída, decidimos en primer lugar centrarnos en correlacionar el número de alteraciones cromosómicas de cada tumor con su pronóstico. En este sentido, observamos que las alteraciones en las regiones cromosómicas 1q22-q25.1, 4p16.3-p16.1, 10q11.22-q21.3 y 15q22.31-q23, se asociaron con una menor supervivencia libre de recaída. De esta manera clasifican los pacientes por el número de regiones involucradas. La supervivencia libre de recaída fue superior en los pacientes que no presentaban ninguna alteración (mediana, 55 meses) con respecto a los que tenían una sola alteración (mediana, 37 meses, $p<0.001$). (Figura 15A).

Una vez evaluado el impacto del número de alteraciones genéticas en el pronóstico, analizamos las alteraciones específicas que con mayor frecuencia se presentaban. Así, las alteraciones genéticas asociadas con más frecuencia a la recaída de la enfermedad fueron la ganancia a nivel de 10q11.22-q21.3 y la pérdida de 15q22.31-q23. La supervivencia libre de recaída fue superior en el grupo de pacientes que no presentaban ninguna de estas 2 alteraciones (mediana de 55 meses) respecto al grupo que presentaba una sola alteración (mediana de 26 meses) y la que mostró ambas regiones cromosómicas alteradas (mediana, de 14 meses; $p=0.02$) (Figura 15B).

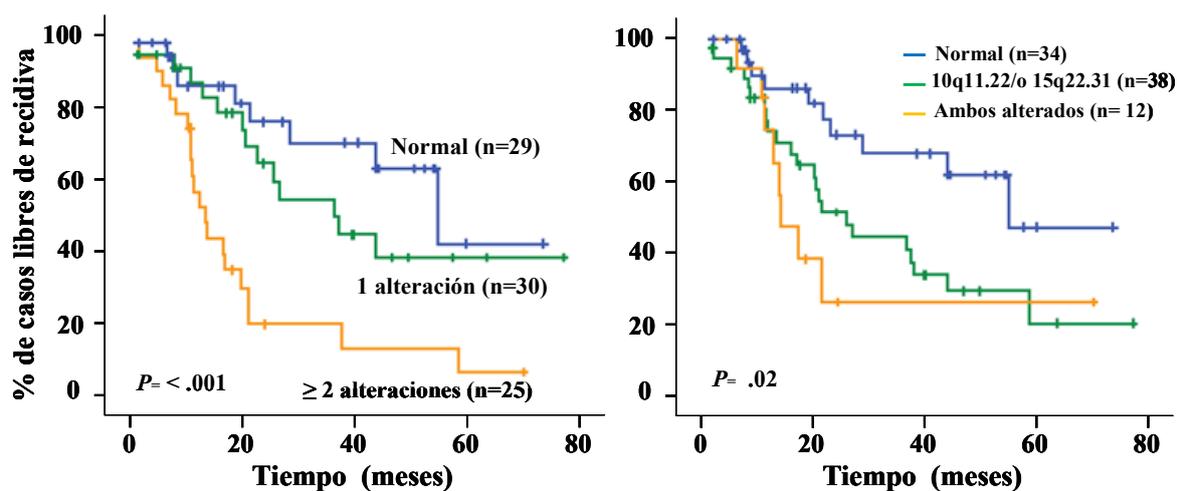


Figura 15. Supervivencia libre de enfermedad en pacientes con resección R0 basado en las alteraciones (A) 1q22, 4p16.3, 10q11.22 y 15q22.31, (B) 10q11.22 y 15q22.31.

El análisis multivariante de factores pronósticos asociados a recaídas mostró que la afectación ganglionar, junto con las anomalías de la región cromosómica 7p22.1-p21.3 y la pérdida de 15q22.31-q23, constituyen la mejor combinación de parámetros individuales a la hora de predecir la supervivencia libre de recidiva en pacientes con ADC gástrico sometidos a una resección R0. En base a estas variables, establecimos un sistema de puntuación para realizar una estratificación pronóstica de los pacientes. De manera que, la ausencia de metástasis ganglionares y un número normal de copias en las regiones 7p22.1 y 15q22.31 presentan un valor 0; presencia de metástasis ganglionares, ganancia de la región 7p22.1 y la del(15q22.1) mostraron valor de 1. De acuerdo con la puntuación de estas variables, aquellos pacientes que no mostraron ninguno de estos tres factores pronósticos fueron considerados con una puntuación 0; y se clasificaron como pacientes de bajo riesgo. Por el contrario los pacientes que cumplían con al menos dos de estos tres factores pronósticos fueron considerados pacientes de alto riesgo; de hecho, 15 de ellos habían recaído a los 20 meses tras la cirugía, mientras que ninguno de los que obtuvieron puntuación 0 lo habían hecho en este período de tiempo. (Figura 16).

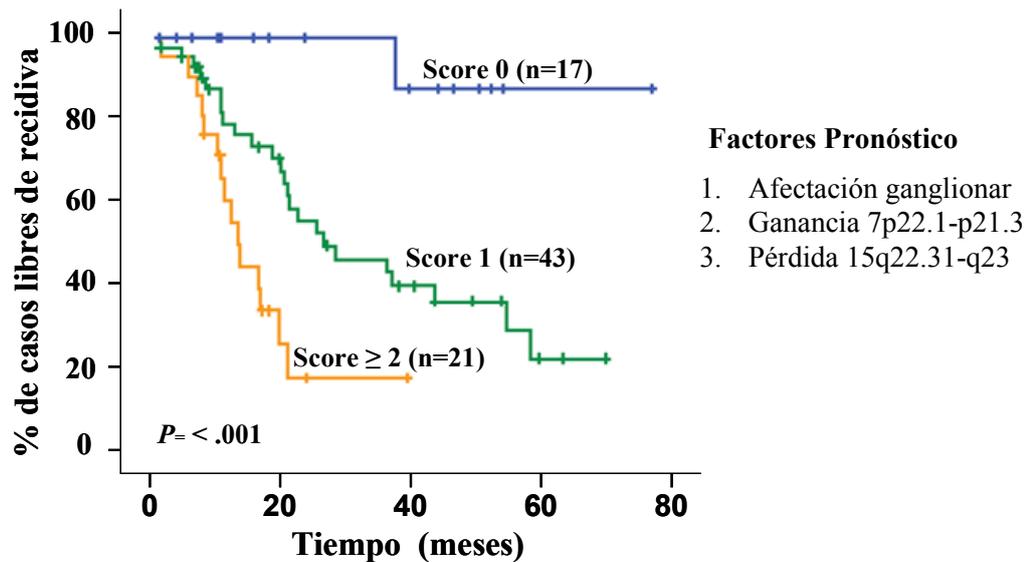


Figura 16. Supervivencia libre de recidiva en pacientes con resección R0 mediante el sistema de puntuación basado en los factores pronósticos independientes

4.5 Impacto de las características clínico-patológicas y las alteraciones genéticas de la enfermedad en la supervivencia global de los pacientes

Entre las variables clínico-patológicas evaluadas, el tipo histológico de Lauren ($p=0.003$), profundidad de invasión de la pared ($p=0.001$), afectación ganglionar ($p=0.002$), metástasis a distancia ($p=0.001$), el estadio tumoral ($p<0.001$) y tipo de resección ($p<0.001$) mostraron una influencia significativa como factores pronósticos adversos, asociándose con una supervivencia global significativamente más corta (Figura 17). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en la supervivencia global de los pacientes según su sexo, edad, localización del tumor, tamaño tumoral, grado histológico, tipo de gastrectomía y de linfadenectomía, y recibir o no tratamiento adyuvante recibido (Tabla 17). Sin embargo, merece destacar que existía una tendencia, no significativa, a que los pacientes con linfadenectomía ampliada ($\geq D2$) mostraran una mediana de supervivencia mayor frente a aquellos en los que la linfadenectomía se limitaba al primer nivel ganglionar ($< D2$). Desde el punto de vista genético los pacientes con pérdidas a nivel de 4p16.3-p16.1 ($p=0.02$), 12q24.31-q24.33 ($p=0.02$), 15q22.31-q24.31 ($p=0.02$) y/o ganancias en 6p12.3-p12.1 ($p=0.02$), 7p22.1-p21.3 ($p=0.04$) mostraron también una supervivencia global significativamente más corta (Figura 18).

Tabla 17. Adenocarcinomas gástricos (n=122): Impacto pronóstico de las características clínico-patológicas y genéticas sobre la supervivencia global detectadas mediante aCGH en el total de la serie.

Variable	Nº de casos	Mediana supervivencia (meses)	Análisis univariante P	Análisis multivariante P
Sexo				
Hombres	71	26		
Mujeres	51	24	NS	—
Edad (años)				
≤ 74	61	27		
> 74	61	21	NS	—
Localización del tumor* (n=111)				
Tercio superior	21	20		
Tercio medio	14	36		
Tercio inferior	74	24	NS	—
Afectación generalizada	2	22		
Tamaño del tumor (cm)* (n= 115)				
≤ 6	65	26		
> 6	50	23	NS	—
Tipo histológico Lauren (n= 117)^a				
Intestinal	72	32		
Difuso	35	23		
Mixto	7	15	0.003	0.02
Indeterminado	3	6		
Grado histológico (n= 117)^a				
Bajo grado	61	26		
Alto grado	56	22	NS	—
Clasificación TNM patológica				
Profundidad de la invasión de la pared (pT)				
T1-T2	19	NA		
T3-T4	103	22	0.001	0.009
Afectación ganglionar (pN)* (n=117)				
N0	29	59		
N1-N3	88	22	0.002	NS
Metástasis a distancia (pM)				
M0	105	27		
M1	17	12	0.001	NS
Estadio* (n=118)				
I-II	53	59		
III-IV	65	20	<0.001	NS
Tipo de gastrectomía				
Total	43	20		
Subtotal	79	27	NS	—
Tipo de Linfadenectomía				
<D2	102	23		
≥D2	20	41	NS	—
Tipo de resección				
R0	93	33		
R1-R2	29	14	<0.001	0.003
Quimioterapia adyuvante				
Sí	63	24		
No	59	24	NS	—
Número de alteraciones genéticas				
≤ 10	46	41		
> 10	76	22	0.008	—
Porcentaje de genoma alterado				
< 16%	61	41		
≥ 16%	61	22	0.02	—
4p16.3-p16.1				
Pérdida	27	22		
Normal	95	26	0.02	NS
6p12.3-p11.2				
Ganancia	17	15		
Normal	105	25	0.02	0.02
7p22.1-p21.3				
Ganancia	9	13		
Normal	113	24	0.04	NS
12q24.31-q24.33				
Pérdida	59	20		
Normal	63	33	0.02	NS
15q22.31-q24.1				
Pérdida	37	20		
Normal	85	32	0.02	NS

* Omisión de casos debido a falta de información clínica; ^a El tipo mucinoso no fue incluido; NS: Diferencias estadísticamente no significativas (p>.05)

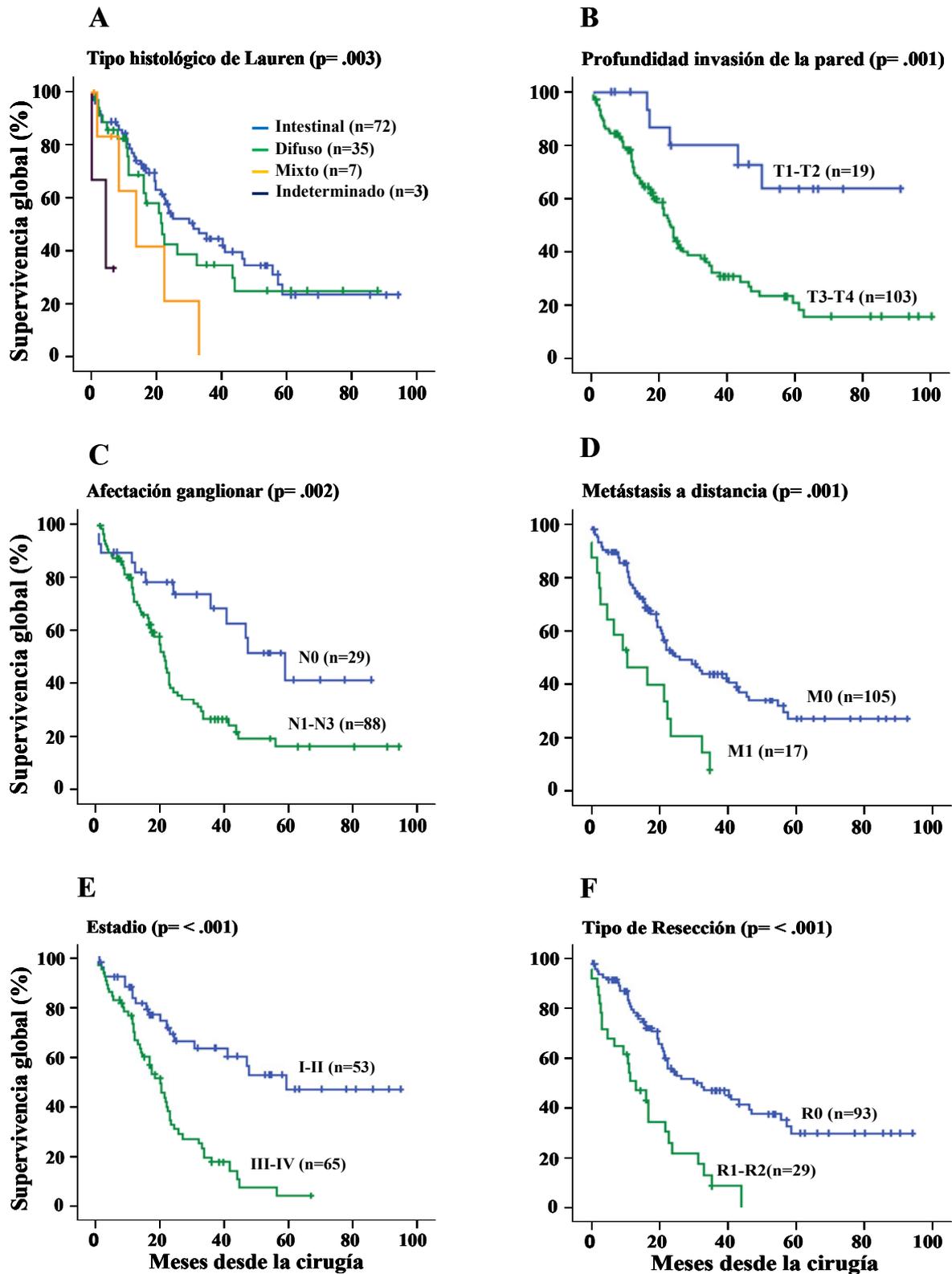


Figura 17. Características clínico-patológicas con impacto significativo sobre la supervivencia global (A) Tipo histológico de Lauren, (B) Profundidad de invasión de la pared, (C) Afectación ganglionar, (D) Metástasis a distancia, (E) Estadío, (F) Tipo de resección.

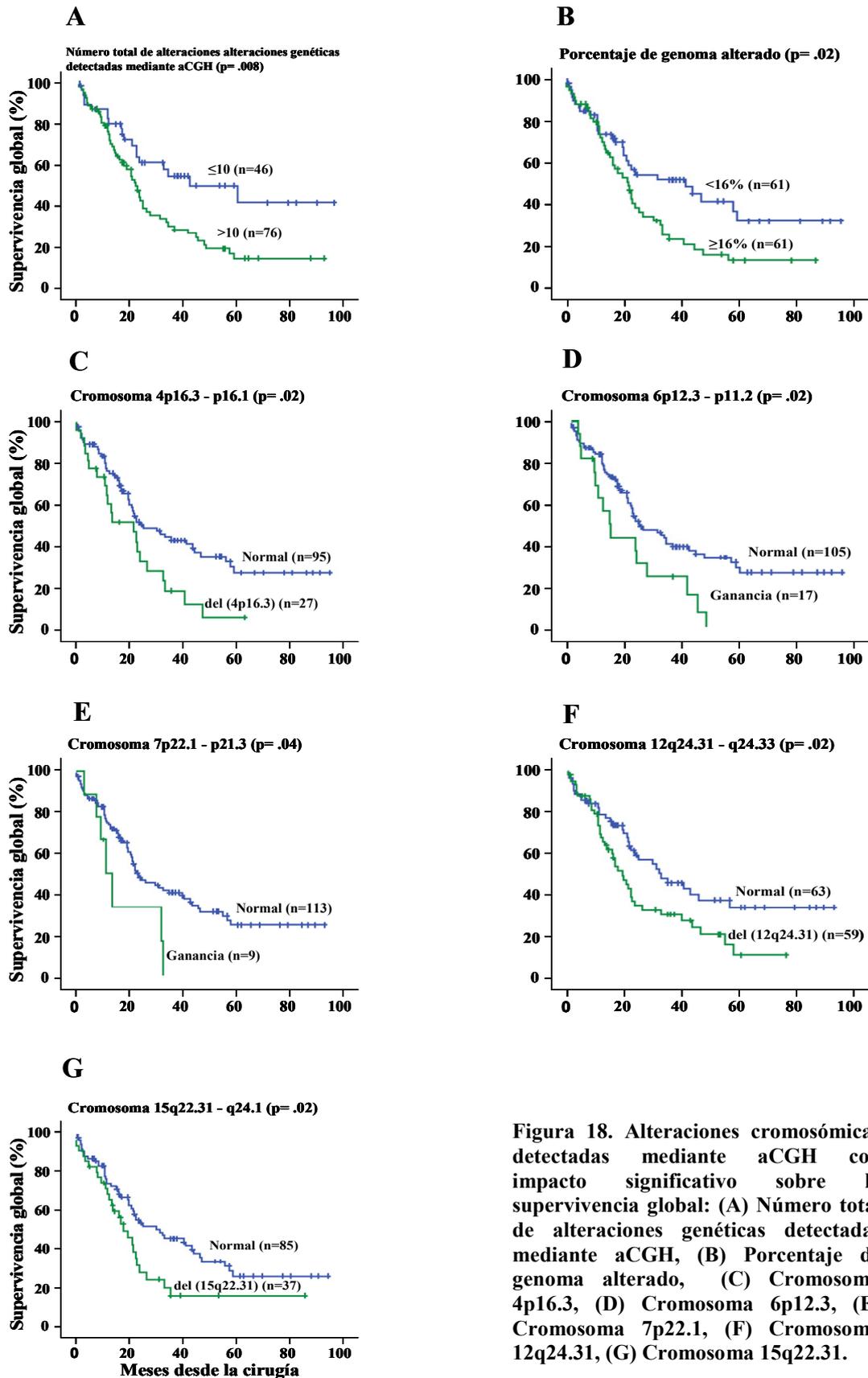


Figura 18. Alteraciones cromosómicas detectadas mediante aCGH con impacto significativo sobre la supervivencia global: (A) Número total de alteraciones genéticas detectadas mediante aCGH, (B) Porcentaje de genoma alterado, (C) Cromosoma 4p16.3, (D) Cromosoma 6p12.3, (E) Cromosoma 7p22.1, (F) Cromosoma 12q24.31, (G) Cromosoma 15q22.31.

El mayor problema en aquellos pacientes sometidos a resección curativa de carcinoma gástrico avanzado (pT3/pT4) es la metástasis peritoneal postoperatoria temprana. Por lo tanto, es muy importante identificar, empleando marcadores moleculares, a los pacientes con alto riesgo de recidiva peritoneal para decidir la estrategia de tratamiento más adecuada. En este sentido, hemos observado que los pacientes T3-T4 que presentaban ganancia de 6p12.3-p11.2 presentaron una supervivencia significativamente más corta, respecto a los casos T3-T4 que no presentaban dicha alteración (mediana de supervivencia 14 meses vs 23 meses, $p=0.03$). (Figura 19).

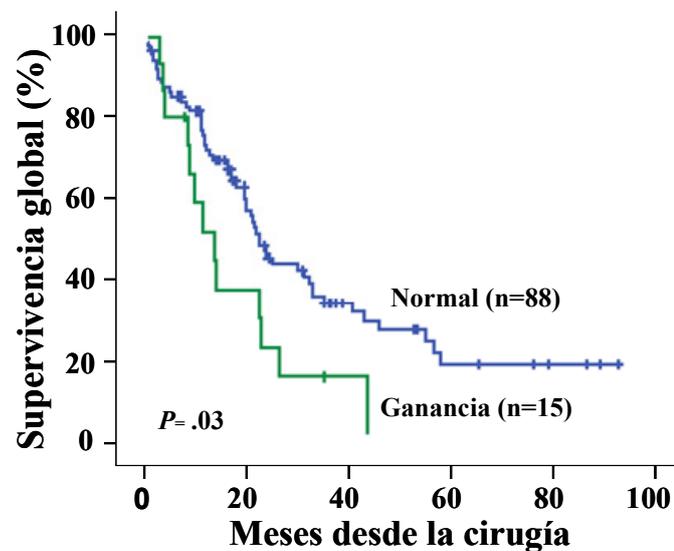


Figura 19. Supervivencia global en los pacientes según profundidad de la invasión de la pared T3-T4 en función de 6p12.3-p11.2

Una vez conocidos las alteraciones genéticas con valor pronóstico en el estudio univariado para cada cromosoma o región cromosómica analizada en los ADC gástricos, nuestro interés se centró en determinar la posible existencia de asociaciones entre dos o más alteraciones cromosómicas distintas. En este sentido, los pacientes se agruparon según el número de alteraciones cromosómicas que involucraban las regiones 4p16.3-p16.1, 6p12.3-p11.2, 7p22.1-p21.3, 12q24.31-q24.33, 15q22.31-q24.1 observándose que los pacientes con 2 o más regiones cromosómicas alteradas tenían una supervivencia significativamente más corta respecto a los pacientes cuyos tumores tenían una sola alteración o ninguna (mediana de supervivencia 18 vs 23 vs 44 meses, $p=0.002$) (Figura 20A).

Las regiones cromosómicas 12q24.31-q24.33 y 15q22.31-q24.1 se perdían con frecuencia de manera combinada junto con las otras alteraciones descritas previamente en este

párrafo. Los pacientes que mostraron pérdidas en estas 2 regiones cromosómicas (mediana de supervivencia 18 meses), tenían una supervivencia significativamente más corta que los que no las mostraron (mediana de 41 meses; $p=0.009$) (Figura 20B)

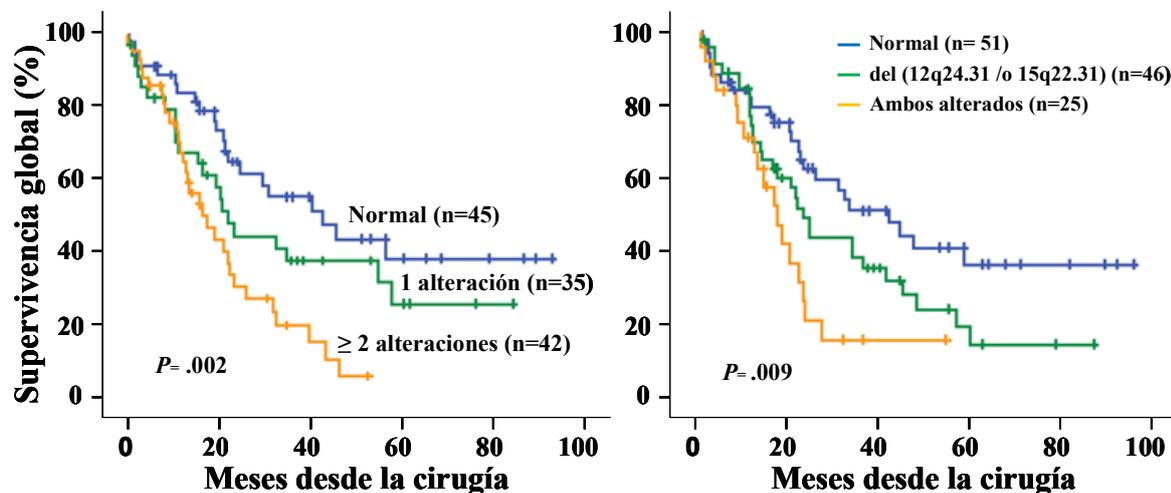


Figura 20. Supervivencia global en Adenocarcinomas gástricos basado en las alteraciones (A) 4p16.3, 6p12.3, 7p22.1, 12q24.31 y 15q22.31, (B) 12q24.31 y 15q22.31.

Ahora bien, el análisis multivariante mostró que sólo el tipo histológico de Lauren ($p=0.02$), la profundidad de invasión de la pared ($p=0.009$), la reseccabilidad quirúrgica del tumor ($p=0.003$) y la ganancia de la región cromosómica 6p12.3-p11.2 ($p=0.02$) tenían valor pronóstico independiente (Tabla 17). A la hora de constituir la combinación de parámetros individuales que mejor prediga la supervivencia global en pacientes con cáncer gástrico, descartamos el parámetro “tipo de resección” al tratarse de un factor que no está intrínsecamente relacionado con la biología del tumor ni sus alteraciones génicas.

De forma análoga al estudio de la supervivencia libre de recidiva, intentamos establecer un sistema de estratificación pronóstica de los pacientes con ADC gástrico en el momento del diagnóstico en tres grupos. Este sistema se aplicó al total de la serie de pacientes en los que se contaba con datos de clasificación de Lauren, y profundidad de invasión de la pared (117/122). Por consiguiente, el tipo histológico intestinal, la profundidad de invasión de la pared T1-T2 y un número normal de copias de la región 6p12.3 tienen valor 0; a su vez, el tipo histológico difuso, y la ganancia de la región cromosómica 6p12.3 tienen valor de 1. De acuerdo con la puntuación de estas variables, los pacientes con ADC gástrico pudieron ser estratificados en tres grupos con tasas de supervivencia global significativamente diferentes desde el punto de vista estadístico ($p=.001$). Como se muestra en la Figura 21, de entre los

pacientes con puntuación igual o superior a dos (n=47) 33 pacientes habían fallecido a los 5 años tras la cirugía (mediana, 18 meses). En contraste con lo anterior, solo tres de los 13 pacientes que presentaban una puntuación de cero habían fallecido durante este periodo de tiempo (mediana a los 5 años, no alcanzada). Los pacientes con puntuación de 1 habían fallecido con mayor frecuencia que aquellos con una puntuación de 0, con una mediana de 32 meses.

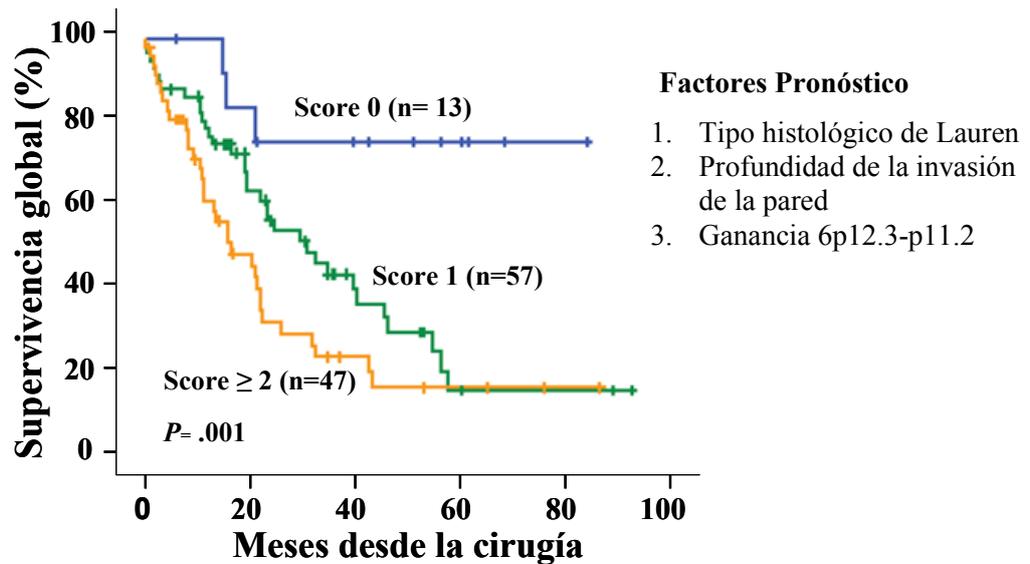


Figura 21. Estadificación pronóstica en pacientes con adenocarcinoma gástrico (n=117) basada en un sistema de puntuación (score) relacionando tres factores pronósticos independientes

Actualmente, la cirugía es la única alternativa terapéutica que ofrece posibilidades de curación del carcinoma gástrico. La resección que conlleva la extirpación tumoral completa macroscópica y microscópica (R0) se comporta como un factor pronóstico favorable independiente. Por ello nos centramos en analizar las diferentes variables clínico-patológicas y genéticas asociadas a la supervivencia en el subgrupo de los 93 pacientes tratados quirúrgicamente con intención curativa. Como se puede observar en la tabla 18 el tipo histológico del tumor tuvo impacto pronóstico, mostrando mejor supervivencia el ADC tipo intestinal, con una mediana de 47 meses, respecto al tipo difuso, con una mediana de 27 meses (p=0.02). Los tumores con mayor grado de infiltración de la pared (T3-T4) mostraron una supervivencia significativamente más corta respecto a los tumores T1-T2 (mediana de supervivencia 24 meses vs no alcanzada, p=0.007)

Tabla 18. Adenocarcinomas gástricos (n=93): Impacto pronóstico de las características clínico-patológicas y genéticas sobre la supervivencia global detectadas por aCGH en pacientes con resección R0.

Variable	Nº de casos	Mediana supervivencia (Meses)	Análisis univariante P	Análisis multivariante P
Sexo				
Hombres	52	33		
Mujeres	41	31	NS	—
Edad (años)				
≤ 74	46	33		
> 74	47	26	NS	—
Localización del tumor* (n=85)				
Tercio superior	15	20		
Tercio medio	8	44		
Tercio inferior	60	34	NS	—
Afectación generalizada	2	22		
Tamaño del tumor (cm)* (n=88)				
≤ 6	51	47		
> 6	37	27	NS	NS
Tipo histológico Lauren (n=89)^a				
Intestinal	55	47		
Difuso	27	27		
Mixto	5	15	0.02	NS
Indeterminado	2	6		
Grado histológico (n=89)^a				
Bajo grado	47	47		
Alto grado	42	23	NS	—
Clasificación TNM patológica				
Profundidad de invasión de la pared (pT)				
T1-T2	19	NA		
T3-T4	74	24	0.007	NS
Afectación ganglionar (pN)* (n=90)				
N0	27	59		
N1-N3	63	22	0.01	NS
Estadio* (n=90)				
I	11	NA		
II	41	59	<0.001	NS
III	38	22		
Tipo de Gastrectomía				
Total	32	21		
Subtotal	61	41	NS	—
Tipo de Linfadenectomía				
<D2	76	27		
≥D2	17	NA	NS	—
Quimioterapia adyuvante				
Sí	43	31		
No	50	33	NS	—
Alteración número de copias				
< 10	39	59		
≥ 10	54	23	0.02	—
Porcentaje de genoma alterado				
< 16%	49	57		
≥ 16%	44	23	0.03	—
4p16.3-p16.1				
Pérdida	17	22		
Normal	76	41	0.02	NS
6p12.3-p12.1				
Ganancia	12	15		
Normal	81	41	0.01	NS
7p22.1-p21.3				
Ganancia	5	15		
Normal	88	41	0.02	NS
12q24.31-q24.33				
Pérdida	42	22		
Normal	51	44	0.02	NS
15q21.1-q22.31				
Pérdida	29	22		
Normal	64	44	0.05	0.03
15q22.31-q24.1				
Pérdida	26	22		
Normal	67	44	0.04	0.04

* Omisión de casos debido a falta de información clínica; NS: Diferencias estadísticamente no significativas (p> .05);

^a El tipo mucinoso no fue incluido; NA: No alcanzada.

Del mismo modo, la afectación ganglionar mostró diferencias significativas en la SG ($p=0.01$); así la supervivencia fue significativamente mayor en pacientes sin afectación ganglionar que en los pacientes con afectación ganglionar, (59 vs 22 meses, $p=0.01$ respectivamente). Finalmente, se observaron diferencias significativas ($p<0.001$) en la SG entre los distintos estadios. En el estadio I no se detectaron eventos en relación con la SG; mientras que para el estadio II y estadio III fue de 59 y 22 meses respectivamente. Por el contrario, el sexo, edad, localización y tamaño del tumor, grado histológico, el tipo de gastrectomía o linfadenectomía realizada y tratamiento adyuvante no mostraron asociación con la SG ($p>0.05$).

Además de las características de la enfermedad, las alteraciones cromosómicas mostraron también una influencia significativa a la hora de predecir la SG, como fueron: pérdidas a nivel de las regiones cromosómicas 4p16.3-p16.1 ($p=0.02$), 12q24.31-q24.33 ($p=0.02$), 15q21.1-q22.31 ($p=0.05$) y 15q22.31-q24.31 ($p=0.04$) y ganancias en 6p12.3-p12.1 ($p=0.01$) y 7p22.1-p21.3 ($p=0.02$), mostrando un valor pronóstico independiente solo las regiones cromosómicas 15q21.1-q22.31 y 15q22.31-q24.1 (Tabla 18). En general, no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes en los que se realizó cirugía con intención curativa y la serie total.

4.6 Validación mediante técnicas de FISH de las alteraciones genéticas detectadas por aCGH

Con el fin de confirmar las alteraciones genéticas detectadas por aCGH, se realizaron estudios de iFISH mediante el uso de seis sondas dirigidas a los genes: *CCND3* (6p21), *EGFR* (7p12), *KRAS* (12p12.1), *RBI* (13q14), *TP53* (17p13), *ZNF217* (20q13.2). Nuestros resultados mostraron un alto grado de correlación entre ambos métodos a pesar de que se realizó el análisis para las regiones genéticas más frecuentemente alteradas. (Tabla 19). Además, las anomalías cromosómicas identificadas en las regiones cromosómicas estudiadas por FISH fueron similares a las encontradas por estudios de aCGH.

Tabla 19. Correlación entre los resultados obtenidos por FISH y aCGH en las regiones cromosómicas más frecuentemente alteradas (6p21, 7p12, 12p12.1, 13q14, 17p13 y 20q13.2).

Sonda FISH	BAC del aCGH que identifica la misma región que la sonda de FISH	Localización Cromosómica	% de alteración por FISH	% de alteración por aCGH	R^2/p
<i>CCND3</i>	RP11-533O20	6p21	28	14	0.58/<0.001
LSI <i>EGFR</i>	RP5-1091E12	7p12	21	6	0.5/<0.001
LSI <i>KRAS</i>	RP11-707G18	12p12.1	12	13	0.95/<0.001
LSI <i>RBI</i>	RP11-174I10	13q14	61	63	0.95/<0.001
LSI <i>TP53</i>	RP11-199F11	17p13	90	95	0.29/0.007
LSI <i>ZNF217</i>	RP4-724E16	20q13.2	60	39	0.56/<0.001

4.7 Estudios de expresión de HER2/neu, p53, p21^{WAF1/Cip1}, EGFR en adenocarcinoma gástrico

En nuestro estudio analizamos la expresión proteica mediante estudios de mediante técnicas de inmunohistoquímica en un total de 170 pacientes con ADC gástrico con el fin de profundizar en el análisis del valor pronóstico de la expresión de varias moléculas implicadas en procesos relevantes de la carcinogénesis y la progresión tumoral. Las proteínas seleccionadas fueron: p53 (relacionada con el control de la proliferación y la supervivencia celular), p21 (ciclo celular), Her2 y EGFR (dianas terapéuticas).

Los resultados obtenidos del estudio inmunohistoquímico de las diferentes proteínas analizadas se detallan en la tabla 20. Hay que señalar que no se han podido estudiar 30 de los 170 tumores incluidos en los TMA, bien por no existir material suficiente para llevar a cabo todos los estudios o por pérdida de cilindros en el TMA. En 70 de los 140 pacientes analizados (50%) la tinción IHQ de los núcleos mostró positividad para la expresión de p53, en 69 para la proteína p21 (49%) y en el resto de los casos 44 (31%) la inmunotinción fue positiva para EGFR que se asocio con la localización tumoral ($p=0.003$) (Tabla 20). Por el contrario, el resto de los marcadores estudiados no se asociaron con ninguna de las características clínico-patológicas de la enfermedad estudiadas y no presentaron influencia significativa en el pronóstico de la misma.

Tabla 20. Adenocarcinomas gástricos (n=140): Relación entre las características clínico-patológicas de la enfermedad y la expresión inmunohistoquímica de los genes *Tp53*, *p21* y *EGFR*.

Variable	N° de casos	p53			p21			EGFR		
		Positivo N (%)	Negativo N (%)	P	Positivo N (%)	Negativo N (%)	P	Positivo N (%)	Negativo N (%)	P
Sexo										
Hombres	82	45 (55)	37 (45)	0.2	39 (48)	43 (52)	0.6	25 (31)	57 (69)	0.8
Mujeres	58	25 (43)	33 (57)		30 (52)	28 (48)		19 (33)	39 (67)	
Edad (años)*		74 (36 - 89)	74 (45 - 92)	0.6	74 (36 - 92)	71 (45 - 91)	0.2	73 (46 - 91)	74 (36 - 92)	0.7
Localización del tumor ** (n=128)										
Tercio superior	32	16 (50)	16 (50)	0.8	16 (50)	16 (50)	0.7	8 (25)	24 (75)	0.003
Tercio medio	14	7 (50)	7 (50)		6 (43)	8 (57)		8 (57)	6 (43)	
Tercio inferior	78	40 (51)	38 (49)		39 (50)	39 (50)		21 (27)	57 (73)	
Afectación generalizada	4	1 (25)	3 (75)		3 (75)	1 (25)		4 (100)	0 (0)	
Tamaño del Tumor (cm)*		74 (36 - 89)	6 (2 - 12)	0.7	6 (2 - 12)	6 (1 - 12)	0.9	6 (1 - 12)	6 (2 - 12)	0.5
Tipo histológico Lauren (n= 134) ^a										
Intestinal	88	46 (52)	42 (48)	0.5	41 (47)	47 (53)	0.4	27 (31)	61 (69)	0.7
Difuso	36	17 (47)	19 (53)		22 (61)	14 (39)		13 (36)	23 (64)	
Mixto	8	5 (63)	3 (37)		3 (37)	5 (63)		2 (25)	6 (75)	
Indeterminado	2	2 (100)	0 (0)		1 (50)	1 (50)		0 (0)	2 (100)	
Grado de Diferenciación (n= 134) ^a										
Bajo grado	79	42 (53)	37 (47)	0.8	39 (49)	40 (51)	0.9	24 (30)	55 (70)	0.8
Alto grado	55	28 (51)	27 (49)		28 (51)	27 (49)		18 (33)	37 (67)	
Clasificación TNM patológica										
Profundidad de invasión de la pared (pT)										
T1-T2	21	10 (48)	11 (52)	0.8	10 (48)	11 (52)	0.9	8 (38)	13 (62)	0.5
T3-T4	119	60 (50)	59 (50)		59 (50)	60 (50)		36 (30)	83 (70)	
Afectación ganglionar (pN)** (n= 135)										
N0	36	17 (47)	19 (53)	0.7	18 (50)	18 (50)	0.9	12 (33)	24 (67)	0.8
N1-N3	99	51 (52)	48 (48)		48 (48)	51 (52)		31 (31)	68 (69)	
Metástasis a distancia (pM)										
M0	119	62 (52)	57 (48)	0.2	56 (47)	63 (53)	0.2	35 (29)	84 (71)	0.2
M1	21	8 (38)	13 (62)		13 (62)	8 (38)		9 (43)	12 (57)	
Estadio** (n=136)										
I-II	59	30 (51)	29 (49)	0.9	26 (44)	33 (56)	0.3	18 (31)	41 (70)	0.7
III-IV	77	38 (49)	39 (51)		41 (53)	36 (47)		26 (34)	51 (66)	
Recidiva*** (n=81)										
Sí	39	15 (39)	24 (61)	0.1	15 (39)	24 (61)	0.4	11 (28)	28 (72)	0.6
No	42	23 (55)	19 (45)		20 (48)	22 (52)		14 (33)	28 (67)	
Exitus** (n=118)										
Sí	72	39 (54)	33 (46)	0.4	37 (51)	35 (49)	0.4	21 (29)	51 (71)	0.7
No	46	21 (46)	25 (54)		20 (44)	26 (56)		15 (33)	31 (67)	

* Resultados expresados como mediana (rango); ** Omisión de casos debido a falta de información clínica; ^a El tipo mucinoso no fue incluido; *** Sólo se estudiaron aquellos pacientes con resección R0.

La expresión de HER-2/neu fue observada en 10 casos (7%), siendo la frecuencia de positividad mayor en los tumores de bajo grado (13% vs 0 %; $p=0.005$). Por el contrario, no se encontró asociación de expresión de HER2/neu con el resto de variables clínico-patológicas estudiadas. Las anomalías del gen *HER2/neu* también se valoró mediante técnica de FISH. La tabla 21 muestra la correlación entre las características clínico-patológicas y la amplificación/sobreexpresión de *HER2/neu*. De igual modo a lo que sucedía con la IHQ, la amplificación de *HER2*, detectada por FISH se correlacionó con el grado histológico del tumor. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre la expresión del gen *HER2* mediante IHQ y FISH (Tabla 21). No obstante, se observó una clara correlación entre la presencia de la amplificación del gen con estadios I y II de la enfermedad ($p=0.03$) y con una mayor supervivencia global ($p=0.05$). (Figura 22), que el grupo de pacientes que presentaron un número normal de copias para el gen *HER2*

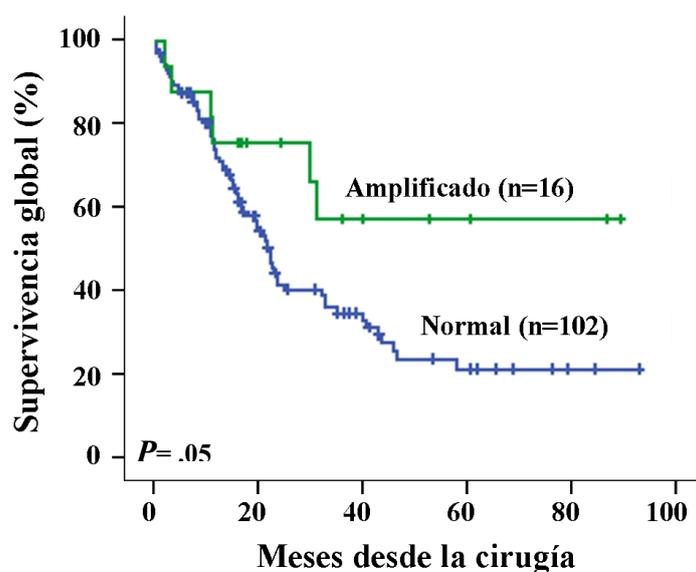


Figura 22. Supervivencia global en adenocarcinomas gástricos del gen *HER2/neu*

Tabla 21. Adenocarcinomas gástricos (n=140); Relación entre las características clínico-patológicas de la enfermedad y el estado de Her2 mediante inmunohistoquímica y FISH.

Variable	N° de casos	IHQ			FISH		
		Negativo N (%)	Positivo N (%)	P	No Amplificado N (%)	Amplificado N (%)	P
Sexo							
Hombres	82	74 (90)	8 (10)	0.2	68 (83)	14 (17)	0.1
Mujeres	58	56 (97)	2 (3)		54 (93)	4 (7)	
Edad (años)*		74 (36-92)	74 (46-81)	0.5	74 (36-92)	72 (45-81)	0.3
Localización del tumor ** (n=128)							
Tercio superior	32	29 (91)	3 (9)	0.6	28 (87)	4 (13)	0.7
Tercio medio	14	14 (100)	0 (0)		13 (93)	1 (7)	
Tercio inferior	78	72 (92)	6 (8)		66 (85)	12 (15)	
Afectación generalizada	4	4 (100)	0 (0)		4 (100)	0 (0)	
Tamaño del Tumor (cm)*		6 (1-12)	7 (3-12)	0.2	6 (1-12)	6 (3-12)	0.7
Tipo histológico Lauren (n= 134) ^a							
Intestinal	88	78 (89)	10 (11)	0.1	72 (82)	16 (18)	0.2
Difuso	36	36 (100)	0 (0)		34 (94)	2 (6)	
Mixto	8	8 (100)	0 (0)		8 (100)	0 (0)	
Indeterminado	2	2 (100)	0 (0)		2 (100)	0 (0)	
Grado de Diferenciación (n= 134) ^a							
Bajo grado	79	69 (87)	10 (13)	0.005	63 (80)	16 (20)	0.005
Alto grado	55	55 (96)	0 (0)		53 (96)	2 (4)	
Clasificación TNM patológica							
Profundidad de invasión de la pared (pT)							
T1-T2	21	18 (86)	3 (14)	0.2	17 (81)	4 (19)	0.5
T3-T4	119	112 (94)	7 (6)		105 (88)	14 (12)	
Afectación ganglionar (pN)** (n= 135)							
N0	36	32 (89)	4 (11)	0.5	30 (83)	6 (17)	0.3
N1-N3	99	93 (94)	6 (6)		89 (90)	10 (10)	
Metástasis a distancia (pM)							
M0	119	109 (92)	10 (8)	0.4	101 (85)	18 (15)	0.07
M1	21	21 (100)	0 (0)		21 (100)	0 (0)	
Estadio** (n=136)							
I-II	59	52 (88)	7 (12)	0.1	48 (81)	11 (19)	0.03
III-IV	77	74 (96)	3 (4)		72 (93)	5 (7)	
Recidiva*** (n=81)							
Sí	39	38 (97)	1 (3)	0.4	36 (92)	3 (8)	0.1
No	42	38 (90)	4 (10)		33 (79)	9 (21)	
Exitus** (n=118)							
Sí	72	68 (94)	4 (6)	0.7	66 (92)	6 (8)	0.04
No	46	42 (91)	4 (9)		36 (78)	10 (22)	

* Resultados expresados como mediana (rango); **Omisión de casos debido a falta de información clínica; ^a El tipo mucinoso no fue incluido; *** Sólo se estudiaron aquellos pacientes con resección R0.

4.8 Correlación entre la expresión *HER2/neu* y *EGFR* detectadas por Inmunohistoquímica y el número de copias de ADN observadas por FISH

Los patrones de expresión encontrados para *HER2/neu* se pueden observar en la tabla 22. En términos generales la expresión detectada para *HER2* y *EGFR* mostró un alto grado de correlación con el número de copias del gen detectadas por FISH ($R=0.9$; <0.001). No obstante, cabe destacar que seis casos ya que mostraron amplificación del gen *HER2* sin detectarse sobreexpresión fueron considerados discrepantes. Para explicar estas discrepancias procedimos a la determinación de *HER2* en secciones completas de tejido en estos casos. De los seis casos, solo un caso mantuvo su puntuación original tras la repetición de la IHQ, mientras en los cinco casos, todos ellos de tipo intestinal, observamos un caso

Tabla 22. Correlación entre la expresión proteica y la amplificación de los genes *HER2/neu* y *EGFR* mediante técnicas de Inmunohistoquímica y FISH.

IHQ	FISH		Total	R ² /p
	Amplificado N (%)	No Amplificado N (%)		
HER2				
3+	10 (100) [§]	0 (0)	10	0.9/<.001
2+	5 (83) [†]	1 (17)	6	
1+	1 (33)	2 (67)	3	
0	1 (1)	120 (99)	121	
Total	17	123	140	
EGFR				
0	0 (0)	10 (100)	10	0.6/.001
1 (1-100)	0 (0)	35 (100)	35	
2 (101-200)	0 (0)	31 (100)	31	
3 (201-300)	0 (0)	15 (100)	15	
4 (301-400)	1 (50)	1 (50)	2	
Total	1	92	93	

§ Tres casos presentaron heterogeneidad intratumoral para tinción de Her2

† Dos casos presentaron heterogeneidad intratumoral para tinción de Her2

un caso con áreas de tumor con tinción fuerte para HER2 mientras que áreas adyacentes del tumor carecen de marcaje para HER2 (Figura 23A), dos casos con expresión variable de HER2 de 0 a 3+ en el mismo tumor (Figura 23B) y en dos casos restantes se observó un clon de células tumorales HER2+ que correspondían al 20% del área tumoral. Por el contrario, no tuvimos que proceder a realizar estudio de FISH en tejido porque en ningún caso encontramos un estudio positivo 3+ para IHQ y negativo mediante FISH.

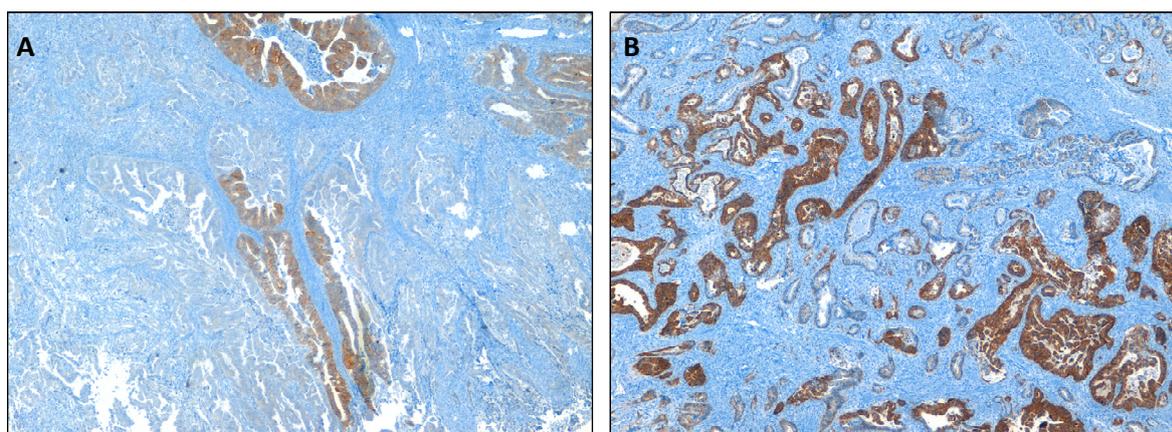


Figura 23. Heterogeneidad intratumoral para la expresión proteica de Her2/neu.

(A) Adenocarcinoma tipo intestinal con expresión heterogénea de Her2 con áreas 3+ adyacente a glándulas que carecen de expresión de Her2. (B) Diferentes patrones de tinción de 0 a 3+

En los 93 casos de ADC gástrico, se encontró IHQ grado 0 en 10 (11%), grado 1 en 35 (38%), grado 2 en 31 (33%), grado 3 en 15 (16%) y grado 4 en 2 (2%). De los 76 pacientes con expresión negativa de EGFR, 50 pacientes (66%) presentaron disomía mediante técnica de FISH, 25 pacientes (33%) trisomía mientras que un paciente mostró polisomía. Entre los 17 pacientes con expresión positiva de EGFR, 3 pacientes (18%) presentaron disomía, 10 pacientes (59%) mostraron trisomía para el gen, tres casos (18%) polisomía y solo un caso (5%) presentó amplificación. Los niveles de expresión proteica se correlacionaron significativamente con el número de copias del gen *EGFR* ($r= 0.9$; $p < .001$). (Tabla 22).

4.9 Comparación de la expresión proteica en tumores primarios y metástasis ganglionares

La metástasis ganglionar es un factor importante en el pronóstico y tratamiento del cáncer gástrico. Se estudió la expresión de proteínas relacionadas con el control de la proliferación y la supervivencia celular (p53, p21) además de dos dianas terapéuticas (HER2 y EGFR) tanto en las metástasis ganglionares como en sus correspondientes tumores primarios. Justificamos este subestudio: i) para identificar cualquier heterogeneidad entre los tumores primarios y sus metástasis ganglionares, y ii) porque además podría proporcionar información importante sobre el mecanismo biológico de la metástasis y la respuesta de la metástasis a la quimioterapia. Solo en 70 pacientes contábamos con muestras pareadas tumor primario/metástasis ganglionar con cantidad de material suficiente para realizar el estudio IHQ con todos los marcadores.

HER2 y p53 presentaron una alta concordancia entre la metástasis ganglionar y el correspondiente tumor primario (Tabla 23). Por el contrario la expresión de EGFR y de p21 mostraron mayor expresión 14 casos negativos para EGFR en el tumor primario, que se hicieron positivos en la metástasis. La proteína que mostró una mayor correlación en su expresión entre el tumor primario y sus correspondientes metástasis ganglionares fue HER2, encontrándose sólo discrepancia en un caso.

Tabla 23. Concordancia en la expresión inmunohistoquímica entre el tumor primario y ganglios linfáticos metastáticos de las proteínas analizadas (n=70).

Proteínas	Concordancia		Discordancia		R^2/p
	Tumor primario / ganglio		Tumor primario / ganglio		
	Positivo/positivo	Negativo/negativo	Positivo/negativo	Negativo/positivo	
Her-2/neu	7	62	1	0	0.93/<.001
p53	35	29	4	2	0.83/<.001
p21	26	30	7	7	0.6/.001
EGFR	15	36	5	14	0.43/.04

4.10 Heterogeneidad genética y vías de evolución clonal en adenocarcinoma gástrico

El uso simultáneo de tres sondas mediante FISH nos permitió caracterizar cada uno de los clones tumorales presentes en cada una de las muestras analizadas, observándose que en cada muestra, coexisten dos ó más clones de células tumorales portadoras de distintas alteraciones cromosómicas. De los 87 adenocarcinomas gástricos incluidos en el estudio, 21 (24%) presentaban un solo clon tumoral; por el contrario de los 66 casos restantes (76%) se identificaron dos o más clones tumorales: 2 clones en 56 casos (64%), 3 clones en 10 casos (12%). Si agrupamos el tipo de alteración cromosómica encontrada en la célula ancestral del tumor, observamos que la anomalía más frecuente fue la ganancia y/o amplificación de una o varias regiones cromosómicas (57%) y en menor frecuencia la delección de un locus específico (28%). De entre las ganancias que encontramos como alteración inicial, el 31 % de los casos correspondía a las regiones cromosómicas 20q13 y 13q14 (20%) en combinación con la ganancia de 6p (11%), amplificación de *HER2* (17%), o menos frecuente la amplificación de *KRAS* (9%). Además de las ganancias cromosómicas encontradas, la delección de 17p de forma aislada (10%) o conjunta con 4p representarían los eventos citogenéticos más tempranos en el proceso de transformación neoplásica de los adenocarcinomas gástricos (Figura 24).

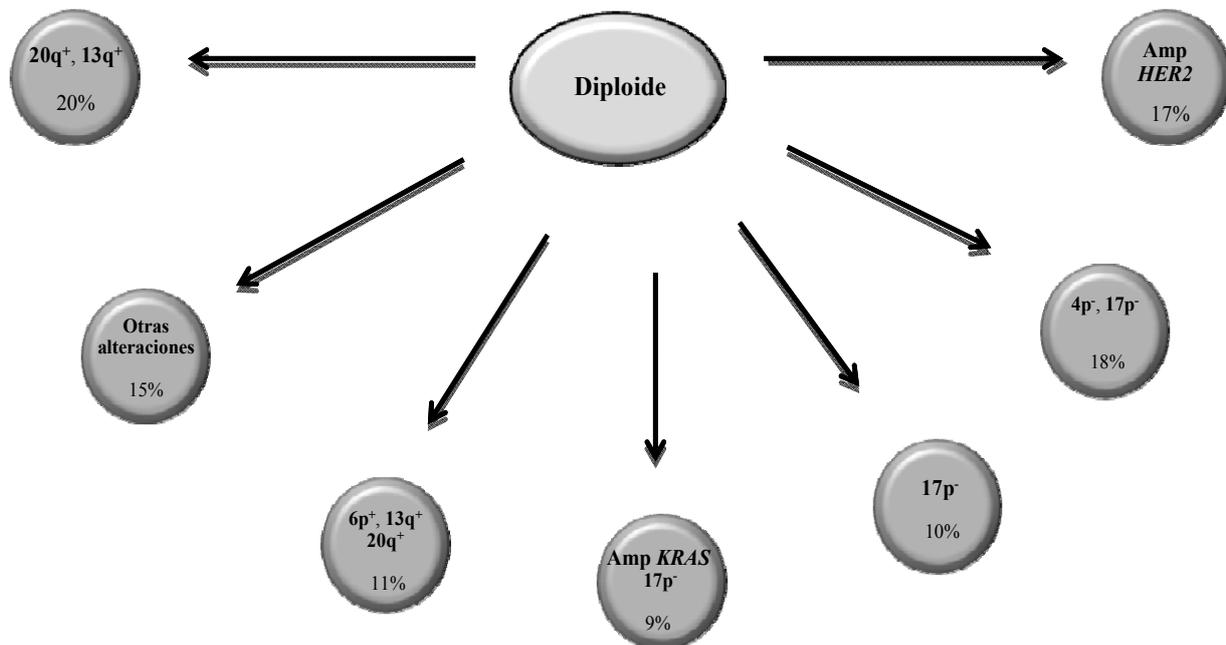
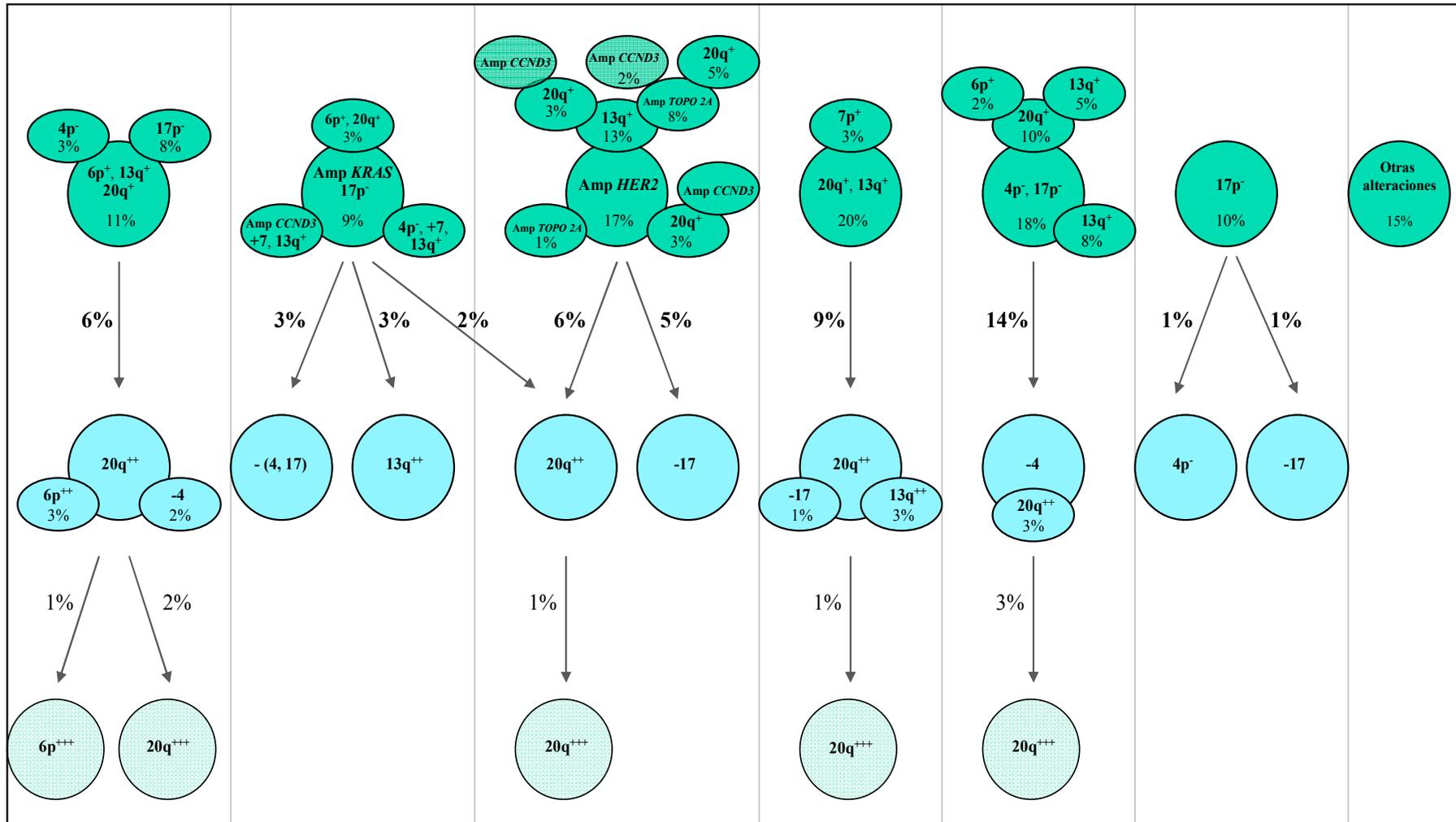


Figura 24. Patrones citogenéticos encontrados en la célula tumoral ancestral (n=89).

En todos los casos analizados, se podía establecer una clara relación entre los diferentes clones de células tumorales encontrados en el tumor y de esta forma establecer un modelo hipotético de evolución clonal, a nivel intratumoral. Aunque los patrones de alteraciones citogenéticas observados a nivel intratumoral fueron con frecuencia comunes a dos o más tumores, la incidencia exacta de cada uno de estos patrones era variable. Un análisis detallado de los diferentes clones de células tumorales presentes en cada muestra analizada nos permitió formular una hipótesis sobre los diferentes patrones de evolución clonal, a nivel intratumoral en estas neoplasias. La figura 25 resume el modelo hipotético de las vías de aneuploidización intratumoral más frecuentes encontradas en los adenocarcinomas gástricos de nuestra serie. De acuerdo a este modelo hipotético de evolución clonal las ganancias, en 20q y 13q como única alteración cromosómica encontrada en (n=17; 20%) o en combinación con la ganancia de 6p (n=10; 11%), representarían los eventos citogenéticos más tempranos en el proceso de evolución neoplásica de los ADC gástricos. Trece de estos casos mostraron una evolución en forma de clones de células tumorales tetraploides: una copia extra del cromosoma 20q (n=5), ganancia de 20q y 13q (n=3), ganancia de 20q y 6p (n=3) ganancia de 20q y monosomía 4/4q- (n=1), ganancia 20q y 17/17q (n=1) y más tarde, en un tercer clon con ganancias en cromosomas 20q y 6p.



■ 1.º Clon aneuploide ■ 2.º Clon aneuploide ■ 3.er Clon aneuploide

Figura 25. Modelo hipotético de evolución clonal:

Vías de aneuploidización intratumoral para las regiones cromosómicas más frecuentemente alteradas (4p,6p,7p,12p,13q,17p y 20q). Los porcentajes muestran la incidencia de casos con un clon tumoral que presenta un patrón cromosómico específico. – Pérdida o delección cromosómica, + Ganancia Amp amplificación de una región cromosómica.

La amplificación de *HER2* se observó en 15 casos en asociación con la ganancia de uno o más de los otros cromosomas estudiados (Figura 26). En 11 casos (13%), la célula ancestral tumoral mostró amplificación de *HER2* y ganancia conjunta de 13q, amp *TOP2A* (n=2), amp *TOP2A* y ganancia de 20q (n=3), amp *TOP2A* y *CCND3* (n=2), ganancia de 20q (n=2), amp *CCND3* y ganancia de 20q (n=1) y amp *HER2* y ganancia 13q (n=1). En los cuatro casos restantes, 3 casos mostraron ganancia de 20q (3%) y 1 caso amplificación de *TOP2A*.

La pérdida de 17p se encontró como la única anomalía cromosómica detectada en el clon tumoral ancestral en 9 casos (10%) o bien en asociación con la pérdida de 4p (17 casos 18%). La amplificación de *KRAS* asociada con la del (17p) también fue encontrada como la primera anomalía genética en ocho pacientes (9%).

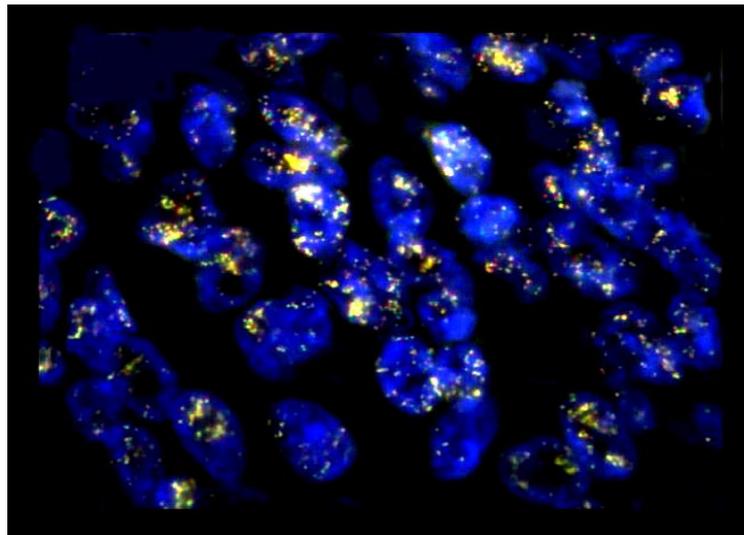


Figura 26. Conjunto de núcleos interfásicos de un adenocarcinoma gástrico hibridados con tres sondas una para la región cromosómica 17q21 (gen *TOPO2A*, puntos rojos), otra para la región 17q11.2-q12 (gen *HER2*, puntos verdes) y otra dirigida a la región centromérica del cromosoma 17 (17p11, puntos azules).

5 DISCUSIÓN

A continuación discutiremos de forma general, aunque individualizada, los resultados obtenidos en relación con cada uno de los objetivos, reflejo de lo descrito anteriormente en las secciones de material, métodos y resultados de este trabajo doctoral.

5.1 Incidencia de alteraciones cromosómicas en adenocarcinomas gástricos

En este estudio analizamos el perfil genético en un grupo de 138 pacientes con ADC gástrico y con el fin de alcanzar un conocimiento más detallado de las alteraciones construimos un array de CGH que permitiese, respecto a las técnicas de iFISH y CGH convencional, una mayor resolución a la hora de identificar la localización exacta y la extensión de los cambios existentes en el número de copias de las diferentes regiones cromosómicas alteradas. La mayor resolución de esta técnica se debe al uso de clones de grandes insertos como son los BAC y PAC que proporcionan una intensidad de señal suficiente para detectar cambios en una sola copia y las alteraciones pueden ser relacionadas con los marcadores genéticos²⁸⁸. Creemos que este es el primer trabajo donde se ha aplicado un “array” de CGH de alta resolución para estudiar el impacto pronóstico de las alteraciones citogenéticas y su relación con las características clínico-patológicas y evolutivas del ADC gástrico. En términos generales, nuestros resultados muestran que los ADC gástricos presentan un perfil genético definido por las pérdidas de los cromosomas 17p13.3, 16q22.1, 12q24.23, 22q13.1, 7q11.22 y 15q21.1 y las ganancias de las regiones cromosómicas 13q21.33, 20p12.1, 10q21.2, 20q13.2, 1q31.1 y 6p12.3. Estos hallazgos son similares a los de los estudios previamente publicados realizados mediante citogenética convencional^{103,105,108,109}, CGH convencional^{120,124,126,127}, aCGH^{132,140,320,351-358}, SNP array³⁵⁹. Para identificar los estudios de interés, se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos Progenetix³⁶⁰ (www.progenetix.net), utilizando como descriptores el código internacional de enfermedades para oncología (códigos de la “International Classification of Diseases for Oncology”, ICD-O-3) 8010/3: Carcinoma, NOS, 8140/0: Adenoma, NOS, 8140/3: Adenocarcinoma, NOS, 8144/3: Adenocarcinoma tipo intestinal, 8145/3: Carcinoma de tipo difuso, 8211/3: Adenocarcinoma tubular, 8480/3: Adenocarcinoma mucinoso, 8481/3: Adenocarcinoma productor de mucina, 8490/3: Carcinoma de células en anillo de sello, 8560/3: Carcinoma adenoescamoso, 8576/3: Adenocarcinoma Hepatoide. Se localizaron un total de 28 publicaciones^{122,126,131,139,145,277,280,320,361-377} que cumplieron con los criterios de selección (las líneas celulares fueron descartadas del análisis y como metodología empleada

se seleccionó CGH convencional y aCGH) correspondientes a 730 muestras. Si bien nuestros resultados coinciden cualitativamente con los de la literatura, observamos diferencias cuantitativas respecto a la frecuencia en que aparecen las alteraciones (Figuras 27 y 28).

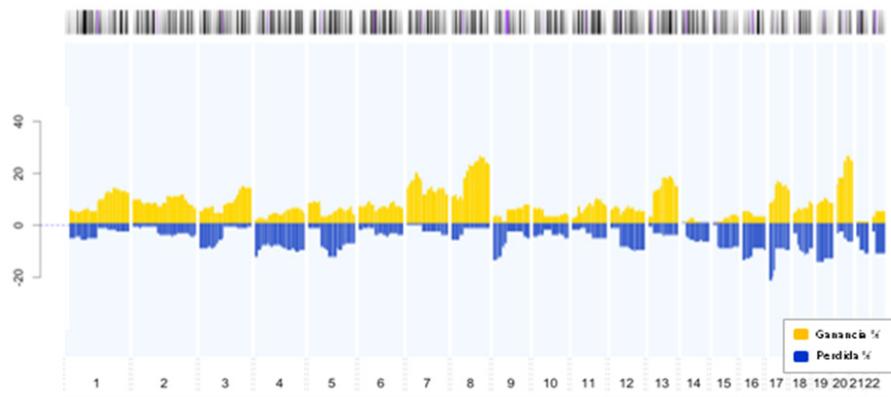


Figura 27. Frecuencia de las alteraciones cromosómicas detectadas mediante CGH en 730 casos de adenocarcinoma gástrico

El eje X representa el número de cromosoma mientras que el eje Y muestra las frecuencias expresadas en porcentaje. www.progenetix.net

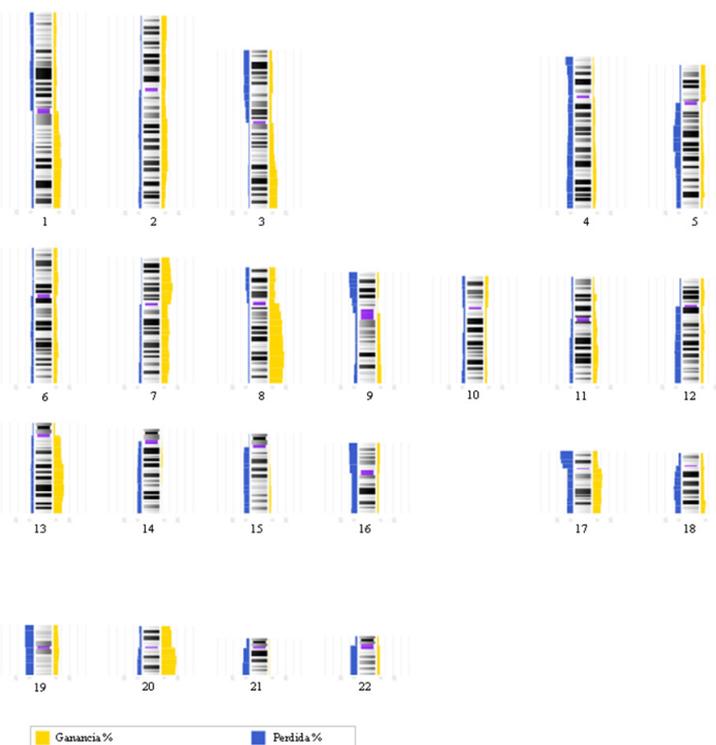


Figura 28. Ideograma de la distribución de ganancias y pérdidas de material genético detectadas por CGH en 730 adenocarcinomas gástricos

Todas las regiones alteradas están representadas a lo largo de los cromosomas: las líneas continuas de la derecha en amarillo representan las regiones de ganancia, y las de la izquierda en azul representan las pérdidas de material genómico.

La alteración cromosómica más frecuentemente encontrada en el presente estudio fue la delección/monosomía del cromosoma 17/17p⁻, detectada en casi la totalidad de los pacientes

analizados (94%). Pese a la diversidad de los resultados encontrados en la literatura^{121,124,131,378,379}, la pérdida del material genético del brazo corto del cromosoma 17, observada con elevada frecuencia en carcinomas gástricos, podría ir asociada a la pérdida de genes supresores de tumor localizados en este cromosoma, que, como *TP53*, intervendrían en el desarrollo neoplásico de, al menos, un grupo importante de adenocarcinomas gástricos^{120,124,126,129,140}. Además de la delección/monosomía del cromosoma 17/17p⁻ encontramos como segunda región delecionada por aCGH la localizada a nivel de 16q22.1-q24.3 (87%), descrita previamente en otros estudios^{121,378,380}. Dentro de esta región encontramos genes como *WWOX*³⁸⁰⁻³⁸⁴, *USP10*³⁸⁵⁻³⁹⁰, *IL17C*^{391,392}, *CDH13*³⁹³⁻³⁹⁵, *TERF2IP*³⁹⁶⁻³⁹⁹, *ADAMTS18*⁴⁰⁰⁻⁴⁰², que podrían estar involucrados en la progresión de los ADC gástricos. Los principales supresores tumorales de la región son *WWOX* (FOR/FRA16D)^{380,384} y *CDH13* (caderina 13/H-caderina/T-caderina)³⁹³⁻³⁹⁵. De ellos, merece especial atención el gen *WWOX*, localizado a nivel de 16q23.3-q24.1 donde se encuentra la región frágil del genoma humano - FRA16D- que se encuentra implicado en el desarrollo de neoplasias malignas tales como: mama⁴⁰³⁻⁴⁰⁵, esófago⁴⁰⁶, pulmón⁴⁰⁷, páncreas^{408,409} y cáncer gástrico³⁸¹⁻³⁸³. En ADC gástricos, la pérdida de expresión de *Wwox* se ha asociado con características adversas de la enfermedad, entre las que se incluyen profundidad de la invasión de la pared, subtipo histológico, estadio y la presencia de metástasis ganglionares³⁸².

Además de las pérdidas en 17p y 16q, encontramos otras pérdidas cromosómicas que afectan preferentemente a los cromosomas 12q24.23-q24.31, 22q13.1-q13.2, 7q11.22-q11.23 y 15q21.1-q22.31, que han sido descritas con menor frecuencia que la pérdida del cromosoma 17^{128,129,278,352,364}. Esto indicaría que estas alteraciones cromosómicas podrían representar cambios genéticos primarios menos relevantes en los adenocarcinomas gástricos, o bien alteraciones secundarias asociadas a la progresión tumoral.

Los arrays genómicos han puesto de manifiesto que entre las ganancias detectadas en nuestro estudio destacan las localizadas en 13q21.33-q32.1, 20p12.1-p11.21, 10q21.2-q21.3 y 20q13.2-q13.33. Las ganancias de los cromosomas 13q y 20q están implicadas en la progresión de adenomas a carcinomas en la carcinogénesis colorrectal^{410,411}, tanto en las lesiones precursoras de cáncer gástrico como en carcinomas, indicando que estas alteraciones cromosómicas son eventos tempranos de la carcinogénesis gástrica^{101,145,372}. En los ADC gástricos se han descrito tanto ganancias como pérdidas a nivel de 13q (hasta un 40% vs 30%, respectivamente)^{128,130,135,145,278,354,372}. La incidencia en este estudio de las ganancias en el

cromosoma 13q21.33-q32.1 (63%) es más elevada que la descrita anteriormente por otros autores^{126,128,135,351,356,373,412}. En esta región están localizados los genes *SCEL* (Sciellin)⁴¹³, *KLF5* (Kruppel-like factor 5)⁴¹⁴⁻⁴²¹ y *GPC5* (Glypican-5)⁴²²⁻⁴²⁷. La sobreexpresión de *SCEL* es considerada un marcador genético en carcinoma papilar de tiroides⁴¹³. Sin embargo queda por conocer el papel específico que este gen pueda tener en cáncer gástrico. El gen *KLF5*, codifica un factor de transcripción localizado a nivel de 13q22.1 implicado en una mayor tasa de crecimiento celular y de fenotipos transformados, por lo tanto, se correlaciona directamente con proliferación celular *in vivo* y se ha propuesto como marcador pronóstico en cáncer de mama⁴¹⁶. Además, *KLF5* desempeña un papel oncogénico en la línea celular TSU-Pr1 de cáncer de vejiga ya que promueve la tumorigénesis de estas células en ratones⁴¹⁹. En cáncer gástrico, Kwak *et al*⁴²⁰ han encontrado una mayor expresión de *KLF5* en cáncer gástrico temprano, en tumores pequeños, y en tumores sin metástasis a ganglios linfáticos. No obstante, Soon *et al*⁴²¹ encuentran asociación con alto grado tumoral, estadio clínico avanzado, presencia de metástasis ganglionares y menor supervivencia a 2 años. Otro gen es *GPC5* que codifica para un proteoglicano de superficie celular⁴²⁶. En este sentido, estudios de los perfiles de expresión génica en rdbomiosarcomas encuentran sobreexpresión/amplificación en la región 13q31-32⁴²² situando a *GPC5* como gen candidato. En esta misma línea se encuentran los resultados observados en líneas celulares de linfoma, en las que se encuentra amplificación de la región 13q31-q32⁴²⁷. Sin embargo el estudio de la expresión de *GPC5* aún no se ha abordado en cáncer gástrico.

Desde el punto de vista citogenético, la ganancia del cromosoma 20 es de especial interés debido a la presencia de un locus de susceptibilidad para enfermedades hereditarias, que incluye por ejemplo al cáncer de próstata⁴²⁸. Diferentes estudios de CGH han mostrado que ganancias tanto en 20p12.1^{124,128,132,133,140,278,356} y/o 20q12-q13^{121,122,124,126,129,145,358,372,429} constituyen la segunda anomalía cromosómica más frecuentemente detectada en cáncer gástrico. Dada la relevancia clínica de la región 20q12-q13, diferentes autores han tratado de profundizar en la caracterización de los posibles oncogenes específicos y genes amplificados en varios tipos de canceres, tales como: hepatocelular⁴³⁰, colorrectal⁴³¹⁻⁴³³, páncreas^{434,435}, pulmón^{436,437}, ovario⁴³⁸⁻⁴⁴⁰, osteosarcoma⁴⁴¹, mama^{442,443}, gástrico y de la unión gastroesofágica^{124,125,358,429}. Dentro de esta región encontramos genes como *AURKA*^{319,321,330}, *CYP24*^{358,431,444}, *TFAP2C*^{353,445}, *NABC1*⁴⁴⁶, *ZNF217*^{135,351,358,447}, *C20orf11*⁴¹², *TNFRSF6B*^{351,448,449}, *STX16*^{351,450} y *GATA5*^{437,440,451}. De entre estos genes, merece especial atención el gen *ZNF217* que codifica un factor de transcripción que está involucrado en la

inmortalización de las células de cáncer de mama cuando se sobreexpresa.^{443,446} En los ADC gástricos, la amplificación de este gen se encuentra en aproximadamente en el 10% de los casos^{135,358,447} y se ha asociado con el tipo intestinal y tipo mixto en comparación con el tipo difuso ($p=0.02$)³⁵¹. Otro gen candidato de esta región es *TNFRSF6B* (Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 6B), conocido también como DcR3 (Decoy Receptor 3). Este miembro de la familia TNFRSF, es una proteína de secreción que ejerce efecto supresor sobre la muerte celular mediada por FasL induciendo apoptosis⁴⁵². La sobreexpresión de este gen en cáncer gástrico se correlaciona con presencia de metástasis ganglionar (pN1-3) ($p=0.02$) y los niveles séricos de *TNFSF6B* se correlacionan con estadio tumoral^{448,449}.

En resumen, comparando estos resultados con los obtenidos por otros grupos en los que emplearon como metodología de análisis CGH convencional y aCGH^{126,128,140,375}, se confirmó que las regiones más frecuentemente afectadas en ADC gástricos fueron las pérdidas en 17p (94%), 16q (87%) y las ganancias en 13q (63%), 20p (47%) y 20q (32%). Por el contrario, en nuestro estudio se observaron más casos con pérdidas en 12q (73%) y 22q (56%) así como un menor número de casos que mostraron ganancias en 8q (13%) y pérdidas en 18q (12%) que los descritos hasta ahora^{126,128,130,140,375}. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la baja resolución de la CGH convencional y el pequeño número de pacientes analizados en una importante proporción de estos trabajos.

La frecuencia relativamente elevada de alteraciones encontradas en el presente trabajo contrasta con los resultados descritos previamente en la literatura. Tal discrepancia podría explicarse, al menos en parte, por la baja resolución de la CGH convencional o al bajo número de casos analizados en los estudios de CGH arrays, hasta en el momento de iniciar este trabajo, en nuestro conocimiento no se había descrito una serie tan amplia en cuanto a número de casos.

Nuestra serie cuenta con un patrón de alteraciones génicas similar al de otras series de casos de pacientes europeos. Estos patrones son diferentes en los pacientes europeos respecto a los asiáticos. Estas diferencias en el patrón de alteraciones genéticas en cáncer gástrico entre los estudios europeos y japoneses podrían estar relacionadas a una manera diferente de carcinogénesis gástrica en el grupo de bajo riesgo de los pacientes europeos y la población de alto riesgo de Japón. No obstante, se requieren estudios en series más amplias de pacientes donde se comparen el perfil de alteraciones de poblaciones de bajo y alto riesgo, para verificar

si estas diferencias genéticas, de hecho implican un riesgo diferente para el desarrollo de cáncer gástrico.

5.2 Impacto de las alteraciones genéticas en el comportamiento clínico de los ADC gástricos.

La existencia de cambios citogenéticos directamente relacionados con la agresividad biológica y el pronóstico de los ADC gástricos, es un dato ampliamente referido en la literatura^{121,122,127,128,132,133,140,280,351,354-356,367,373,453,454}. En la actualidad, siguen siendo relativamente escasos los trabajos en los que se explora y demuestra de forma fehaciente la asociación entre el tipo de alteraciones genéticas concretas de la célula tumoral y el pronóstico del cáncer gástrico. Así, la mayoría de los estudios referidos en la literatura se ha analizado el impacto pronóstico de la ganancia o amplificación del cromosoma 20q^{132,320,351,353,358,412,447}, sin que se haya podido demostrar una asociación clara entre la ganancia/amplificación del cromosoma 20 y el comportamiento clínico, biológico y pronóstico de la enfermedad, a excepción de una mayor incidencia en los tumores de subtipo histológico intestinal^{280,320,351,353,412}, ganglios linfáticos metastásicos³⁵¹, estadio¹³² y recidiva⁴⁴⁷. La comparación de nuestros resultados con los de otros estudios se presenta en la figura 29 y tabla 24. Los hallazgos de estudios previos han correlacionado ganancias en los cromosomas 10q³⁵⁵ y 7p⁴¹² con tipo histológico de Lauren y grado de diferenciación respectivamente, que también está de acuerdo con el presente estudio.

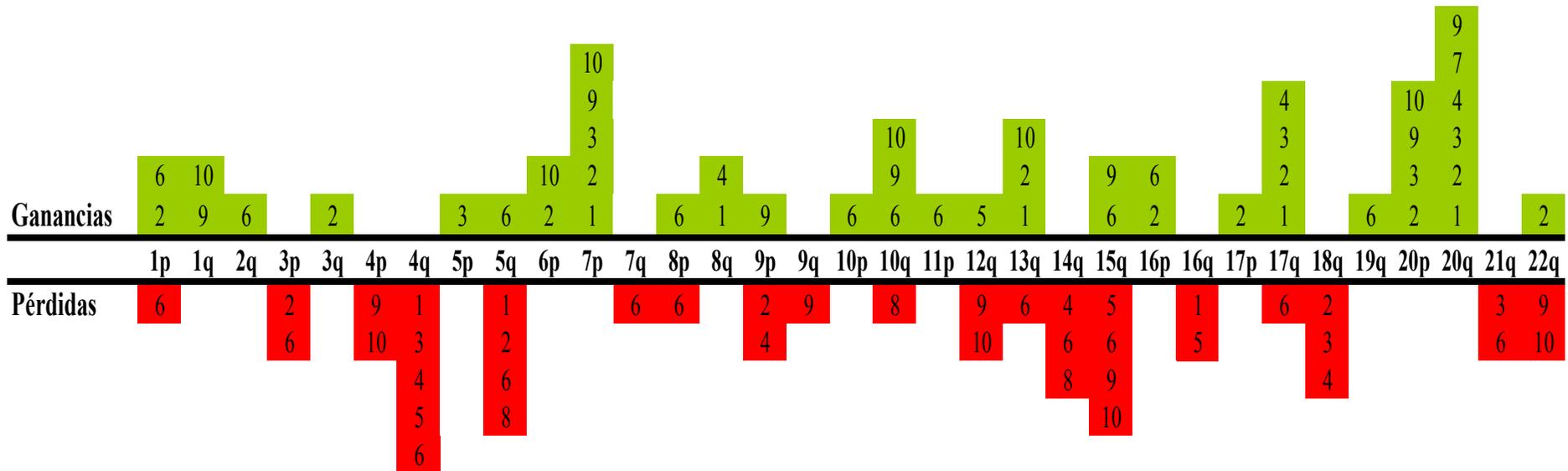


Figura 29. Alteraciones genéticas detectadas mediante CGH y aCGH en ADC gástricos relacionadas con las características clínico-patológicas y evolutivo de la enfermedad en 9 estudios.

Las ganancias (verde) y las pérdidas (rojo). Los 9 estudios son numerados por orden cronológico.

1. Wu *et al*, 2001¹²¹
2. Wu *et al*, 2002²⁸⁰
3. Kimura *et al*, 2004¹²⁸
4. Kang *et al*, 2006¹³²
5. Tsukamoto *et al*, 2008¹⁴⁰
6. Furuya *et al*, 2008³⁵⁵
7. Buffart *et al*, 2009³⁵¹
8. Buffart *et al*, 2012³⁵⁶
9. Cheng *et al*, 2012⁴¹²
10. Presente estudio

Tabla 24. Resumen de 9 estudios de CGH relacionados con las características clínico-patológicas y evolutivas en adenocarcinomas gástricos.

Estudio	Metodología	Nº casos	Lauren	Grado diferenciación	Metástasis a Distancia	Estadio	Recidiva	Supervivencia global	Supervivencia Libre recidiva
1	mCGH	53	8q ⁺ , 13q ⁺ , 17q ⁺ , 5q ⁻			8q ⁺ , 16q ⁻			
2	mCGH	62	3q28-qter ⁺ , 20q ⁺ ,		3p12 ⁻ , 5q14-q23 ⁻ 3p25-pter ⁻	1p32-p36 ⁺ , 5q14-q23 ⁻ , 9p21-p23 ⁻			
3	mCGH	102				18q ⁻			
4	aCGH	28		4q15.2 ⁻ , 4q21.21 ⁻ , 4q28.2 ⁻ , 14q31.1 ⁻	4q23 ⁻ , 4q28.2 ⁻	4q23 ⁻ , 9p23 ⁻ , 14q31.1 ⁻ , 18q21.1 ⁻ , 20q12 ⁺			
5	aCGH	30	4q13.1-q22.1 ⁻ , 4q27-q28.1 ⁻ , 4q28.1-q32.2 ⁻ , 4q32.3-qter ⁻ , 15q25.3-q26.2 ⁻ , 16q22.1-q23.2 ⁻ , 12q14.2-q15 ⁺						
6	aCGH	83	4q34.1 ⁻ , 5q33.2 ⁻ , 8p21.3 ⁻ , 14q32.3 ⁻ , 15q15.3 ⁻ , 17q13.2 ⁻ , 10p15.3 ⁺ , 10q24.2⁺						
7	aCGH	63	20q ⁺						
8	aCGH	206						5q11.2 ⁻ , -q31.3 ⁻ , 14q32.11-q32.12 ⁻ , 14q32.13-q32.33 ⁻	
9	array de oligonucleotidos	27		7p21.1⁺ , 7p15.2 ⁺ 20q13.33 ⁺					
10	aCGH	138	10q11.22⁺	4p16.3-p16.1 ⁻ , 7p22.1-p21.3⁺ , 7p21.3-p21.2⁺ , 10q11.22 ⁺	20p12.1-p11.21 ⁺	4p16.3-p16.1 ⁻ , 12q24.22-q24.31 ⁻ , 15q21.1-q24.1 ⁻ , 15q26.1-q26.2 ⁻	4p16.3-p16.1 ⁻ , 22q13.1-q13.2 ⁻ , 7p22.1-p21.3 ⁺ , 10q11.22 ⁺	4p16.3-p16.1 ⁻ , 12q24.31-q24.33 ⁻ , 15q22.31-q24.1 ⁻ , 6p12.3-p11.2 ⁺ , 7p22.1-p21.3 ⁺	1q22-q25.1 ⁺ , 7p22.1-p21.3 ⁺ , 10q11-22-q21.3 ⁺ , 4p16.3-p16.1 ⁻ , 12q24.31-q24.33 ⁻ , 15q22.31-q23 ⁻

Las alteraciones cromosómicas que con mayor frecuencia se asociaron a las diferentes características-clínico-patológicas fueron la ganancia de 20q y pérdida de 4q asociándose a tumores histológicos de tipo intestinal. En general, la concordancia de los estudios reflejados en la tabla 24 y figura 29 es baja. Esto podría explicarse en parte por las diferencias en las plataformas de CGH, el sistema de análisis de resultados empleado, las características clínico biológicas de los tumores y el número de casos analizados en los diferentes estudios.

Nuestros resultados muestran un mayor número de alteraciones cromosómicas asociadas a las diferentes características clínico-patológicas, que podría explicarse por ser una serie de pacientes con seguimiento prolongado. Además, el paquete informático empleado para el análisis de correlaciones como: el CGHtest que incluye los scripts CGHPermutations, CGHlogrank. Aparte de los test estadísticos citados, ambos “scripts” establecen una tasa de falsos positivos (FDR).

El análisis de la posible relación existente entre las alteraciones cromosómicas encontradas mostró una asociación estadísticamente significativa entre la pérdida de 4p16.3-p16.1 con: estadios avanzados, alto grado de diferenciación histológica, mayor tasa de recidiva, menor supervivencia libre de recidiva y/o supervivencia global. La pérdida del cromosoma 4 ha sido descrita como frecuente en cáncer de: vejiga, colorrectal, hepatocelular, esófago, estómago y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello^{143,455-465}. En carcinoma renal de células claras Klatte *et al*⁴⁶⁴ empleando técnicas de citogenética convencional encuentra una asociación estadísticamente significativa con metástasis a distancia, tamaño tumoral, grado de Fuhrman y menor supervivencia global. En cáncer colorrectal en estadio I y II Al-Mulla *et al*⁴⁶⁰ la pérdida de 4p se asoció con mayor frecuencia a tumores y además es un factor pronóstico independiente para supervivencia libre de recidiva y en ADC ductal de páncreas Gutierrez *et al*⁴⁶⁶. Se asocia con estadios avanzados y una menor tasa de supervivencia.

La presencia de pérdidas en la región 12q24.31-q24.33 en el presente trabajo se relacionó con estadios avanzados y menor supervivencia global. En algunas series de cáncer gástrico las pérdidas de la porción distal de 12q se observan con una frecuencia del 37-47%^{129,278,364}. Por el contrario, otros estudios, realizados mediante estudios de CGH, encuentran incidencias de pérdida de esta región menores o simplemente no las encuentran^{120,124,126,132,133,372}. Esta región contiene a dos genes candidatos, *CDK2API* y

DIABLO relacionados con cáncer gástrico. *CDK2AP1* actúa como un supresor del crecimiento celular en queratinocitos normales, fue identificado y aislado por primera vez en un modelo de cáncer oral en hamster⁴⁶⁷. Codifica una proteína de 115 aminoácidos con un peso molecular de 12.4 kDa (punto isoelectrico 9.62) denominada p12⁴⁶⁸. p12 es una proteína asociada específicamente a la quinasa dependiente de ciclina Cdk2, parece estar implicada en la regulación negativa de la actividad de Cdk2 mediante el secuestro de monómeros de Cdk2 y marcándolos para proteólisis. Además, interacciona con la DNA polimerasa alfa/primasa y actúa como mediador en la fosforilación de la subunidad grande p180, lo que sugiere un papel regulador de la replicación de ADN durante la fase S del ciclo celular^{469,470}. La expresión disminuida de P12 se asocia al desarrollo de cáncer oral y en líneas celulares de cáncer colorrectal con inestabilidad de microsatélites⁴⁷¹. Así, Shintani *et al*⁴⁷² ha sugerido que la mayoría de los carcinomas orales de células escamosas presentan una disminución o ausencia de p12 y esta disminución se asocia con presencia de metástasis ganglionares cervicales y menor supervivencia a 5 años. En cáncer gástrico, Choi *et al*⁴⁷³ en 180 pacientes encontró expresión disminuida de p12 en el 77.8% de los casos analizados y asociación con una mayor profundidad de invasión de la pared y estadios avanzados. El gen supresor tumoral *Smac/DIABLO*, localizado en 12q24.31 que codifica una molécula proapoptótica^{474,475}. Los niveles de expresión varían dependiendo del tipo de cáncer: 70% estómago, 40% pulmón y 22% de los sarcomas⁴⁷⁶. Además, en cáncer de pulmón y carcinoma renal la expresión disminuida de *Smac/DIABLO* se asocia con progresión tumoral y peor pronóstico^{477,478}.

La relación entre las diferentes alteraciones cromosómicas con recidiva en cáncer gástrico es escasa^{133,280,479}. En el presente trabajo, la pérdida de 22q13.1-q13.2 se asoció con tumores con mayor frecuencia de recidivas. Así, Morohara *et al*¹³³ encuentra que las ganancias de 5p14, 7q31 así como la pérdida en 22q11.2 están asociadas con diseminación peritoneal y/o citología peritoneal positiva en cáncer gástrico. Esta región contiene varios genes candidatos *ST13*, *RBX1*, *MKL1*. Sin embargo, en la actualidad queda aún por definir que el papel específico que jugaría cada uno de ellos en el proceso de metástasis peritoneal en cáncer gástrico.

Entre las ganancias cromosómicas detectadas que se asociaron con las diferentes características clínico-patológicas encontramos 10q11.22 con alto grado histológico, tipo histológico intestinal, mayor frecuencia de recidivas y menor supervivencia libre de recidiva. Así, se ha descrito que la frecuencia de ganancias en 10q en ADC gástricos se relaciona con

metástasis ganglionares³⁵⁶, tipo histológico de Lauren³⁵⁵ y profundidad de invasión de la pared⁴¹². Un posible gen candidato de esta región es la Anexina A8. Las anexinas son una familia de proteínas reguladoras del calcio que se unen a la membrana celular y proporcionan el enlace entre la señalización del calcio y las funciones de la membrana celular^{480,481}. La anexina A8 es un miembro relativamente poco descrito de la familia de las anexinas encontrándose en el endotelio corneal, pulmón, riñón y piel^{482,483}. En cáncer de páncreas, Karanjawala *et al*⁴⁸⁴ encuentra sobreexpresión de Anexina A8, estos hallazgos han sido corroborados por estudios mediante análisis de cDNA y arrays de oligonucleótidos^{485,486}. La sobreexpresión de Anexina A8 en cáncer de páncreas es biológicamente interesante por varias razones. Las anexinas tienen funciones reguladoras del calcio y un número de proteínas reguladoras de calcio particularmente de la familia de las proteínas S100. Estas últimas se encuentran sobreexpresadas en cáncer de páncreas sugiriendo su papel crítico para la homeostasis del calcio en cáncer de páncreas⁴⁸⁷⁻⁴⁹⁰. Algunos estudios de microarrays en cáncer de mama en el subtipo basal encuentran Anexina A8 asociada a peor pronóstico⁴⁹¹⁻⁴⁹³.

Como hemos comentado anteriormente, las ganancias en 20p12.1-p11.21 están entre las descritas con mayor frecuencia en cáncer gástrico, Kimura *et al*¹²⁸ encuentra asociación con invasión linfática y la clasificación de Ming. Un posible gen candidato en esta región es *FOXA2*; este es un factor de transcripción. Así, Lehner *et al*⁴⁹⁴ encuentra que HNF6 sirve como proteína coactivadora en la transcripción de *FOXA2*. *HNF6* se encuentra aumentado en los extractos nucleares de las metástasis hepáticas colorrectales, pero no en colon normal, ni en el tumor primario.

Desde el punto de vista clínico, se ha analizado extensamente la repercusión que tiene la presencia de ganancia del cromosoma 1q con menor supervivencia en entidades tumorales como: neuroblastoma⁴⁹⁵, meduloblastoma⁴⁹⁶, mieloma múltiple⁴⁹⁷, tumor de Wilms⁴⁹⁸ y carcinoma papilar de tiroides⁴⁹⁹. De acuerdo con los resultados de estos estudios en el presente trabajo, la ganancia de 1q22-q25.1 mostró una asociación significativa con menor supervivencia libre de recidiva. Esta región contiene varios genes candidatos: *HDGF*, *IQGAP3*, *APOAIBP*. El factor de crecimiento derivado de hepatoma (HDGF *Hepatoma-derived growth factor*) se purificó inicialmente a partir de la línea celular HUH-7 de carcinoma hepatocelular^{500,501}. Se observa un aumento de su expresión en varios tejidos fetales y está involucrado en el desarrollo de órganos tales como pulmón, músculo, vasos, hígado y riñón⁵⁰²⁻⁵⁰⁶, tiene una función mitogénica en carcinoma hepatocelular, fibroblastos,

células endoteliales, células musculares lisas vasculares, y hepatocitos fetales^{503,504,506-508}. *HDGF* se transloca al núcleo y en su localización nuclear estimula el crecimiento celular^{503,509}. Diferentes estudios encuentran asociación entre la sobreexpresión de *HDGF* y peor pronóstico⁵¹⁰⁻⁵¹². Así, Yamamoto *et al*⁵¹³ evalúa la expresión de *HDGF* y su relación con las características clínico-patológicas y pronóstico en carcinomas gástricos. Encuentra que el nivel 2 de expresión de *HDGF* se asocia con tamaño tumoral, patrón de crecimiento infiltrante, invasión vascular y linfática, metástasis ganglionares, invasión tumoral y estadio. Además los pacientes con niveles 2 de *HDGF* mostraron una mayor tasa de recurrencia y menor supervivencia libre de enfermedad y/o supervivencia global. En el análisis multivariante se mostró que el nivel de expresión de *HDGF* como un factor pronóstico independiente intervalo libre de enfermedad y/o supervivencia global. Natrajan *et al*⁵¹⁴ quienes clasifican a los tumores de Wilms según el número de copias de 1q, mostrando claramente que los tumores que presentaban un alto número de copias de 1q tenían una menor supervivencia libre de recidiva en comparación con aquellos que presentaban un bajo nivel de copias. La familia de las proteínas IQGAP interacciona con numerosas proteínas y constituye a regular la polimerización de la actina, la migración y la adhesión celular^{515,516}. *IQGAP3*, codifica una proteína de 180 kDa que regula la proliferación celular por la cascada de señalización Ras/ERK⁵¹⁷ y se encuentra presente en cerebro, pulmón, intestino delgado y colón⁵¹⁷⁻⁵¹⁹.

5.3 Impacto de las alteraciones moleculares en la supervivencia libre de recidiva y supervivencia global.

El cáncer gástrico es una de las neoplasias con mayor incidencia en nuestra sociedad, con un manejo diagnóstico y terapéutico difícil y asociado con una mortalidad elevada. A pesar de las mejoras introducidas en el tratamiento oncológico y de soporte, el pronóstico de los pacientes sigue siendo ominoso salvo en aquellos casos, infrecuentes, en los que es posible la realización de una cirugía con intención curativa y no se encuentra evidencia de afectación linfática locorregional en el análisis anatomopatológico de la pieza de resección quirúrgica⁵²⁰. El tratamiento quimioterápico de la enfermedad avanzada aporta cierto control de la enfermedad, aumentando de manera significativa la supervivencia de los pacientes y mejorando su calidad de vida^{91,93,94,521-523}. A pesar de ello, la introducción de tratamientos citotóxicos más complejos no se ha visto acompañada de una mejora de los resultados de los

mismos, habiéndose alcanzado una fase de meseta en la supervivencia de los pacientes⁵²⁴ que sólo se ha logrado superar actualmente con la adición de un agente, Trastuzumab, dirigido frente a una alteración molecular específica: la sobreexpresión y/o amplificación génica del receptor de membrana con actividad tirosina Kinasa perteneciente a la familia de receptores de factores de crecimiento denominado HER2⁹⁷.

En la actualidad, el único tratamiento potencialmente curativo para el cáncer gástrico es la gastrectomía, la resección completa del tumor no garantiza que no se produzca recidiva; así, aproximadamente del 40% al 65% de los pacientes susceptibles de resección quirúrgica con intención curativa sufrirán una recidiva⁵²⁵⁻⁵²⁸. Hasta la fecha el estadio tumoral es el factor pronóstico más importante y decisivo^{43,529,530}. Refleja una información global sobre la extensión de la infiltración del tumor, invasión locorregional, presencia de adenopatías, su localización y número de éstas⁴². Aporta una medida objetiva para la estratificación de los pacientes según el riesgo de recidiva y supervivencia, sirve de guía para la selección del tratamiento y facilita la clasificación y el análisis de resultados. Sin embargo, el estadio tumoral no es un parámetro perfecto. Las estimaciones sobre el pronóstico evolutivo tras una intervención quirúrgica poseen ciertas limitaciones. Se trata de un sistema válido para obtener predicciones globales, pero es muy limitado para predecir individualmente la evolución más probable.

De todas las características clínicas e histopatológicas analizadas, la edad^{43,531,532}, el tamaño del tumor^{533,534}, el subtipo histológico^{532,535-538} y el tipo de resección^{67,71,539-541}, constituyen los factores pronósticos de mayor valor predictivo en relación con la supervivencia libre de recidiva de los ADC gástricos. Además, existen otras características clínicas que influyen en la recidiva de estos pacientes como son la localización tumoral^{298,542}, el género²⁹⁸. Pese a estas asociaciones pronósticas, en la actualidad seguimos sin disponer de un sistema de estratificación pronóstica en el que se combinen características clínicas, biológicas y genéticas de estos pacientes, y que permitan predecir, a corto *versus* largo plazo, la evolución de los pacientes con ADC gástrico, especialmente entre aquellos que muestran un mejor comportamiento. En este sentido, merece destacar los esfuerzos realizados por diferentes grupos, para establecer sistemas de puntuación pronóstica basados en la combinación de la información genética y otras características clínicas y/o histológicas del tumor^{447,543-551}. Aun así, el grado de aceptación de estos sistemas de puntuación ha sido limitado, probablemente debido a la combinación de diversos factores, entre los que cabe

resaltar la escasa difusión de los estudios genéticos en ADC gástricos, la carencia de sistemas predictivos a corto vs largo plazo, y la necesidad de confirmar los hallazgos de estos estudios en series más amplias, a nivel multicéntrico.

En el presente trabajo, confirmamos el valor pronóstico independiente de la afectación ganglionar, constituyendo este parámetro junto con las anormalidades cromosómicas en 7p22.1-p21.3 y 15q22.31-q23 la mejor combinación de variables independientes para predecir la recidiva tumoral en cáncer gástrico. En conjunto, estos resultados indican que los pacientes con presencia de metástasis ganglionares y/o presencia de alteraciones en estas regiones cromosómicas son más propensos a desarrollar recidivas. No obstante todo lo anterior, merece destacarse que la información disponible en la literatura acerca del pronóstico de los pacientes con cáncer gástrico, se ha centrado habitualmente en la supervivencia libre de recidiva a medio/largo plazo (a los 2 y 3 años respectivamente)^{528,552-557}. Desde el punto de vista práctico, esto no favorece el establecimiento al diagnóstico de un sistema de estratificación pronóstica que ayude a identificar aquellos pacientes con un mayor riesgo de recidiva a corto plazo, en los que sería además recomendable realizar un seguimiento más estrecho. En este sentido, tomamos como punto de referencia para considerar una recidiva como precoz, la supervivencia libre de enfermedad a los 20 meses de la cirugía del tumor primario, ya que durante este periodo es en el que se producen alrededor de la mitad de las recidivas. En nuestro conocimiento, este representa el primer intento de clasificación pronóstica de los ADC gástricos en el que se incluye información sobre las alteraciones citogenéticas del tumor.

Desde el punto de vista clínico, se ha analizado extensamente la repercusión que tiene la presencia de pérdidas del cromosoma 15q en diferentes neoplasias como por ejemplo carcinoma de mama⁵⁵⁸⁻⁵⁶⁰, colorrectal⁵⁶¹, mesotelioma^{562,563}, carcinoma pancreático^{564,565}, carcinoma escamoso de cabeza y cuello⁵⁶⁶, ovárico⁵⁶⁷⁻⁵⁶⁹, neuroendocrino gástrico⁵⁷⁰, esofágico⁵⁷¹ y pulmón^{572,573} y se relaciona con estadios tumorales avanzados^{559,560}. De hecho, se han identificado varios genes supresores de tumor en la región 15q22-q24; entre ellos se incluyen los genes *RPS27L* 15q22.2⁵⁷⁴, *PIAS1* 15q22.3⁵⁷⁵, *PML* 15q22⁵⁷⁶ y *Sin3A* 15q24.2⁵⁷⁷ que muestran una interacción con *Tp53*. De entre estos genes merece destacar el gen *PML*. Se conoció en relación a su fusión con el receptor de ácido retinoico implicado en la translocación cromosómica t(15;17) asociado con leucemia promielocítica aguda⁵⁷⁸⁻⁵⁸². *PML* regula la progresión del ciclo celular, la transcripción de genes y apoptosis⁵⁸³. Varios estudios

han evaluado la expresión de *PML* en diferentes tipos de tumores sólidos.⁵⁸⁴⁻⁵⁸⁹ Así, Gurrieri *et al*⁵⁸⁷ valoró los niveles de expresión de *PML* en diferentes tipos de cáncer encontrando expresión disminuida en carcinoma de próstata (28%), adenocarcinoma de colon (17%), carcinoma de mama (31%), carcinoma de pulmón (21%), linfomas (69%) , tumores del sistema nervioso central (49%) y tumores de células germinales (48%). Estos hallazgos indican que la pérdida de la proteína *PML* no es específica de un tipo de tumor. En ADC gástricos, Lee *et al*⁵⁹⁰ encontraron la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre edad avanzada, invasión linfática, estadios avanzados y una supervivencia global inferior y la pérdida de la expresión de *PML*. Estos hallazgos sugieren que la pérdida de *PML* podría jugar un papel importante en el desarrollo y/o proliferación del tumor. Por el contrario, se encuentra sobreexpresión de *PML* en sarcoma de Kaposi, linfoma de Hodgkin, carcinomas de células escamosas de laringe y de esófago, carcinoma hepatocelular y carcinoma de cuello uterino^{584,586,588,589}. Por lo tanto, es posible que *PML* tenga funciones diferentes según el origen histológico del tipo de cáncer.

Las ganancias en 7p se han identificado como alteraciones frecuentes en los adenocarcinomas gástricos en estudios de CGH^{121,126,133,145,157,362,373}, encontrando asociación con diferentes características clínico-patológicas tales como el subtipo intestinal⁵⁹¹, la invasión venosa¹²⁸ y la clasificación histológica de Ming²⁸⁰. Un posible gen candidato de esta región es *RPA3*, encargado de la recombinación, reparación y replicación del ADN. Así, Kabbrach *et al*⁵⁹² en un grupo de 25 tumores primarios y 61 metástasis de melanoma analizó, mediante arrays de oligonucleotidos la presencia de ganancias y pérdidas de material genético, *RPA3* como uno de los genes candidatos involucrados en procesos metastasicos en melanomas .

La supervivencia del cáncer gástrico a los 5 años a nivel mundial sigue aportando malos datos, con cifras alrededor del 20%¹¹. En Europa y España las cifras alcanzan el 24.9% y el 31.8%, respectivamente¹⁷. Por ello, en los últimos años se ha buscado con ahínco identificar factores pronósticos que pudieran ayudar a predecir, desde el momento del diagnóstico, qué pacientes tratar y en qué momento de la evolución de la enfermedad conviene hacerlo. Hoy se reconoce el impacto pronóstico de diferentes características clínicas, asociadas a supervivencia global. Dentro de ellas, aquellas que se asocian con una menor supervivencia incluyen la afectación metastásica ganglionar^{43,49,593-597}, estadio clínico^{13,43,46}, tipo histológico⁵⁹⁸⁻⁶⁰⁴, nivel de infiltración en la pared gástrica^{597,599,605-607}, tamaño del

tumor⁶⁰⁸⁻⁶¹². En el presente trabajo nos centramos en determinar cuál sería la mejor combinación de factores pronósticos más relevantes a la hora de predecir la supervivencia global de los pacientes. De hecho, la ganancia de 6p junto con el tipo histológico de Lauren y profundidad de invasión de la pared, constituían la mejor combinación de factores pronósticos.

La ganancia de 6p se detecta frecuentemente mediante estudios de CGH convencional en tumores como el melanoma uveal, adenocarcinoma sobre esófago de Barrett y ADC gástrico^{124,125,613,614}. El gen candidato de esta región es *RAB23* localizado en 6p12.1 y es un miembro de la familia Rab GTPasa⁶¹⁵. Hou *et al*⁶¹⁶ sugiere que *RAB23* regula la invasión celular en cáncer gástrico, y en dos cohortes independientes de pacientes, la sobreexpresión de *RAB23* tanto a nivel de RNA como proteico se asoció con el tipo difuso. El hecho de que *RAB23* se encuentra asociado con el tipo difuso es particularmente interesante ya que los tipos difusos son fenotípicamente más invasivos que el tipo intestinal. En esta misma línea, *RAB23* se encuentra sobreexpresado en tejidos gástricos no malignos (por ejemplo, gastritis atrófica con metaplasia intestinal) en comparación con la mucosa normal gástrica⁶¹⁷. Debido a que la gastritis atrófica puede aumentar el riesgo de ADC gástrico, estos resultados plantean la posibilidad de que la sobreexpresión de *RAB23* pueda estar involucrada en una etapa temprana de la carcinogénesis gástrica. Aunque el mecanismo celular exacto de *RAB23* no está claro, *RAB23* desempeña un papel en la facilitación del transporte vesicular, controlando la progresión endocítica a los lisosomas⁶¹⁸. Curiosamente, a pesar de que *RAB23* se describió inicialmente en cerebro^{618,619}. Estudios posteriores demostraron que, también está implicado en la carcinogénesis. La sobreexpresión de *RAB23* se ha descrito en pacientes con carcinoma hepatocelular y asociada con mayor tamaño tumoral⁶²⁰.

5.4 Estudios de expresión de *HER2*, *TP53*, *P21* Y *EGFR* en adenocarcinomas gástricos

La sobreexpresión de la proteína Her2 en cáncer gástrico usando IHQ fue descrita en 1986^{621,622}. Desde entonces multitud de estudios han confirmado la presencia de amplificación y sobreexpresión de este oncogén. La incidencia de sobreexpresión proteica de HER2 oscila en la literatura de acuerdo a dos revisiones publicadas en el 2012^{623,624} entre el 4.4%⁶²⁵ y 53.4%⁶⁰ (media, 18%). Del mismo modo, la frecuencia de amplificación del gen por FISH

oscila su frecuencia entre el 7.1% al 27.1% (media, 15.2%)⁶²⁶. En el presente estudio la amplificación del gen fue del 13%, en comparación con otras series españolas que encuentran el 7.5%⁶²⁷ y 18.2%⁶²⁸. Estas diferencias pueden ser explicadas por dos razones: primero que en nuestro estudio se incluyeron pacientes en todos los estadios clínicos a diferencia del estudio de Gómez-Martín *et al*⁶²⁸ que sólo involucró a pacientes con enfermedad metastásica siendo conocido la mayor expresión de *HER2* en estadio avanzados y segundo, la baja frecuencia de ADC de la unión gastroesofágica en nuestro estudio fue del 2% comparado con otros estudios. El estudio ToGA encontró que la positividad fue más alta en los tumores de la unión gastroesofágica que del estómago (33.2% vs 20.9%; $p < .001$).

Desde el punto de vista clínico, se ha analizado extensamente la repercusión que tiene el oncogén *HER2* como factor pronóstico en ADC gástricos. Una revisión publicada en 2012⁶²⁴ que recogió los estudios presentados entre 1990 y enero 2011 en los cuales se analizaba la asociación de *HER2* con características clínico-patológicas y supervivencia, en cáncer gástrico⁶²⁴. En varios de estos estudios se encontró una relación entre la sobreexpresión y/o amplificación de *HER2* con un menor grado de diferenciación tumoral^{63,178,248,249,625}, estadios tempranos⁶²⁹, una mayor supervivencia en los pacientes con sobreexpresión^{628,630,631}. Aunque se observó una mayor incidencia de casos con sobreexpresión proteica y/o amplificación del gen entre los tumores con tipo histológico intestinal esta diferencia no fue estadísticamente significativa; estos resultados están de acuerdo con nuestros hallazgos^{60,632-636}.

En los ADC gástricos, la concordancia entre la expresión proteica y la amplificación de *HER2* ha sido estudiada en varios trabajos con resultados diversos. Los primeros estudios fueron publicados entre 1990 y 1991 y no evidenciaron una elevada concordancia entre ambos métodos diagnósticos. En una serie de 40 casos²⁴⁵ se encontró sobreexpresión de *HER2* en un 26% de los casos, pero solo un 13% de los casos mostraba al mismo tiempo amplificación génica. Se mostró un resultado similar en un trabajo publicado en el año anterior⁶³⁷. A pesar del pequeño número de muestras analizadas en este trabajo, sólo 34 casos, se objetivó en alguno de ellos la existencia de sobreexpresión proteica sin amplificación del gen. Estos resultados plantearon la posibilidad de que la amplificación del oncogén no fuese el principal mecanismo por el cual se produce la sobreexpresión del receptor en la membrana celular, pudiendo estar implicados otros procesos posttranscripcionales o mecanismos de activación de la transcripción mediados por otros genes diferentes^{245,637}.

En esta tesis hemos estudiado la correlación entre los resultados de análisis inmunohistoquímico de la sobreexpresión de *HER2* con la determinación de su amplificación por técnicas de hibridación *in situ* fluorescente. La correlación entre los resultados del estudio de IHQ y de FISH fue muy alta y estadísticamente significativa. Estos resultados apoyan lo descrito en los últimos años por diversos autores que, empleando métodos de IHQ y FISH estandarizados encontraron entre los resultados de ambas técnicas en el 86% a 96% de los casos^{316,638-641}. Es notable la coincidencia de nuestros resultados con los obtenidos en el estudio ToGA realizado en 3807 muestras. En dicho estudio, la concordancia entre los resultados (considerando los casos 3+ y 2+ con FISH amplificado) y FISH fue del 87.5%. Aunque este dato se enmarca dentro del rango de estudios anteriormente publicados, ha sido ampliamente debatido el que un 23% de los casos presentaran amplificación del gen *HER2* sin sobreexpresión proteica del mismo en la membrana celular (IHQ 0, IHQ 1+). En nuestra serie el 17% de los casos amplificados, de acuerdo con el resultado de FISH, no presentaban sobreexpresión de *HER2*.

La diferencia con la pobre concordancia entre IHQ y FISH publicada en los primeros estudios realizados en cáncer gástrico, viene posiblemente explicada por el empleo actual de métodos diagnósticos estandarizados en todos los trabajos, con diferencias menores tanto en la fase analítica como en la postanalítica o de interpretación de los resultados. Esta discordancia de resultados entre las series publicadas, tanto en mama como en cáncer gástrico se ha intentado explicar considerando los siguientes parámetros: método de determinación de *Her2*, falta de consenso en la metodología y evaluación de la inmunohistoquímica y la heterogeneidad tumoral.

Un aspecto que diferencia el cáncer gástrico del cáncer de mama y que no debemos desdeñar es la heterogeneidad en la expresión y amplificación de *HER2* en el primero. La heterogeneidad de *HER2* y la posibilidad que esto conlleva de falsos negativos o de ausencia de correlación entre dos muestras del mismo tumor determinadas por técnicas diferentes.

Un número significativo de pacientes con cáncer de mama adquieren resistencia durante el tratamiento con Trastuzumab^{642,643}. Una de las posibles causas de la resistencia terapéutica es la heterogeneidad intratumoral de *HER2*, que puede conducir al fracaso del tratamiento debido a la selección de clones que carecen de amplificación de *HER2*⁶⁴⁴. Recientemente el Colegio Americano de Patólogos ha publicado la guía de heterogeneidad

de *HER2* para cáncer de mama que la define como el ratio de señales del gen *HER2* frente a señales del cromosoma 17 mayor de 2.2 en más del 5% pero menos del 50% de las células tumorales⁶⁴⁵. Sin embargo, hay pocos estudios sobre la heterogeneidad intratumoral en cáncer gástrico, con resultados contradictorios, cuya frecuencia oscila entre el 1.5% y 50% según las series publicadas^{316,625,638,646-650}. En este sentido, Marx *et al*⁶³⁸ encuentra amplificación homogénea de *HER2* en un estudio realizado en microarrays de tejidos. Por el contrario, Lee *et al*⁶⁴⁶ en 322 casos encuentran un 16.8% de heterogeneidad (46 IHQ 2+ y 8 IHQ 3+) la cual se asoció estadísticamente con los casos IHQ 2+. La frecuente aparición de expresión heterogénea de *HER2* de un 4.2% en nuestra serie, tiene importantes implicaciones en la evaluación de la expresión de *HER2* en biopsias endoscópicas sobre todo en los pacientes con enfermedad avanzada irreseccable debido al riesgo de falsos negativos en tumores que tienen un menor número de clones *HER2* positivos.

Una característica especial de nuestro estudio es que se ha llevado a cabo no en secciones completas de todo el tumor, sino en matrices tisulares que contienen varias pequeñas muestra de cada tumor, obtenidas con cierto margen de azar (selección en el bloque de parafina a partir de marcas de las áreas representativas sobre la preparación microscópica correspondiente) y que representan una proporción baja del volumen total del tumor. Este diseño, que podría suponer que las muestras fueran menos valorables, obvia este inconveniente incluyendo varias muestras de cada caso (por triplicado) y, otro lado, permitiendo estudiar con máxima rapidez y eficacia un gran número de tumores. Cuando hay que hacer una valoración semicuantitativa de positividades, el empleo de micromatrices tisulares, en las que se tiñen todas las muestras por igual, supone una mayor homogeneidad en los resultados de la inmunohistoquímica. Por otro lado, con un diseño basado en micromatrices tisulares, se está analizando también la aplicabilidad de las moléculas estudiadas a biopsias endoscópicas, de las que el TMA puede considerarse en cierto modo una simulación. En nuestro análisis de microarrays de tejidos, la amplificación de *HER2* por FISH fue más robusto, ya que a menudo identifica *HER2* positivos debido a la frecuente aparición de expresión heterogénea de *HER2* por IHQ en ADC gástricos y adenocarcinoma de la unión gastroesofágica. Es importante destacar que, tumores con tinción heterogénea de *HER2* por IHQ a menudo muestran amplificación del gen *HER2* en áreas que carecen de sobreexpresión de *HER2*. Además, la expresión heterogénea de *HER2* se observó en los adenocarcinomas que no muestran heterogeneidad morfológica, es decir, las glándulas neoplásicas que muestran la sobreexpresión de *HER2* son histológicamente idénticas a los que carecen de

sobreexpresión de HER2 y se encontraban entremezcladas. Curiosamente, en el estudio ToGA, los pacientes que tenían tumores que mostraban amplificación del gen *HER2* por FISH pero que carecen de sobreexpresión de la proteína por IHQ parecen no beneficiarse de la adición de trastuzumab al régimen de quimioterapia. Esto sugiere que el nivel de expresión de HER2, independientemente de la presencia de amplificación génica, predice la respuesta a la terapia con trastuzumab. Sin embargo, no está claramente indicado en el estudio ToGA qué proporción de casos HER2 FISH positivo/IHQ negativos fueron de piezas quirúrgicas o de muestras endoscópicas.

En el cáncer gástrico se han realizado numerosos estudios para la detección de alteraciones del gen *TP53* a través de técnicas moleculares e inmunohistoquímicas, habiéndose encontrado una frecuencia de alteraciones que oscila entre un 17%-84 % de los casos en (50% en nuestro estudio)^{200,651-653}. La influencia de la expresión inmunohistoquímica de p53 en el pronóstico es controvertida, encontrándose resultados muy variados en los diferentes trabajos, algunos de los cuales asocian la positividad de p53 a un peor pronóstico^{200,218,220}, mientras que otros demuestran que no existe asociación significativa con el estado de la proteína p53^{221,222,653}. La expresión de p21 se encuentra regulada directamente por p53. En los carcinomas gástricos se ha publicado expresión de p21 en 32-75%⁶⁵⁴. En nuestro estudio, el 49% de los carcinomas fueron positivos para p21. Varios autores encuentran que la sobreexpresión de p21^{WAF1} y p27^{KIP1} es un factor de buen pronóstico¹⁹², aunque algunos estudios muestran resultados opuestos^{275,655-657}, Liu *et al*⁶⁵⁸ sugieren que la valoración combinada de la expresión de p21^{WAF1}, p27^{KIP1}, y p53 permite una estimación precisa del pronóstico en pacientes con cáncer gástrico. En nuestro estudio no se encontró correlación entre la falta de expresión de p21 y p53 con ninguna de las características clínico-patológicas. En nuestra serie detectamos la presencia de ganancias del cromosoma 7 en el 46% de los casos, correspondiendo estas alteraciones tanto a trisomías, como a tetrasomías, aunque la amplificación de *EGFR* no era una alteración frecuente en los adenocarcinomas gástricos. Se encontró en el 18% la sobreexpresión proteica. Existe discrepancia en la literatura acerca de la frecuencia de amplificación y sobreexpresión del *EGFR* en ADC gástricos, y esto es debido a diferentes circunstancias, tales como distintos métodos de detección y de evaluación, el origen étnico de los pacientes. Una de las dificultades más importantes del uso de la FISH es la interpretación de los resultados. En la actualidad se tiende a incluir como resultados positivos no sólo los casos con verdadera amplificación, sino también aquellos con alta polisomía^{312,343}. Utilizando este criterio, aproximadamente el 16% de los ADC gástricos presentan un resultado de FISH

positivo³⁴³. En relación con los estudios inmunohistoquímicos, se estima que entre el 2% al 52%^{62,343,659-662}.

La principal vía de diseminación del ADC gástrico son las metástasis a los ganglios linfáticos regionales. Además, la presencia de enfermedad metastásica en los ganglios linfáticos es uno de los factores más importantes que determina el tratamiento y el pronóstico de estos pacientes. Por tanto, es fundamental conocer los mecanismos implicados en el desarrollo de metástasis si queremos avanzar en el conocimiento de la enfermedad.

A diferencia del cáncer de mama, actualmente no hay datos definitivos disponibles que aborden el estado de *HER2* en el tumor primario y sus metástasis en pacientes con cáncer gástrico. En tres estudios, se encuentra una alta concordancia entre el estado de *HER2* en el tumor primario y su correspondiente metástasis, lo que sugiere que el estado de *HER2* se mantiene sin cambios durante el proceso de metástasis en la mayoría de los casos^{638,663,664}. Por el contrario, Kim *et al*⁶⁶⁵ en cuatro cohortes independientes que consistían en: 325 tumores primarios por triplicado y 250 metástasis por duplicado: 124 tumor primarios y su metástasis sincrónicas en ganglios regionales, 65 tumores primarios y sus metástasis sincrónicas a sitios distantes, 61 tumores primarios y metástasis metacrónicas de sitios distantes. En el análisis FISH de los 325 tumores primarios por triplicado, 8 casos (2.5%) mostraron amplificación con un patrón heterogéneo, mientras 27 casos (8.3%) amplificación homogénea. En los resultados de FISH en las 250 lesiones primarias y sus correspondientes metástasis siete casos fueron discordantes (2.8%). En 6 casos se produjo la conversión positiva en la metástasis (2.4%), mientras que la conversión negativa solo ocurrió en un caso (0.4%). Cuando los 7 casos discordantes se evaluaron en secciones completas de tejido mediante FISH, 6 mostraron amplificación heterogénea en el tumor primario y de estos 6, 3 casos presentaron amplificación heterogénea, 2 casos amplificación homogénea y un caso no presento amplificación en la metástasis. El caso restante fue negativo por FISH en el tumor primario y amplificación heterogénea en la metástasis.

Sólo hay un estudio previo que haya analizado la expresión proteica en un número elevado de casos⁶⁶⁶. En dicho estudio se evalúa la expresión de 32 proteínas asociadas a cáncer gástrico en 250 muestras pareadas de tumor primario y su correspondiente metástasis ganglionar mediante IHQ usando matriz de tejidos. En las metástasis ganglionares, se

observó mayor expresión de EGFR, HER2, y TFF1 y expresión disminuida de β -catenina, E-cadherina, FHIT, GST-pi, KAI1 y NF kB en los tumores primarios.

La proteína que mostró una mayor correlación en nuestro estudio (sólo había un caso discrepante) fue HER2, lo cual es congruente con que sus alteraciones son un evento precoz en la carcinogénesis y que se mantendrían durante el desarrollo. En las proteínas p53 y p21 no había un predominio claro de casos positivos ni negativos, lo que indica que las alteraciones de estas proteínas no tienen un papel favorecedor de la metástasis, tal como confirman estudios previos. Sin embargo, el mantenimiento del funcionamiento anómalo de p53 en las metástasis permitiría la proliferación celular incontrolada, al igual que en el tumor primario. Respecto a EGFR la expresión en la metástasis se hallaba incrementada respecto al tumor primario. En la mayoría de los casos en que había discrepancia, se apreció que se trataba de casos con expresión cercana al punto de corte elegido para la dicotomización, por lo que pequeñas variaciones en la expresión entre el tumor primario y la metástasis pudieron explicar los resultados discrepantes. Nuestro estudio confirma que la mayoría de las alteraciones moleculares existentes en las metástasis ganglionares ya están presentes en el tumor primario. Esto indica que la capacidad metastásica se adquiere ya precozmente durante la carcinogénesis y se mantiene durante la progresión tumoral. Desde el punto de vista práctico, dado que las alteraciones moleculares que favorecen la diseminación metastásica están presentes en el tumor primario, su detección permitiría identificar a los pacientes con mayor riesgo de tener metástasis.

La única limitación de nuestro estudio es la ausencia de muestras de metástasis a distancia a parte de los ganglios linfáticos regionales. No hemos podido incluir muestras de metástasis a distancia, debido a la escasez de material de tejido extirpado. El mecanismo de metástasis a distancia es principalmente hematógena y puede variar dependiendo del órgano diana en contraste con la metástasis a ganglios linfáticos regionales. Por lo tanto, la comparación entre los tumores primarios y sus metástasis a distancia podría mostrar diferentes resultados al de este estudio.

5.5 Heterogeneidad genética y vías de evolución clonal en los adenocarcinomas gástricos.

Estudios recientes indican que los ADC gástricos son tumores citogenéticamente heterogéneos, que con frecuencia muestran cariotipos complejos en los que se asocian cuatro o más alteraciones cromosómicas de tipo numérico y/o estructural^{357,412,667}. A pesar de su marcada heterogeneidad genética, en la mayoría de los trabajos publicados se comparte la hipótesis de que el evento más temprano, implicado en la formación del tumor es la pérdida de 17p y ganancia del cromosoma 20. Posteriormente a la ganancia del cromosoma 20, se irían incorporando a la célula neoplásica otras anomalías cromosómicas que afectan principalmente a los cromosomas 13q, 6p, 4p, 17q. La elevada frecuencia de cambios genéticos asociados a pérdidas y ganancias cromosómicas sugiere que las anomalías asociadas a la inestabilidad cromosómica juegan un papel importante tanto en el desarrollo como en la progresión de los ADC gástricos.

En los últimos años, en diferentes trabajos se han postulados modelos hipotéticos donde se recogen las vías de evolución clonal asociadas a la progresión de los ADC gástricos, basándose en los cambios cariotípicos encontrados en tumores según el tipo histológico de Lauren. Sin embargo, estos modelos hipotéticos de evolución clonal se fundamentan en la extrapolación de los resultados citogenéticos obtenidos por diferentes tumores y no se han contrastado a nivel intratumoral. Un pre-requisito importante a la hora de estudiar la heterogeneidad genética a nivel intratumoral, es la disponibilidad de técnicas que a través de la identificación simultánea de dos o más alteraciones cromosómicas en una misma célula tumoral, permitan la caracterización de todas y cada una de las distintas poblaciones celulares presentes en el tumor, en ausencia de selección clonal. En este sentido, mediante el empleo de técnicas de FISH, sobre núcleos interfásicos en una serie amplia de ADC gástricos, observamos que en una importante proporción de los casos analizados coexistían dos o más clones de células tumorales portadoras de distintas alteraciones cromosómicas. Además, en todos los casos analizados, se podía establecer una clara relación entre los diferentes clones de células tumorales encontrados en el tumor y de esta forma establecer un modelo hipotético de evolución clonal, a nivel intratumoral. Aunque los patrones de alteraciones citogenéticas observados a nivel intratumoral fueron con frecuencia comunes a dos o más tumores, la incidencia exacta de cada uno de estos patrones era variable. Para poder identificar la

secuencia mediante la que posiblemente se fueron acumulando distintas anomalías cromosómicas en un tumor que presentase múltiples subclones en el momento del diagnóstico, asumimos que las alteraciones comunes a todos los subclones representaban cambios tempranos; por el contrario, los cambios citogenéticos tardíos únicamente estarían presentes en algunos de los subclones que formaban parte del tumor. De acuerdo con este concepto de evolución clonal⁹⁸, la ganancia de 20q, 13q, amplificación de *HER2* y *KRAS*, la delección de 17p de forma aislada o en combinación con la pérdida de 4p, representarían los eventos citogenéticos más tempranos en el proceso de transformación neoplásica de los carcinomas gástricos. Estos resultados están de acuerdo con los observados por otros autores. En este sentido, Uchida *et al*³⁷⁹, empleando aCGH encuentran que la ganancia de 20q y la pérdida de 17p, constituye un hallazgo frecuente en el Carcinoma in situ (CIS) (50% respectivamente), menos frecuente en los adenomas de alto grado (7.7% respectivamente). Es interesante comentar que la frecuencia de ganancias de 20q es alta en ADC gástricos avanzados, al igual que en los CIS. Estos resultados sugieren que los carcinomas gástricos avanzados se derivan de CIS y demuestran que la ganancia de 20q es un evento temprano en la carcinogénesis gástrica.

En nuestro conocimiento este constituye el primer intento para establecer un modelo de evolución clonal a nivel intratumoral en ADC gástricos basados en estudios de iFISH. Hasta la fecha, sólo Peng *et al*³¹ habían propuesto un modelo de evolución clonal en ADC gástricos basado en los hallazgos de CGH convencional y aCGH. Sin embargo, en este modelo se recogen sólo aquellos casos de tipo difuso; además estos casos fueron divididos de acuerdo a estadios tempranos y avanzados en este subtipo histológico. Los demás modelos de progresión tumoral están basados en las diferencias observadas en los patrones citogenéticos en los subtipo intestinal y difuso^{320,378,668}. Estos modelos asumen que los ADC gástricos en estadios tempranos progresan a estadios avanzados de la enfermedad, a la vez que irían acumulando un mayor número de anomalías cromosómicas.

Debido a que en el presente trabajo sólo se estudió una pequeña parte de cada tumor y a que la técnica de iFISH sólo analiza una parte de todo el genoma, no podemos excluir la posibilidad de que existan subclones tumorales adicionales a los encontrados.

6 CONCLUSIONES

En relación con la incidencia de alteraciones cromosómicas en los adenocarcinomas gástricos.

- La técnica de array de CGH ha permitido definir el perfil de pérdidas y ganancias de regiones cromosómicas en adenocarcinomas gástricos. Las pérdidas genéticas más frecuentes se localizaron en las regiones cromosómicas 17p13.3-p13.1, 16q22.1-q24.3, 12q24.23-q24.31, 22q13.1-q13.2, 7q11.22-q24.3 así como a ganancias de 13q21.33-q32.1, 20p12.1-p11.21, 10q21.2-q21.3, 20q13.2-q13.33 y 1q31.1-q31.3.

En relación con el impacto clínico y pronóstico de las alteraciones cromosómicas en adenocarcinomas gástricos:

- Las alteraciones genéticas que se asocian a las siguientes características clínico-patológicas : estadios avanzados, alto grado de diferenciación histológico, tipo histológico de Lauren y metástasis a distancia, son las pérdidas en las regiones cromosómicas 4p16.3-p16.1, 12q24.22-q24.33, 15q21.1-q24.1, 15q26.1-q26.2, 22q13.1-q13.2 y las ganancias en 7p22.1-p21.2, 10q11.22, 13q31.3-q32.1 y 20p12.1-p11.21.

- Los pacientes con adenocarcinoma gástrico con ganglios linfáticos metastáticos y la presencia de anormalidades cromosómicas en las regiones 7p22.1-p21.3 y 15q22.31-q23, son aquellos que presentan una probabilidad más elevada de recidivar de forma precoz tras cirugía curativa. Estos hallazgos sugieren la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas, encaminadas a establecer un tratamiento más efectivo, en este subgrupo de pacientes.

- La presencia de anomalías numéricas de la región cromosómica 6p12.3-p11.2 constituye un factor pronóstico adverso independiente en los adenocarcinomas gástricos. La combinación de esta variable con el tipo histológico de Lauren y la profundidad de la invasión de la pared, permite predecir desde el momento del diagnóstico, grupos de pacientes con diferente supervivencia global.

En relación con la expresión de HER2, p53, p21 y EGFR entre el tumor primario y su correspondiente metástasis ganglionar.

- El marcador molecular que mostró una asociación significativa con las características clínico-patológicas en esta serie ha sido la sobreexpresión proteica del receptor HER2 o su amplificación determinada por FISH, que se relaciona con bajo grado histológico, estadios tempranos y además permite identificar a un subgrupo de pacientes con mejor supervivencia global.

- Nuestros resultados demuestran la existencia de heterogeneidad intratumoral en el 4.2% de los casos de adenocarcinoma gástrico. Por lo tanto se recomienda siempre que sea posible evaluar el estado de HER2 en secciones procedentes de las piezas quirúrgicas. Al tratarse de tumores en estadio avanzado o irsecables el material disponible generalmente será una biopsia endoscópica. Cuando los resultados de HER2 es negativo debe considerarse evaluar el estado de HER2 de los sitios metastáticos.

- Nuestros resultados muestran una estrecha relación de la expresión proteica entre el adenocarcinoma gástrico primario y su correspondiente metástasis ganglionar, lo que sugiere que las alteraciones moleculares existentes en el tumor primario se mantienen en la mayoría de los casos sin cambios durante el proceso metastático. Estos hallazgos indican que la capacidad metastásica se adquiere precozmente durante la carcinogénesis y se mantiene durante la progresión tumoral.

En relación con la heterogeneidad genética y las vías de evolución clonal en los adenocarcinomas gástricos:

- Los adenocarcinomas gástricos son tumores genéticamente heterogéneos que presentan diferentes patrones de alteraciones cromosómicas, coexistiendo dos o más clones tumorales en la mayoría de los casos. Las vías de evolución clonal asociadas a inestabilidad cromosómica son variables, siendo las ganancias del cromosoma 20q, 13q, el evento temprano más frecuente, a la vez que la tetraploidización constituiría la anomalía tardía más habitual.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay, J., *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* **127**, 2893-2917 (2010).
2. Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* **94**, 153-156 (2001).
3. Forman, D. & Burley, V.J. Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **20**, 633-649 (2006).
4. Ferlay, J., *et al.* GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base N 10.[consultado 30 junio 2013]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>. (Lyon, France).
5. Cabanes, A., Perez-Gomez, B., Aragonés, N., Pollán, M. & Lopez-Abente, G. La situación del cáncer en España 2009. Área de epidemiología ambiental y cáncer, Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Carlos III. [consultado 30 junio 2013]. Disponible en: <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/epidemiologia-ambiental-y-cancer.shtml>.
6. Área de epidemiología ambiental y cáncer. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Mortalidad por cáncer y otras causas en España 2009. [consultado 30 junio 2013]. Disponible en: <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/vigilancias-alertas.shtml>
7. Botterweck, A.A., Schouten, L.J., Volovics, A., Dorant, E. & van Den Brandt, P.A. Trends in incidence of adenocarcinoma of the oesophagus and gastric cardia in ten European countries. *Int J Epidemiol* **29**, 645-654 (2000).
8. Devesa, S.S., Blot, W.J. & Fraumeni, J.F., Jr. Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* **83**, 2049-2053 (1998).
9. Parkin, D.M. International variation. *Oncogene* **23**, 6329-6340 (2004).
10. Jemal, A., Thomas, A., Murray, T. & Thun, M. Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **52**, 23-47 (2002).
11. Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **55**, 74-108 (2005).
12. Green, D., Ponce de Leon, S., Leon-Rodriguez, E. & Sosa-Sanchez, R. Adenocarcinoma of the stomach: univariate and multivariate analysis of factors associated with survival. *Am J Clin Oncol* **25**, 84-89 (2002).
13. Msika, S., Benhamiche, A.M., Jouve, J.L., Rat, P. & Faivre, J. Prognostic factors after curative resection for gastric cancer. A population-based study. *Eur J Cancer* **36**, 390-396 (2000).
14. Verdecchia, A., *et al.* Explaining gastric cancer survival differences among European countries. *Int J Cancer* **109**, 737-741 (2004).
15. Faivre, J., Forman, D., Esteve, J. & Gatta, G. Survival of patients with oesophageal and gastric cancers in Europe. *Eur J Cancer* **34**, 2167-2175 (1998).
16. Berrino, F. Survival of cancer patients in Finland, 1955-1994. *Acta Oncol* **38**, 275-277 (1999).
17. Verdecchia, A., *et al.* Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EUROCORE-4 data. *Lancet Oncol* **8**, 784-796 (2007).
18. Sant, M., *et al.* EUROCORE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer* **45**, 931-991 (2009).
19. Catalano, V., *et al.* Gastric cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **54**, 209-241 (2005).

20. Fock, K.M., *et al.* Asia-Pacific consensus guidelines on gastric cancer prevention. *J Gastroenterol Hepatol* **23**, 351-365 (2008).
21. Marmot, M.A., T Byers, T Chen, J Hirohata. Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. (UCL (University College London), American Institute for Cancer Research, London, 2007).
22. Gonzalez, C.A., *et al.* Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer* **107**, 629-634 (2003).
23. Marshall, B.J. & Warren, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**, 1311-1315 (1984).
24. Bodger, K. & Crabtree, J.E. Helicobacter pylori and gastric inflammation. *Br Med Bull* **54**, 139-150 (1998).
25. Correa, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* **52**, 6735-6740 (1992).
26. Forman, D. Helicobacter pylori infection and cancer. *Br Med Bull* **54**, 71-78 (1998).
27. Farthing, M.J. Helicobacter pylori infection: an overview. *Br Med Bull* **54**, 1-6 (1998).
28. Asghar, R.J. & Parsonnet, J. Helicobacter pylori and risk for gastric adenocarcinoma. *Semin Gastrointest Dis* **12**, 203-208 (2001).
29. Tokunaga, M., *et al.* Epstein-Barr virus in gastric carcinoma. *Am J Pathol* **143**, 1250-1254 (1993).
30. Fukayama, M., *et al.* Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and Epstein-Barr virus infection of the stomach. *Lab Invest* **71**, 73-81 (1994).
31. Shibata, D. & Weiss, L.M. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* **140**, 769-774 (1992).
32. Kato, I., *et al.* Atrophic gastritis and stomach cancer risk: cross-sectional analyses. *Jpn J Cancer Res* **83**, 1041-1046 (1992).
33. Correa, P. & Chen, V.W. Gastric cancer. *Cancer Surv* **19-20**, 55-76 (1994).
34. Hsing, A.W., *et al.* Pernicious anemia and subsequent cancer. A population-based cohort study. *Cancer* **71**, 745-750 (1993).
35. Werner, M., Becker, K.F., Keller, G. & Hofler, H. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. *J Cancer Res Clin Oncol* **127**, 207-216 (2001).
36. Hsu, C.T., *et al.* Early gastric cancer arising from localized Menetrier's disease. *Gastroenterol Jpn* **26**, 213-217 (1991).
37. Stolte, M. Clinical consequences of the endoscopic diagnosis of gastric polyps. *Endoscopy* **27**, 32-37; discussion 59-60 (1995).
38. Parsonnet, J., *et al.* Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* **325**, 1127-1131 (1991).
39. Clark, G.W., *et al.* Is Barrett's metaplasia the source of adenocarcinomas of the cardia? *Arch Surg* **129**, 609-614 (1994).
40. Lauren, P. The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* **64**, 31-49 (1965).
41. Bosman, F.T., Carneiro, F., Hruban, R.H. & Theise, N.D. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Fourth Edition. *ARC Press, Lyon* **3**(2010).
42. Edge, S.B., Byrd, D.R., Compton, C.C., Fritz, A.G., Greene, F.L., Trotti, A. *AJCC Cancer Staging manual 7th edition.*, (Springer 2010, New York, 2010).

43. Siewert, J.R., Bottcher, K., Stein, H.J. & Roder, J.D. Relevant prognostic factors in gastric cancer: ten-year results of the German Gastric Cancer Study. *Ann Surg* **228**, 449-461 (1998).
44. Kikuchi, S., *et al.* Surgical outcome of node-positive early gastric cancer with particular reference to nodal status. *Anticancer Res* **20**, 3695-3700 (2000).
45. Medina-Franco, H., Heslin, M.J. & Cortes-Gonzalez, R. Clinicopathological characteristics of gastric carcinoma in young and elderly patients: a comparative study. *Ann Surg Oncol* **7**, 515-519 (2000).
46. Yokota, T., *et al.* Significant prognostic factors in patients with early gastric cancer. *Int Surg* **85**, 286-290 (2000).
47. Kim, T.H., Han, S.U., Cho, Y.K. & Kim, M.W. Perigastric lymph node status can be a simple prognostic parameter in patients with gastric cancer. *Hepatogastroenterology* **47**, 1475-1478 (2000).
48. Adachi, Y., Mori, M., Maehara, Y. & Sugimachi, K. Dukes's classification: a valid prognostic indicator for gastric cancer. *Gut* **35**, 1368-1371 (1994).
49. Nakamura, K., *et al.* Pathology and prognosis of gastric carcinoma. Findings in 10,000 patients who underwent primary gastrectomy. *Cancer* **70**, 1030-1037 (1992).
50. Yu, C.C., *et al.* Pathological prognostic factors in the second British Stomach Cancer Group trial of adjuvant therapy in resectable gastric cancer. *Br J Cancer* **71**, 1106-1110 (1995).
51. Roder, J.D., *et al.* Classification of regional lymph node metastasis from gastric carcinoma. German Gastric Cancer Study Group. *Cancer* **82**, 621-631 (1998).
52. Adachi, Y., *et al.* Most important lymph node information in gastric cancer: multivariate prognostic study. *Ann Surg Oncol* **7**, 503-507 (2000).
53. Takahashi, I., *et al.* Clinicopathological features of long-term survivors of scirrhous gastric cancer. *Hepatogastroenterology* **47**, 1485-1488 (2000).
54. Borch, K., *et al.* Changing pattern of histological type, location, stage and outcome of surgical treatment of gastric carcinoma. *Br J Surg* **87**, 618-626 (2000).
55. Yokota, T., *et al.* Significant prognostic factors in patients with node-negative gastric cancer. *Int Surg* **84**, 331-336 (1999).
56. Pinto-De-Sousa, J., David, L., Seixas, M. & Pimenta, A. Clinicopathologic profiles and prognosis of gastric carcinomas from the cardia, fundus/body and antrum. *Dig Surg* **18**, 102-110 (2001).
57. Becker, K.F., Keller, G. & Hoefler, H. The use of molecular biology in diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Surg Oncol* **9**, 5-11 (2000).
58. Scartozzi, M., *et al.* Molecular biology of sporadic gastric cancer: prognostic indicators and novel therapeutic approaches. *Cancer Treat Rev* **30**, 451-459 (2004).
59. Zhang, X.L., *et al.* Comparative study on overexpression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer. *World J Surg* **33**, 2112-2118 (2009).
60. Allgayer, H., *et al.* c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. *J Clin Oncol* **18**, 2201-2209 (2000).
61. Yonemura, Y., *et al.* Evaluation of immunoreactivity for erbB-2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. *Cancer Res* **51**, 1034-1038 (1991).
62. Galizia, G., *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression is associated with a worse prognosis in gastric cancer patients undergoing curative surgery. *World J Surg* **31**, 1458-1468 (2007).
63. Uchino, S., *et al.* Overexpression of c-erbB-2 protein in gastric cancer. Its correlation with long-term survival of patients. *Cancer* **72**, 3179-3184 (1993).

64. Rugge, M., *et al.* The p53 gene in patients under the age of 40 with gastric cancer: mutation rates are low but are associated with a cardiac location. *Mol Pathol* **53**, 207-210 (2000).
65. Shiao, Y.H., *et al.* Genetic and immunohistochemical analyses of p53 independently predict regional metastasis of gastric cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**, 631-633 (2000).
66. Macdonald, J.S., *et al.* Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med* **345**, 725-730 (2001).
67. Bonenkamp, J.J., *et al.* Extended lymph-node dissection for gastric cancer. *N Engl J Med* **340**, 908-914 (1999).
68. Glimelius, B., Hoffman, K., Haglund, U., Nyren, O. & Sjoden, P.O. Initial or delayed chemotherapy with best supportive care in advanced gastric cancer. *Ann Oncol* **5**, 189-190 (1994).
69. Pyrhonen, S., Kuitunen, T., Nyandoto, P. & Kouri, M. Randomised comparison of fluorouracil, epidoxorubicin and methotrexate (FEMTX) plus supportive care with supportive care alone in patients with non-resectable gastric cancer. *Br J Cancer* **71**, 587-591 (1995).
70. Gouzi, J.L., *et al.* [Total gastrectomy versus partial gastrectomy of adenocarcinoma of the antrum. A French prospective controlled study]. *Ann Chir* **43**, 356-360 (1989).
71. Bozzetti, F., *et al.* Subtotal versus total gastrectomy for gastric cancer: five-year survival rates in a multicenter randomized Italian trial. Italian Gastrointestinal Tumor Study Group. *Ann Surg* **230**, 170-178 (1999).
72. Association., J.G.C. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer* **14**, 101-112 (2011).
73. Sano, T., *et al.* Gastric cancer surgery: morbidity and mortality results from a prospective randomized controlled trial comparing D2 and extended para-aortic lymphadenectomy--Japan Clinical Oncology Group study 9501. *J Clin Oncol* **22**, 2767-2773 (2004).
74. Sasako, M., *et al.* D2 lymphadenectomy alone or with para-aortic nodal dissection for gastric cancer. *N Engl J Med* **359**, 453-462 (2008).
75. Dicken, B.J., *et al.* Gastric adenocarcinoma: review and considerations for future directions. *Ann Surg* **241**, 27-39 (2005).
76. MacDonald, J.S., *et al.* 5-Fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin (FAM) combination chemotherapy for advanced gastric cancer. *Ann Intern Med* **93**, 533-536 (1980).
77. Hermans, J., *et al.* Adjuvant therapy after curative resection for gastric cancer: meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol* **11**, 1441-1447 (1993).
78. Earle, C.C. & Maroun, J.A. Adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer in non-Asian patients: revisiting a meta-analysis of randomised trials. *Eur J Cancer* **35**, 1059-1064 (1999).
79. Mari, E., *et al.* Efficacy of adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer: a meta-analysis of published randomised trials. A study of the GISCAD (Gruppo Italiano per lo Studio dei Carcinomi dell'Apparato Digerente). *Ann Oncol* **11**, 837-843 (2000).
80. Panzini, I., *et al.* Adjuvant chemotherapy in gastric cancer: a meta-analysis of randomized trials and a comparison with previous meta-analyses. *Tumori* **88**, 21-27 (2002).
81. Hu, J.K., *et al.* Intravenous chemotherapy for resected gastric cancer: meta-analysis of randomized controlled trials. *World J Gastroenterol* **8**, 1023-1028 (2002).

82. Janunger, K.G., Hafstrom, L. & Glimelius, B. Chemotherapy in gastric cancer: a review and updated meta-analysis. *Eur J Surg* **168**, 597-608 (2002).
83. Sakuramoto, S., *et al.* Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine. *N Engl J Med* **357**, 1810-1820 (2007).
84. Kim, S., *et al.* An observational study suggesting clinical benefit for adjuvant postoperative chemoradiation in a population of over 500 cases after gastric resection with D2 nodal dissection for adenocarcinoma of the stomach. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **63**, 1279-1285 (2005).
85. Leichman, L., *et al.* Preoperative systemic chemotherapy followed by adjuvant postoperative intraperitoneal therapy for gastric cancer: a University of Southern California pilot program. *J Clin Oncol* **10**, 1933-1942 (1992).
86. Ajani, J.A., *et al.* Preoperative and postoperative combination chemotherapy for potentially resectable gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **85**, 1839-1844 (1993).
87. Cunningham, D., *et al.* Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* **355**, 11-20 (2006).
88. Ychou, M., *et al.* Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial. *J Clin Oncol* **29**, 1715-1721 (2011).
89. Ajani, J.A., *et al.* Gastric cancer. *J Natl Compr Canc Netw* **8**, 378-409 (2010).
90. Okines, A., Verheij, M., Allum, W., Cunningham, D. & Cervantes, A. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **21 Suppl 5**, v50-54 (2010).
91. Van Cutsem, E., *et al.* Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group. *J Clin Oncol* **24**, 4991-4997 (2006).
92. Dank, M., *et al.* Randomized phase III study comparing irinotecan combined with 5-fluorouracil and folinic acid to cisplatin combined with 5-fluorouracil in chemotherapy naive patients with advanced adenocarcinoma of the stomach or esophagogastric junction. *Ann Oncol* **19**, 1450-1457 (2008).
93. Kang, Y.K., *et al.* Capecitabine/cisplatin versus 5-fluorouracil/cisplatin as first-line therapy in patients with advanced gastric cancer: a randomised phase III noninferiority trial. *Ann Oncol* **20**, 666-673 (2009).
94. Cunningham, D., *et al.* Capecitabine and oxaliplatin for advanced esophagogastric cancer. *N Engl J Med* **358**, 36-46 (2008).
95. Boku, N., *et al.* Fluorouracil versus combination of irinotecan plus cisplatin versus S-1 in metastatic gastric cancer: a randomised phase 3 study. *Lancet Oncol* **10**, 1063-1069 (2009).
96. Koizumi, W., *et al.* S-1 plus cisplatin versus S-1 alone for first-line treatment of advanced gastric cancer (SPIRITS trial): a phase III trial. *Lancet Oncol* **9**, 215-221 (2008).
97. Bang, Y.J., *et al.* Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* **376**, 687-697 (2010).
98. Nowell, P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, 23-28 (1976).
99. Nowell, P.C. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res* **46**, 2203-2207 (1986).
100. Ferti-Passantonopoulou, A.D., Panani, A.D., Vlachos, J.D. & Raptis, S.A. Common cytogenetic findings in gastric cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **24**, 63-73 (1987).

101. Panani, A.D., Ferti, A., Malliaros, S. & Raptis, S. Cytogenetic study of 11 gastric adenocarcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* **81**, 169-172 (1995).
102. Ochi, H., Douglass, H.O., Jr. & Sandberg, A.A. Cytogenetic studies in primary gastric cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **22**, 295-307 (1986).
103. Xiao, S., *et al.* Cytogenetic studies of eight primary gastric cancers. *Cancer Genet Cytogenet* **58**, 79-84 (1992).
104. Panani, A.D., Ferti, A., Malliaros, S. & Raptis, S. Gastric cancer with an i(8q) and long survival. *Cancer Genet Cytogenet* **58**, 214-215 (1992).
105. Espinoza, L.A., Barbieri Neto, J. & Casartelli, C. Pathological and karyotypic abnormalities in advanced gastric carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* **109**, 45-50 (1999).
106. Rodriguez, E., *et al.* 11p13-15 is a specific region of chromosomal rearrangement in gastric and esophageal adenocarcinomas. *Cancer Res* **50**, 6410-6416 (1990).
107. Ochi, H., Takeuchi, J., Douglass, H.O., Jr. & Sandberg, A.A. Trisomy X as a possible initial chromosome change in a gastric cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **12**, 57-61 (1984).
108. Seruca, R., *et al.* Cytogenetic findings in eleven gastric carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* **68**, 42-48 (1993).
109. Panani, A.D. & Roussos, C. Non-random structural chromosomal changes in primary gastric cancer. *Cancer Lett* **225**, 291-295 (2005).
110. van Dekken, H., Pizzolo, J.G., Kelsen, D.P. & Melamed, M.R. Targeted cytogenetic analysis of gastric tumors by in situ hybridization with a set of chromosome-specific DNA probes. *Cancer* **66**, 491-497 (1990).
111. Han, K., *et al.* Chromosomal numerical aberrations in gastric carcinoma: analysis of eighteen cases using in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* **92**, 122-129 (1996).
112. Beuzen, F., Dubois, S. & Flejou, J.F. Chromosomal numerical aberrations are frequent in oesophageal and gastric adenocarcinomas: a study using in-situ hybridization. *Histopathology* **37**, 241-249 (2000).
113. Takahashi, Y., *et al.* Analysis of MYC and chromosome 8 copy number changes in gastrointestinal cancers by dual-color fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* **107**, 61-64 (1998).
114. Onchi, H., Hirose, K., Yamaguchi, A., Noriki, S. & Fukuda, M. Prognostic value of numerical aberrations of chromosome 17 in differentiated gastric cancer: evaluation by multivariate regression analysis. *Oncol Rep* **7**, 1317-1322 (2000).
115. Terada, R., *et al.* Higher frequencies of numerical aberrations of chromosome 17 in primary gastric cancers are associated with lymph node metastasis. *J Gastroenterol* **34**, 11-17 (1999).
116. Assumpcao, P.P., *et al.* Numerical aberrations of chromosome 8 detected by conventional cytogenetics and fluorescence in situ hybridization in individuals from northern Brazil with gastric adenocarcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* **169**, 45-49 (2006).
117. Panani, A.D., Ferti, A.D., Avgerinos, A. & Raptis, S.A. Numerical aberrations of chromosome 8 in gastric cancer detected by fluorescence in situ hybridization. *Anticancer Res* **24**, 155-159 (2004).
118. Kitayama, Y., *et al.* Nonrandom chromosomal numerical abnormality predicting prognosis of gastric cancer: a retrospective study of 51 cases using pathology archives. *Lab Invest* **83**, 1311-1320 (2003).
119. Fringes, B., Mayhew, T.M., Reith, A., Gates, J. & Ward, D.C. Numerical aberrations of chromosomes 1 and 17 correlate with tumor site in human gastric carcinoma of the

- diffuse and intestinal types. Fluorescence in situ hybridization analysis on gastric biopsies. *Lab Invest* **80**, 1501-1508 (2000).
120. Koo, S.H., *et al.* Genetic alterations of gastric cancer: comparative genomic hybridization and fluorescence In situ hybridization studies. *Cancer Genet Cytogenet* **117**, 97-103 (2000).
 121. Wu, M.S., *et al.* Correlation of histologic subtypes and replication error phenotype with comparative genomic hybridization in gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **30**, 80-86 (2001).
 122. Kokkola, A., *et al.* 17q12-21 amplicon, a novel recurrent genetic change in intestinal type of gastric carcinoma: a comparative genomic hybridization study. *Genes Chromosomes Cancer* **20**, 38-43 (1997).
 123. Stocks, S.C., *et al.* Chromosomal imbalances in gastric and esophageal adenocarcinoma: specific comparative genomic hybridization-detected abnormalities segregate with junctional adenocarcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* **32**, 50-58 (2001).
 124. Sakakura, C., *et al.* Gains, losses, and amplifications of genomic materials in primary gastric cancers analyzed by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **24**, 299-305 (1999).
 125. Nakanishi, M., *et al.* Genomic alterations in primary gastric cancers analyzed by comparative genomic hybridization and clinicopathological factors. *Hepatogastroenterology* **47**, 658-662 (2000).
 126. Guan, X.Y., *et al.* Recurrent chromosome changes in 62 primary gastric carcinomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* **123**, 27-34 (2000).
 127. Koizumi, Y., *et al.* Changes in DNA copy number in primary gastric carcinomas by comparative genomic hybridization. *Clin Cancer Res* **3**, 1067-1076 (1997).
 128. Kimura, Y., *et al.* Genetic alterations in 102 primary gastric cancers by comparative genomic hybridization: gain of 20q and loss of 18q are associated with tumor progression. *Mod Pathol* **17**, 1328-1337 (2004).
 129. van Grieken, N.C., *et al.* Helicobacter pylori-related and -non-related gastric cancers do not differ with respect to chromosomal aberrations. *J Pathol* **192**, 301-306 (2000).
 130. Carvalho, B., *et al.* Mixed gastric carcinomas show similar chromosomal aberrations in both their diffuse and glandular components. *Cell Oncol* **28**, 283-294 (2006).
 131. Peng, D.F., Sugihara, H., Mukaisho, K., Tsubosa, Y. & Hattori, T. Alterations of chromosomal copy number during progression of diffuse-type gastric carcinomas: metaphase- and array-based comparative genomic hybridization analyses of multiple samples from individual tumours. *J Pathol* **201**, 439-450 (2003).
 132. Kang, J.U., *et al.* Genetic alterations in primary gastric carcinomas correlated with clinicopathological variables by array comparative genomic hybridization. *J Korean Med Sci* **21**, 656-665 (2006).
 133. Morohara, K., *et al.* Analysis by comparative genomic hybridization of gastric cancer with peritoneal dissemination and/or positive peritoneal cytology. *Cancer Genet Cytogenet* **161**, 57-62 (2005).
 134. Weiss, M.M., *et al.* Genomic profiling of gastric cancer predicts lymph node status and survival. *Oncogene* **22**, 1872-1879 (2003).
 135. Weiss, M.M., *et al.* Genomic alterations in primary gastric adenocarcinomas correlate with clinicopathological characteristics and survival. *Cell Oncol* **26**, 307-317 (2004).
 136. Chun, Y.H., *et al.* Characterization of chromosomal aberrations in human gastric carcinoma cell lines using chromosome painting. *Cancer Genet Cytogenet* **119**, 18-25 (2000).

137. Stamouli, M.I., *et al.* Application of multiplex fluorescence in situ hybridization in the cytogenetic analysis of primary gastric carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* **135**, 23-27 (2002).
138. Yamashita, Y., *et al.* Recurrent chromosomal rearrangements at bands 8q24 and 11q13 in gastric cancer as detected by multicolor spectral karyotyping. *World J Gastroenterol* **11**, 5129-5135 (2005).
139. Noguchi, T., Wirtz, H.C., Michaelis, S., Gabbert, H.E. & Mueller, W. Chromosomal imbalances in gastric cancer. Correlation with histologic subtypes and tumor progression. *Am J Clin Pathol* **115**, 828-834 (2001).
140. Tsukamoto, Y., *et al.* Genome-wide analysis of DNA copy number alterations and gene expression in gastric cancer. *J Pathol* **216**, 471-482 (2008).
141. Hong, S.J., *et al.* Preoperative genetic diagnosis of gastric carcinoma based on chromosomal loss and microsatellite instability. *Int J Cancer* **113**, 249-258 (2005).
142. Sano, T., *et al.* Frequent loss of heterozygosity on chromosomes 1q, 5q, and 17p in human gastric carcinomas. *Cancer Res* **51**, 2926-2931 (1991).
143. Yustein, A.S., *et al.* Allelotype of gastric adenocarcinoma. *Cancer Res* **59**, 1437-1441 (1999).
144. Choi, S.W., *et al.* Fractional allelic loss in gastric carcinoma correlates with growth patterns. *Oncogene* **17**, 2655-2659 (1998).
145. van Dekken, H., *et al.* Molecular cytogenetic evaluation of gastric cardia adenocarcinoma and precursor lesions. *Am J Pathol* **158**, 1961-1967 (2001).
146. Hong, S.J., *et al.* The gene-reduction effect of chromosomal losses detected in gastric cancers. *BMC Gastroenterol* **10**, 138 (2010).
147. Khayat, A.S., *et al.* Interrelationship between TP53 gene deletion, protein expression and chromosome 17 aneusomy in gastric adenocarcinoma. *BMC Gastroenterol* **9**, 55 (2009).
148. Kobayashi, M., Kawashima, A., Mai, M. & Ooi, A. Analysis of chromosome 17p13 (p53 locus) alterations in gastric carcinoma cells by dual-color fluorescence in situ hybridization. *Am J Pathol* **149**, 1575-1584 (1996).
149. Takahashi, Y., *et al.* Detection of aberrations of 17p and p53 gene in gastrointestinal cancers by dual (two-color) fluorescence in situ hybridization and GeneChip p53 assay. *Cancer Genet Cytogenet* **121**, 38-43 (2000).
150. Gomyo, Y., Osaki, M., Kaibara, N. & Ito, H. Numerical aberration and point mutation of p53 gene in human gastric intestinal metaplasia and well-differentiated adenocarcinoma: analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) and PCR-SSCP. *Int J Cancer* **66**, 594-599 (1996).
151. Suzuki, S., Tenjin, T., Shibuya, T. & Tanaka, S. Chromosome 17 copy numbers and incidence of p 53 gene deletion in gastric cancer cells. Dual color fluorescence in situ hybridization analysis. *Nippon Ika Daigaku Zasshi* **64**, 22-29 (1997).
152. Schneider, B.G., *et al.* Allelic imbalance in gastric cancer: an affected site on chromosome arm 3p. *Genes Chromosomes Cancer* **13**, 263-271 (1995).
153. Motomura, K., *et al.* Loss of alleles at loci on chromosome 13 in human primary gastric cancers. *Genomics* **2**, 180-184 (1988).
154. Carvalho, B., Seruca, R., Carneiro, F., Buys, C.H. & Kok, K. Substantial reduction of the gastric carcinoma critical region at 6q16.3-q23.1. *Genes Chromosomes Cancer* **26**, 29-34 (1999).
155. Queimado, L., Seruca, R., Costa-Pereira, A. & Castedo, S. Identification of two distinct regions of deletion at 6q in gastric carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* **14**, 28-34 (1995).

156. Li, B.C., *et al.* Allelic loss of chromosome 6q in gastric carcinoma. *Diagn Mol Pathol* **12**, 193-200 (2003).
157. Buffart, T.E., *et al.* DNA copy number profiles of gastric cancer precursor lesions. *BMC Genomics* **8**, 345 (2007).
158. Xia, J.C., *et al.* Direct chromosome analysis of ten primary gastric cancers. *Cancer Genet Cytogenet* **102**, 88-90 (1998).
159. Castedo, S., Correia, C., David, L. & Sobrinho-Simoes, M. Isochromosome 8q. A recurrent change in gastric carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* **54**, 137-138 (1991).
160. Tahara, E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Sci Publ*, 327-349 (2004).
161. Uchino, S., *et al.* p53 mutation in gastric cancer: a genetic model for carcinogenesis is common to gastric and colorectal cancer. *Int J Cancer* **54**, 759-764 (1993).
162. Liu, X.P., *et al.* Expression of p53 protein as a prognostic indicator of reduced survival time in diffuse-type gastric carcinoma. *Pathol Int* **51**, 440-444 (2001).
163. Fang, D.C., *et al.* Mutation analysis of APC gene in gastric cancer with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* **8**, 787-791 (2002).
164. Tamura, G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* **12**, 192-198 (2006).
165. Bria, E., *et al.* A clinical-biological risk stratification model for resected gastric cancer: prognostic impact of Her2, Fhit, and APC expression status. *Ann Oncol* (2012).
166. Hsu, P.I., *et al.* Loss of RUNX3 expression correlates with differentiation, nodal metastasis, and poor prognosis of gastric cancer. *Ann Surg Oncol* **16**, 1686-1694 (2009).
167. Ogasawara, N., *et al.* RUNX3 expression correlates with chief cell differentiation in human gastric cancers. *Histol Histopathol* **24**, 31-40 (2009).
168. Wei, D., *et al.* Loss of RUNX3 expression significantly affects the clinical outcome of gastric cancer patients and its restoration causes drastic suppression of tumor growth and metastasis. *Cancer Res* **65**, 4809-4816 (2005).
169. Bamias, A.T., *et al.* Prognostic significance of the deleted in colorectal cancer gene protein expression in high-risk resected gastric carcinoma. *Cancer Invest* **21**, 333-340 (2003).
170. Candusso, M.E., *et al.* Loss of heterozygosity at 18q21 region in gastric cancer involves a number of cancer-related genes and correlates with stage and histology, but lacks independent prognostic value. *J Pathol* **197**, 44-50 (2002).
171. Liu, Z.M., *et al.* Mutation detection of KRAS by high-resolution melting analysis in Chinese with gastric cancer. *Oncol Rep* **22**, 515-520 (2009).
172. Sotoudeh, K., *et al.* The clinicopathologic association of c-MET overexpression in Iranian gastric carcinomas; an immunohistochemical study of tissue microarrays. *Diagn Pathol* **7**, 57 (2012).
173. Toyokawa, T., Yashiro, M. & Hirakawa, K. Co-expression of keratinocyte growth factor and K-sam is an independent prognostic factor in gastric carcinoma. *Oncol Rep* **21**, 875-880 (2009).
174. Chan, A.O., *et al.* Soluble E-cadherin is an independent pretherapeutic factor for long-term survival in gastric cancer. *J Clin Oncol* **21**, 2288-2293 (2003).
175. Chan, A.O., *et al.* Soluble E-cadherin is a valid prognostic marker in gastric carcinoma. *Gut* **48**, 808-811 (2001).
176. Xing, X., *et al.* The prognostic value of E-cadherin in gastric cancer: A meta-analysis. *Int J Cancer* (2012).

177. Yamaguchi, A., *et al.* Expression of CD44v6 in advanced gastric cancer and its relationship to hematogenous metastasis and long-term prognosis. *J Surg Oncol* **79**, 230-235 (2002).
178. Lee, K.E., *et al.* Prognostic significance of p53, nm23, PCNA and c-erbB-2 in gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* **33**, 173-179 (2003).
179. Muller, W., Schneiders, A., Hommel, G. & Gabbert, H.E. Expression of nm23 in gastric carcinoma: association with tumor progression and poor prognosis. *Cancer* **83**, 2481-2487 (1998).
180. Nesi, G., *et al.* Expression of nm23 gene in gastric cancer is associated with a poor 5-year survival. *Anticancer Res* **21**, 3643-3649 (2001).
181. Kouraklis, G., *et al.* Does the expression of cyclin E, pRb, and p21 correlate with prognosis in gastric adenocarcinoma? *Dig Dis Sci* **54**, 1015-1020 (2009).
182. Sgambato, A., *et al.* Loss of p27Kip1 expression is a strong independent prognostic factor of reduced survival in N0 gastric carcinomas. *Cancer* **89**, 2247-2257 (2000).
183. Nitti, D., *et al.* Low level of p27(Kip1) protein expression in gastric adenocarcinoma is associated with disease progression and poor outcome. *J Surg Oncol* **81**, 167-175; discussion 175-166 (2002).
184. Lee, H.S., Lee, H.K., Kim, H.S., Yang, H.K. & Kim, W.H. Tumour suppressor gene expression correlates with gastric cancer prognosis. *J Pathol* **200**, 39-46 (2003).
185. Zhao, P., Liu, W. & Lu, Y.L. Clinicopathological significance of FHIT protein expression in gastric adenocarcinoma patients. *World J Gastroenterol* **11**, 5735-5738 (2005).
186. Tang, H., *et al.* Positive correlation of osteopontin, cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in gastric cancer. *Cancer Invest* **26**, 60-67 (2008).
187. Shi, H., Xu, J.M., Hu, N.Z. & Xie, H.J. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* **9**, 1421-1426 (2003).
188. Han, S.L., Tang, H.J., Hua, Y.W., Ji, S.Q. & Lin, D.X. Expression of COX-2 in stomach cancers and its relation to their biological features. *Dig Surg* **20**, 107-114 (2003).
189. Duff, S.E., *et al.* Vascular endothelial growth factors C and D and lymphangiogenesis in gastrointestinal tract malignancy. *Br J Cancer* **89**, 426-430 (2003).
190. Vidal, O., *et al.* High preoperative serum vascular endothelial growth factor levels predict poor clinical outcome after curative resection of gastric cancer. *Br J Surg* **96**, 1443-1451 (2009).
191. Seo, Y.H., *et al.* Prognostic significance of p21 and p53 expression in gastric cancer. *Korean J Intern Med* **18**, 98-103 (2003).
192. Okuyama, T., *et al.* Combined evaluation of expressions of p53 and p21 proteins as prognostic factors for patients with gastric carcinoma. *Oncology* **63**, 353-361 (2002).
193. Bessette, D.C., Qiu, D. & Pallen, C.J. PRL PTPs: mediators and markers of cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* **27**, 231-252 (2008).
194. Dai, N., Lu, A.P., Shou, C.C. & Li, J.Y. Expression of phosphatase regenerating liver 3 is an independent prognostic indicator for gastric cancer. *World J Gastroenterol* **15**, 1499-1505 (2009).
195. Wang, Z., *et al.* High expression of PRL-3 can promote growth of gastric cancer and exhibits a poor prognostic impact on patients. *Ann Surg Oncol* **16**, 208-219 (2009).
196. Sanz-Ortega, J., *et al.* Comparative study of tumor angiogenesis and immunohistochemistry for p53, c-ErbB2, c-myc and EGFr as prognostic factors in gastric cancer. *Histol Histopathol* **15**, 455-462 (2000).

197. Han, S., *et al.* c-Myc expression is related with cell proliferation and associated with poor clinical outcome in human gastric cancer. *J Korean Med Sci* **14**, 526-530 (1999).
198. Junttila, M.R. & Westermarck, J. Mechanisms of MYC stabilization in human malignancies. *Cell Cycle* **7**, 592-596 (2008).
199. Khanna, A., *et al.* MYC-dependent regulation and prognostic role of CIP2A in gastric cancer. *J Natl Cancer Inst* **101**, 793-805 (2009).
200. Lee, H.K., *et al.* Prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in gastric cancer. *Int J Colorectal Dis* **18**, 518-525 (2003).
201. He, X.S., *et al.* Expression of p16 gene and Rb protein in gastric carcinoma and their clinicopathological significance. *World J Gastroenterol* **11**, 2218-2223 (2005).
202. Mattioli, E., *et al.* Immunohistochemical analysis of pRb2/p130, VEGF, EZH2, p53, p16(INK4A), p27(KIP1), p21(WAF1), Ki-67 expression patterns in gastric cancer. *J Cell Physiol* **210**, 183-191 (2007).
203. Anagnostopoulos, G.K., *et al.* Expression of Bax protein in gastric carcinomas. A clinicopathological and immunohistochemical study. *Acta Gastroenterol Belg* **70**, 285-289 (2007).
204. Li, Y.L., Tian, Z., Wu, D.Y., Fu, B.Y. & Xin, Y. Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of tumor suppressor gene PTEN in gastric cancer and precancerous lesions. *World J Gastroenterol* **11**, 285-288 (2005).
205. Mina, S., *et al.* PTEN deletion is rare but often homogeneous in gastric cancer. *J Clin Pathol* **65**, 693-698 (2012).
206. Correa, P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* **48**, 3554-3560 (1988).
207. Kushima, R., Muller, W., Stolte, M. & Borchard, F. Differential p53 protein expression in stomach adenomas of gastric and intestinal phenotypes: possible sequences of p53 alteration in stomach carcinogenesis. *Virchows Arch* **428**, 223-227 (1996).
208. Wu, L.B., Kushima, R., Borchard, F., Molsberger, G. & Hattori, T. Intramucosal carcinomas of the stomach: phenotypic expression and loss of heterozygosity at microsatellites linked to the APC gene. *Pathol Res Pract* **194**, 405-411 (1998).
209. Endoh, Y., *et al.* Cellular phenotypes of differentiated-type adenocarcinomas and precancerous lesions of the stomach are dependent on the genetic pathways. *J Pathol* **191**, 257-263 (2000).
210. Oda, N., *et al.* DNA ploidy pattern and amplification of ERBB and ERBB2 genes in human gastric carcinomas. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **58**, 273-277 (1990).
211. Lee, K.H., *et al.* Clinicopathologic significance of the K-ras gene codon 12 point mutation in stomach cancer. An analysis of 140 cases. *Cancer* **75**, 2794-2801 (1995).
212. Isogaki, J., *et al.* Microsatellite instability and K-ras mutations in gastric adenomas, with reference to associated gastric cancers. *Cancer Detect Prev* **23**, 204-214 (1999).
213. Tamura, G., *et al.* Detection of frequent p53 gene mutations in primary gastric cancer by cell sorting and polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. *Cancer Res* **51**, 3056-3058 (1991).
214. Yokozaki, H., *et al.* p53 point mutations in primary human gastric carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* **119**, 67-70 (1992).
215. Tohdo, H., Yokozaki, H., Haruma, K., Kajiyama, G. & Tahara, E. p53 gene mutations in gastric adenomas. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **63**, 191-195 (1993).

216. Sakurai, S., Sano, T. & Nakajima, T. Clinicopathological and molecular biological studies of gastric adenomas with special reference to p53 abnormality. *Pathol Int* **45**, 51-57 (1995).
217. Oki, E., *et al.* The difference in p53 mutations between cancers of the upper and lower gastrointestinal tract. *Digestion* **79 Suppl 1**, 33-39 (2009).
218. Monig, S.P., *et al.* p53 expression in gastric cancer: clinicopathological correlation and prognostic significance. *Dig Dis Sci* **42**, 2463-2467 (1997).
219. Saito, H., *et al.* Prediction of sites of recurrence in gastric carcinoma using immunohistochemical parameters. *J Surg Oncol* **95**, 123-128 (2007).
220. Victorzon, M., Nordling, S., Haglund, C., Lundin, J. & Roberts, P.J. Expression of p53 protein as a prognostic factor in patients with gastric cancer. *Eur J Cancer* **32A**, 215-220 (1996).
221. McCulloch, P., *et al.* c-erbB2 and p53 expression are not associated with stage progression of gastric cancer in Britain or Japan. *Eur J Surg Oncol* **23**, 304-309 (1997).
222. Muller, W. & Borchard, F. Prognostic influence of p53 expression in gastric cancer. *J Pathol* **178**, 255-258 (1996).
223. Efeyan, A. & Serrano, M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* **6**, 1006-1010 (2007).
224. Yokozaki, H., *et al.* Alterations of p73 preferentially occur in gastric adenocarcinomas with foveolar epithelial phenotype. *Int J Cancer* **83**, 192-196 (1999).
225. Fujimoto, J., *et al.* DNA hypermethylation at the pS2 promoter region is associated with early stage of stomach carcinogenesis. *Cancer Lett* **149**, 125-134 (2000).
226. Nakatsuru, S., *et al.* Somatic mutations of the APC gene in precancerous lesion of the stomach. *Hum Mol Genet* **2**, 1463-1465 (1993).
227. Nakatsuru, S., *et al.* Somatic mutation of the APC gene in gastric cancer: frequent mutations in very well differentiated adenocarcinoma and signet-ring cell carcinoma. *Hum Mol Genet* **1**, 559-563 (1992).
228. Senda, T., Shimomura, A. & Iizuka-Kogo, A. Adenomatous polyposis coli (Apc) tumor suppressor gene as a multifunctional gene. *Anat Sci Int* **80**, 121-131 (2005).
229. Ragnarsson, G., *et al.* Loss of heterozygosity at chromosome 1p in different solid human tumours: association with survival. *Br J Cancer* **79**, 1468-1474 (1999).
230. Li, Q.L., *et al.* Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* **109**, 113-124 (2002).
231. Kim, T.Y., *et al.* Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma. *Lab Invest* **84**, 479-484 (2004).
232. Ito, Y. & Miyazono, K. RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 43-47 (2003).
233. Sakakura, C., *et al.* Frequent downregulation of the runt domain transcription factors RUNX1, RUNX3 and their cofactor CBFβ in gastric cancer. *Int J Cancer* **113**, 221-228 (2005).
234. Uchino, S., *et al.* Frequent loss of heterozygosity at the DCC locus in gastric cancer. *Cancer Res* **52**, 3099-3102 (1992).
235. Yoshida, Y., Itoh, F., Endo, T., Hinoda, Y. & Imai, K. Decreased DCC mRNA expression in human gastric cancers is clinicopathologically significant. *Int J Cancer* **79**, 634-639 (1998).
236. Fang, D.C., Jass, J.R. & Wang, D.X. Loss of heterozygosity and loss of expression of the DCC gene in gastric cancer. *J Clin Pathol* **51**, 593-596 (1998).
237. Mehlen, P., *et al.* The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* **395**, 801-804 (1998).

238. Wu, M.S., *et al.* Genetic alterations in gastric cancer: relation to histological subtypes, tumor stage, and Helicobacter pylori infection. *Gastroenterology* **112**, 1457-1465 (1997).
239. Hamilton, J.P. & Meltzer, S.J. A review of the genomics of gastric cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* **4**, 416-425 (2006).
240. Nanus, D.M., Kelsen, D.P., Mentle, I.R., Altorki, N. & Albino, A.P. Infrequent point mutations of ras oncogenes in gastric cancers. *Gastroenterology* **98**, 955-960 (1990).
241. Arber, N., *et al.* Activation of c-K-ras mutations in human gastrointestinal tumors. *Gastroenterology* **118**, 1045-1050 (2000).
242. Gschwind, A., Fischer, O.M. & Ullrich, A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**, 361-370 (2004).
243. Lin, J.T., *et al.* Occurrence of microsatellite instability in gastric carcinoma is associated with enhanced expression of erbB-2 oncoprotein. *Cancer Res* **55**, 1428-1430 (1995).
244. Polkowski, W., *et al.* Prognostic value of Lauren classification and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Ann Surg Oncol* **6**, 290-297 (1999).
245. Lemoine, N.R., *et al.* Amplification and overexpression of the EGF receptor and c-erbB-2 proto-oncogenes in human stomach cancer. *Br J Cancer* **64**, 79-83 (1991).
246. Takehana, T., *et al.* Status of c-erbB-2 in gastric adenocarcinoma: a comparative study of immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization and enzyme-linked immuno-sorbent assay. *Int J Cancer* **98**, 833-837 (2002).
247. Sasano, H., Date, F., Imatani, A., Asaki, S. & Nagura, H. Double immunostaining for c-erbB-2 and p53 in human stomach cancer cells. *Hum Pathol* **24**, 584-589 (1993).
248. Tateishi, M., Toda, T., Minamisono, Y. & Nagasaki, S. Clinicopathological significance of c-erbB-2 protein expression in human gastric carcinoma. *J Surg Oncol* **49**, 209-212 (1992).
249. Mizutani, T., Onda, M., Tokunaga, A., Yamanaka, N. & Sugisaki, Y. Relationship of C-erbB-2 protein expression and gene amplification to invasion and metastasis in human gastric cancer. *Cancer* **72**, 2083-2088 (1993).
250. Nakajima, M., *et al.* The prognostic significance of amplification and overexpression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer* **85**, 1894-1902 (1999).
251. Kuniyasu, H., *et al.* Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **189**, 227-232 (1992).
252. Tsugawa, K., *et al.* Amplification of the c-met, c-erbB-2 and epidermal growth factor receptor gene in human gastric cancers: correlation to clinical features. *Oncology* **55**, 475-481 (1998).
253. Huang, T.J., Wang, J.Y., Lin, S.R., Lian, S.T. & Hsieh, J.S. Overexpression of the c-met protooncogene in human gastric carcinoma--correlation to clinical features. *Acta Oncol* **40**, 638-643 (2001).
254. Drebber, U., *et al.* The overexpression of c-met as a prognostic indicator for gastric carcinoma compared to p53 and p21 nuclear accumulation. *Oncol Rep* **19**, 1477-1483 (2008).
255. Hattori, Y., *et al.* K-sam, an amplified gene in stomach cancer, is a member of the heparin-binding growth factor receptor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5983-5987 (1990).
256. Tahara, E. Genetic alterations in human gastrointestinal cancers. The application to molecular diagnosis. *Cancer* **75**, 1410-1417 (1995).
257. Xie, K. & Huang, S. Regulation of cancer metastasis by stress pathways. *Clin Exp Metastasis* **20**, 31-43 (2003).

258. Joo, Y.E., *et al.* Prognostic significance of E-cadherin/catenin complex expression in gastric cancer. *J Korean Med Sci* **15**, 655-666 (2000).
259. Wijnhoven, B.P., Dinjens, W.N. & Pignatelli, M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg* **87**, 992-1005 (2000).
260. Smith, M.E. & Pignatelli, M. The molecular histology of neoplasia: the role of the cadherin/catenin complex. *Histopathology* **31**, 107-111 (1997).
261. Becker, K.F., *et al.* E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* **54**, 3845-3852 (1994).
262. Guilford, P.J., *et al.* E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer. *Hum Mutat* **14**, 249-255 (1999).
263. Shinmura, K., *et al.* Familial gastric cancer: clinicopathological characteristics, RER phenotype and germline p53 and E-cadherin mutations. *Carcinogenesis* **20**, 1127-1131 (1999).
264. Pharoah, P.D., Guilford, P. & Caldas, C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology* **121**, 1348-1353 (2001).
265. Graziano, F., *et al.* Prognostic analysis of E-cadherin gene promoter hypermethylation in patients with surgically resected, node-positive, diffuse gastric cancer. *Clin Cancer Res* **10**, 2784-2789 (2004).
266. Ohno, T., *et al.* Prognostic significance of combined expression of MUC1 and adhesion molecules in advanced gastric cancer. *Eur J Cancer* **42**, 256-263 (2006).
267. Yokozaki, H., *et al.* Expression of CD44 abnormal transcripts in human gastric carcinomas. *Cancer Lett* **83**, 229-234 (1994).
268. Yoshida, K., *et al.* Abnormal retention of intron 9 in CD44 gene transcripts in human gastrointestinal tumors. *Cancer Res* **55**, 4273-4277 (1995).
269. Weber, G.F., Ashkar, S., Glimcher, M.J. & Cantor, H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* **271**, 509-512 (1996).
270. Ue, T., *et al.* Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer. *Int J Cancer* **79**, 127-132 (1998).
271. Nakayama, H., Yasui, W., Yokozaki, H. & Tahara, E. Reduced expression of nm23 is associated with metastasis of human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* **84**, 184-190 (1993).
272. Yasui, W., *et al.* Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. *Gastric Cancer* **4**, 113-121 (2001).
273. Akama, Y., *et al.* Frequent amplification of the cyclin E gene in human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* **86**, 617-621 (1995).
274. Panani, A.D. Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: clinical implications. *Cancer Lett* **266**, 99-115 (2008).
275. Wiksten, J.P., *et al.* The prognostic value of p27 in gastric cancer. *Oncology* **63**, 180-184 (2002).
276. Varis, A., *et al.* DNA copy number profiling in esophageal Barrett adenocarcinoma: comparison with gastric adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* **127**, 53-58 (2001).
277. Okada, K., Sugihara, H., Bamba, M., Bamba, T. & Hattori, T. Sequential numerical changes of chromosomes 7 and 18 in diffuse-type stomach cancer cell lines: combined comparative genomic hybridization, fluorescence in situ hybridization, and ploidy analyses. *Cancer Genet Cytogenet* **118**, 99-107 (2000).
278. Kim, Y.H., Kim, N.G., Lim, J.G., Park, C. & Kim, H. Chromosomal alterations in paired gastric adenomas and carcinomas. *Am J Pathol* **158**, 655-662 (2001).

279. Hidaka, S., *et al.* Frequent gains of 20q and losses of 18q are associated with lymph node metastasis in intestinal-type gastric cancer. *Anticancer Res* **23**, 3353-3357 (2003).
280. Wu, C.W., *et al.* Clinical implications of chromosomal abnormalities in gastric adenocarcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* **35**, 219-231 (2002).
281. Amadori, D., *et al.* Gene amplification and proliferative kinetics in relation to prognosis of patients with gastric carcinoma. *Cancer* **79**, 226-232 (1997).
282. Pinkel, D., *et al.* High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* **20**, 207-211 (1998).
283. Hodgson, G., *et al.* Genome scanning with array CGH delineates regional alterations in mouse islet carcinomas. *Nat Genet* **29**, 459-464 (2001).
284. Fritz, B., *et al.* Microarray-based copy number and expression profiling in dedifferentiated and pleomorphic liposarcoma. *Cancer Res* **62**, 2993-2998 (2002).
285. Pollack, J.R., Van de Rijn, M. & Botstein, D. Challenges in developing a molecular characterization of cancer. *Semin Oncol* **29**, 280-285 (2002).
286. Kallioniemi, A., *et al.* Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258**, 818-821 (1992).
287. Cheung, V.G., *et al.* Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome. *Nature* **409**, 953-958 (2001).
288. Oostlander, A.E., Meijer, G.A. & Ylstra, B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet* **66**, 488-495 (2004).
289. Smeets, D.F. Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clin Biochem* **37**, 439-446 (2004).
290. Woodfine, K., Carter, N.P., Dunham, I. & Fiegler, H. Investigating chromosome organization with genomic microarrays. *Chromosome Res* **13**, 249-257 (2005).
291. Burke, D.T., Carle, G.F. & Olson, M.V. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* **236**, 806-812 (1987).
292. Wada, M., *et al.* Human Xq24-Xq28: approaches to mapping with yeast artificial chromosomes. *Am J Hum Genet* **46**, 95-106 (1990).
293. Bellis, M., *et al.* Construction and characterization of a partial library of yeast artificial chromosomes from human chromosome 21. *DNA Cell Biol* **10**, 301-310 (1991).
294. Green, E.D., Riethman, H.C., Dutchik, J.E. & Olson, M.V. Detection and characterization of chimeric yeast artificial-chromosome clones. *Genomics* **11**, 658-669 (1991).
295. Shizuya, H., *et al.* Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8794-8797 (1992).
296. Sternberg, N. Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 103-107 (1990).
297. Greshock, J., *et al.* 1-Mb resolution array-based comparative genomic hybridization using a BAC clone set optimized for cancer gene analysis. *Genome Res* **14**, 179-187 (2004).
298. D'Angelica, M., *et al.* Patterns of initial recurrence in completely resected gastric adenocarcinoma. *Ann Surg* **240**, 808-816 (2004).
299. Larsen, J., Ottesen, A.M., Lundsteen, C., Leffers, H. & Larsen, J.K. Optimization of DOP-PCR amplification of DNA for high-resolution comparative genomic hybridization analysis. *Cytometry* **44**, 317-325 (2001).

300. Dessau, R.B. & Pipper, C.B. ["R"--project for statistical computing]. *Ugeskr Laeger* **170**, 328-330 (2008).
301. Smith, M., Marioni, J.C., Hardcastle, T.J., Thorne, N.P. snapCGH: Segmentation, Normalization and Processing of aCGH Data Users Guide. *Bioconductor* (2006).
302. van de Wiel, M.A., *et al.* CGHcall: calling aberrations for array CGH tumor profiles. *Bioinformatics* **23**, 892-894 (2007).
303. Gentleman, R.C., *et al.* Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**, R80 (2004).
304. Olshen, A.B., Venkatraman, E.S., Lucito, R. & Wigler, M. Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data. *Biostatistics* **5**, 557-572 (2004).
305. Willenbrock, H. & Fridlyand, J. A comparison study: applying segmentation to array CGH data for downstream analyses. *Bioinformatics* **21**, 4084-4091 (2005).
306. van de Wiel, M.A. & Wieringen, W.N. CGHregions: dimension reduction for array CGH data with minimal information loss. *Cancer Inform* **3**, 55-63 (2007).
307. Van Wieringen, W.N., Van De Wiel, M.A. & Ylstra, B. Weighted clustering of called array CGH data. *Biostatistics* **9**, 484-500 (2008).
308. van de Wiel, M.A., Smeets, S.J., Brakenhoff, R.H. & Ylstra, B. CGHMultiArray: exact P-values for multi-array comparative genomic hybridization data. *Bioinformatics* **21**, 3193-3194 (2005).
309. Mackintosh, C., *et al.* 1q gain and CDT2 overexpression underlie an aggressive and highly proliferative form of Ewing sarcoma. *Oncogene* **31**, 1287-1298 (2012).
310. Subramaniam, M.M., Piqueras, M., Navarro, S. & Noguera, R. Aberrant copy numbers of ALK gene is a frequent genetic alteration in neuroblastomas. *Hum Pathol* **40**, 1638-1642 (2009).
311. Hirsch, F.R., *et al.* Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol* **21**, 3798-3807 (2003).
312. Varella-Garcia, M., *et al.* EGFR fluorescence in situ hybridisation assay: guidelines for application to non-small-cell lung cancer. *J Clin Pathol* **62**, 970-977 (2009).
313. Lopez-Beltran, A., *et al.* Cyclin D3 gene amplification in bladder carcinoma in situ. *Virchows Arch* **457**, 555-561 (2010).
314. Varella-Garcia, M. Stratification of non-small cell lung cancer patients for therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors: the EGFR fluorescence in situ hybridization assay. *Diagn Pathol* **1**, 19 (2006).
315. Cappuzzo, F., *et al.* Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **97**, 643-655 (2005).
316. Hofmann, M., *et al.* Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* **52**, 797-805 (2008).
317. Mayordomo, E., *et al.* A tissue microarray study of osteosarcoma: histopathologic and immunohistochemical validation of xenotransplanted tumors as preclinical models. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **18**, 453-461 (2010).
318. Al-Moundhri, M.S., *et al.* The prognostic significance of p53, p27 kip1, p21 waf1, HER-2/neu, and Ki67 proteins expression in gastric cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study of 121 Arab patients. *J Surg Oncol* **91**, 243-252 (2005).
319. Kamada, K., *et al.* Amplification/overexpression of Aurora-A in human gastric carcinoma: potential role in differentiated type gastric carcinogenesis. *Oncol Rep* **12**, 593-599 (2004).

320. Vauhkonen, H., Vauhkonen, M., Sajantila, A., Sipponen, P. & Knuutila, S. DNA copy number aberrations in intestinal-type gastric cancer revealed by array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* **167**, 150-154 (2006).
321. Dar, A.A., *et al.* Frequent overexpression of Aurora Kinase A in upper gastrointestinal adenocarcinomas correlates with potent antiapoptotic functions. *Cancer* **112**, 1688-1698 (2008).
322. Agnese, V., *et al.* Aurora-A overexpression as an early marker of reflux-related columnar mucosa and Barrett's oesophagus. *Ann Oncol* **18 Suppl 6**, vi110-115 (2007).
323. Tong, T., *et al.* Overexpression of Aurora-A contributes to malignant development of human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **10**, 7304-7310 (2004).
324. Tanaka, E., *et al.* The clinical significance of Aurora-A/STK15/BTAK expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **11**, 1827-1834 (2005).
325. Yamashita, K., *et al.* Chromosomal numerical abnormality profiles of gastrointestinal stromal tumors. *Jpn J Clin Oncol* **36**, 85-92 (2006).
326. Jeng, Y.M., Peng, S.Y., Lin, C.Y. & Hsu, H.C. Overexpression and amplification of Aurora-A in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* **10**, 2065-2071 (2004).
327. Li, D., *et al.* Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **9**, 991-997 (2003).
328. Nishida, N., Nagasaka, T., Kashiwagi, K., Boland, C.R. & Goel, A. High copy amplification of the Aurora-A gene is associated with chromosomal instability phenotype in human colorectal cancers. *Cancer Biol Ther* **6**, 525-533 (2007).
329. Baba, Y., *et al.* Aurora-A expression is independently associated with chromosomal instability in colorectal cancer. *Neoplasia* **11**, 418-425 (2009).
330. Fang, Z., *et al.* Copy-number increase of AURKA in gastric cancers in a Chinese population: a correlation with tumor progression. *Med Oncol* **28**, 1017-1022 (2011).
331. Lam, A.K., Ong, K. & Ho, Y.H. Aurora kinase expression in colorectal adenocarcinoma: correlations with clinicopathological features, p16 expression, and telomerase activity. *Hum Pathol* **39**, 599-604 (2008).
332. Lo Iacono, M., *et al.* Aurora Kinase A expression is associated with lung cancer histological-subtypes and with tumor de-differentiation. *J Transl Med* **9**, 100 (2011).
333. Xu, H.T., *et al.* Expression of serine threonine kinase 15 is associated with poor differentiation in lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *Pathol Int* **56**, 375-380 (2006).
334. Park, S.H., *et al.* NF-Y-dependent cyclin B2 expression in colorectal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* **13**, 858-867 (2007).
335. Yin, J., *et al.* Common genetic variants in cell cycle pathway are associated with survival in stage III-IV non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis* **32**, 1867-1871 (2011).
336. Hofmann, H.S., *et al.* Discrimination of human lung neoplasm from normal lung by two target genes. *Am J Respir Crit Care Med* **170**, 516-519 (2004).
337. Stav, D., Bar, I. & Sandbank, J. Usefulness of CDK5RAP3, CCNB2, and RAGE genes for the diagnosis of lung adenocarcinoma. *Int J Biol Markers* **22**, 108-113 (2007).
338. Mo, M.L., *et al.* Use of serum circulating CCNB2 in cancer surveillance. *Int J Biol Markers* **25**, 236-242 (2010).
339. Rossi, E., *et al.* Epidermal growth factor receptor overexpression/amplification in adenocarcinomas arising in the gastrointestinal tract. *Rev Esp Enferm Dig* **103**, 632-639 (2011).

340. Tahara, M., *et al.* Multicenter Phase II study of cetuximab plus irinotecan in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin and fluoropyrimidines. *Jpn J Clin Oncol* **38**, 762-769 (2008).
341. Noronha, V., *et al.* EGFR Mutations in Indian Lung Cancer Patients: Clinical Correlation and Outcome to EGFR Targeted Therapy. *PLoS One* **8**, e61561 (2013).
342. Ohba, T., *et al.* The mutations of the EGFR and K-ras genes in resected stage I lung adenocarcinoma and their clinical significance. *Surg Today* (2013).
343. Liang, Z., *et al.* Analysis of EGFR, HER2, and TOP2A gene status and chromosomal polysomy in gastric adenocarcinoma from Chinese patients. *BMC Cancer* **8**, 363 (2008).
344. Pollak, M.N., Schernhammer, E.S. & Hankinson, S.E. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* **4**, 505-518 (2004).
345. Foulstone, E., *et al.* Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer. *J Pathol* **205**, 145-153 (2005).
346. Cui, H., *et al.* Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science* **299**, 1753-1755 (2003).
347. Noshio, K., *et al.* Interplay of insulin-like growth factor-II, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-I receptor, COX-2, and matrix metalloproteinase-7, play key roles in the early stage of colorectal carcinogenesis. *Clin Cancer Res* **10**, 7950-7957 (2004).
348. Morales-Fuentes, G.A., *et al.* [p53 expression in the gastric mucosa of patients infected with Helicobacter pylori]. *Rev Gastroenterol Mex* **78**, 12-20 (2013).
349. Schwitalla, S., *et al.* Loss of p53 in enterocytes generates an inflammatory microenvironment enabling invasion and lymph node metastasis of carcinogen-induced colorectal tumors. *Cancer Cell* **23**, 93-106 (2013).
350. Zaika, A., Wei, J., Noto, J. & Peek, R., Jr. Regulation of the p53 by Helicobacter pylori. *Oncotarget* **3**, 1057-1058.
351. Buffart, T.E., *et al.* High resolution analysis of DNA copy-number aberrations of chromosomes 8, 13, and 20 in gastric cancers. *Virchows Arch* **455**, 213-223 (2009).
352. Gorringer, K.L., Boussioutas, A. & Bowtell, D.D. Novel regions of chromosomal amplification at 6p21, 5p13, and 12q14 in gastric cancer identified by array comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **42**, 247-259 (2005).
353. Takada, H., *et al.* Screening of DNA copy-number aberrations in gastric cancer cell lines by array-based comparative genomic hybridization. *Cancer Sci* **96**, 100-110 (2005).
354. Buffart, T.E., *et al.* Gastric cancers in young and elderly patients show different genomic profiles. *J Pathol* **211**, 45-51 (2007).
355. Furuya, T., *et al.* The development of a mini-array for estimating the disease state of gastric adenocarcinoma by array CGH. *BMC Cancer* **8**, 393 (2008).
356. Buffart, T.E., *et al.* Losses of chromosome 5q and 14q are associated with favorable clinical outcome of patients with gastric cancer. *Oncologist* **17**, 653-662 (2012).
357. Fan, B., *et al.* Integration of DNA copy number alterations and transcriptional expression analysis in human gastric cancer. *PLoS One* **7**, e29824 (2012).
358. Weiss, M.M., *et al.* Determination of amplicon boundaries at 20q13.2 in tissue samples of human gastric adenocarcinomas by high-resolution microarray comparative genomic hybridization. *J Pathol* **200**, 320-326 (2003).
359. Tada, M., *et al.* Prognostic significance of genetic alterations detected by high-density single nucleotide polymorphism array in gastric cancer. *Cancer Sci* **101**, 1261-1269 (2010).

360. Baudis, M. & Cleary, M.L. Progenetix.net: an online repository for molecular cytogenetic aberration data. *Bioinformatics* **17**, 1228-1229 (2001).
361. Oga, A., *et al.* Preferential loss of 5q14-21 in intestinal-type gastric cancer with DNA aneuploidy. *Cytometry* **46**, 57-62 (2001).
362. Sud, R., Wells, D., Talbot, I.C. & Delhanty, J.D. Genetic alterations in gastric cancers from British patients. *Cancer Genet Cytogenet* **126**, 111-119 (2001).
363. El-Rifai, W., *et al.* Genetic differences between adenocarcinomas arising in Barrett's esophagus and gastric mucosa. *Gastroenterology* **121**, 592-598 (2001).
364. zur Hausen, A., *et al.* Distinct chromosomal aberrations in Epstein-Barr virus-carrying gastric carcinomas tested by comparative genomic hybridization. *Gastroenterology* **121**, 612-618 (2001).
365. Kurihara, Y., *et al.* Genome-wide screening of laser capture microdissected gastric signet-ring cell carcinomas. *J Nippon Med Sch* **69**, 235-242 (2002).
366. Chan, W.Y., *et al.* Recurrent genomic aberrations in gastric carcinomas associated with Helicobacter pylori and Epstein-Barr virus. *Diagn Mol Pathol* **11**, 127-134 (2002).
367. Varis, A., *et al.* DNA copy number changes in young gastric cancer patients with special reference to chromosome 19. *Br J Cancer* **88**, 1914-1919 (2003).
368. Vauhkonen, H., Vauhkonen, M., Sajantila, A., Sipponen, P. & Knuutila, S. Characterizing genetically stable and unstable gastric cancers by microsatellites and array comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* **170**, 133-139 (2006).
369. Takeno, S.S., *et al.* Genomic alterations in diffuse-type gastric cancer as shown by high-resolution comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* **190**, 1-7 (2009).
370. Larramendy, M.L., *et al.* Comparative genomic hybridization reveals differences in DNA copy number changes between sporadic gastric carcinomas and gastric carcinomas from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* **106**, 62-65 (1998).
371. Tay, S.T., *et al.* A combined comparative genomic hybridization and expression microarray analysis of gastric cancer reveals novel molecular subtypes. *Cancer Res* **63**, 3309-3316 (2003).
372. Kokkola, A., *et al.* Presence of high-level DNA copy number gains in gastric carcinoma and severely dysplastic adenomas but not in moderately dysplastic adenomas. *Cancer Genet Cytogenet* **107**, 32-36 (1998).
373. Gumus-Akay, G., *et al.* DNA copy number changes in gastric adenocarcinomas: high resolution-comparative genomic hybridization study in Turkey. *Arch Med Res* **40**, 551-560 (2009).
374. Zhu, Y.Q., *et al.* [Chromosomal alterations analyzed by comparative genomic hybridization in primary gastric carcinoma]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* **10**, 160-164 (2007).
375. Wang, L.D., *et al.* Comparative genomic hybridization: comparison between esophageal squamous cell carcinoma and gastric cardia adenocarcinoma from a high-incidence area for both cancers in Henan, northern China. *Dis Esophagus* **19**, 459-467 (2006).
376. Qin, Y.R., *et al.* [Comparative genomic hybridization of esophageal squamous cell carcinoma and gastric cardia adenocarcinoma in high-incidence region of esophageal carcinoma, Linzhou Henan]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* **21**, 625-628 (2004).

377. Weiss, M.M., *et al.* Genome wide array comparative genomic hybridisation analysis of premalignant lesions of the stomach. *Mol Pathol* **56**, 293-298 (2003).
378. Kong, G., *et al.* DNA sequence copy number aberrations associated with histological subtypes and DNA ploidy in gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res* **92**, 740-747 (2001).
379. Uchida, M., *et al.* Genomic profiling of gastric carcinoma in situ and adenomas by array-based comparative genomic hybridization. *J Pathol* **221**, 96-105 (2010).
380. Chang, N.S., Hsu, L.J., Lin, Y.S., Lai, F.J. & Sheu, H.M. WW domain-containing oxidoreductase: a candidate tumor suppressor. *Trends Mol Med* **13**, 12-22 (2007).
381. Aqeilan, R.I., *et al.* Loss of WWOX expression in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* **10**, 3053-3058 (2004).
382. Maeda, N., Semba, S., Nakayama, S., Yanagihara, K. & Yokozaki, H. Loss of WW domain-containing oxidoreductase expression in the progression and development of gastric carcinoma: clinical and histopathologic correlations. *Virchows Arch* **457**, 423-432 (2010).
383. Aqeilan, R.I., *et al.* Inactivation of the Wwox gene accelerates forestomach tumor progression in vivo. *Cancer Res* **67**, 5606-5610 (2007).
384. Gaudio, E., *et al.* Physical association with WWOX suppresses c-Jun transcriptional activity. *Cancer Res* **66**, 11585-11589 (2006).
385. Grunda, J.M., *et al.* Increased expression of thymidylate synthetase (TS), ubiquitin specific protease 10 (USP10) and survivin is associated with poor survival in glioblastoma multiforme (GBM). *J Neurooncol* **80**, 261-274 (2006).
386. Voorhees, P.M., Dees, E.C., O'Neil, B. & Orłowski, R.Z. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin Cancer Res* **9**, 6316-6325 (2003).
387. Rajkumar, S.V., Richardson, P.G., Hideshima, T. & Anderson, K.C. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol* **23**, 630-639 (2005).
388. Yuan, J., Luo, K., Zhang, L., Cheville, J.C. & Lou, Z. USP10 regulates p53 localization and stability by deubiquitinating p53. *Cell* **140**, 384-396 (2010).
389. Bomberger, J.M., Barnaby, R.L. & Stanton, B.A. The deubiquitinating enzyme USP10 regulates the post-endocytic sorting of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway epithelial cells. *J Biol Chem* **284**, 18778-18789 (2009).
390. Faus, H., Meyer, H.A., Huber, M., Bahr, I. & Haendler, B. The ubiquitin-specific protease USP10 modulates androgen receptor function. *Mol Cell Endocrinol* **245**, 138-146 (2005).
391. Reynolds, J.M., *et al.* Cutting edge: regulation of intestinal inflammation and barrier function by IL-17C. *J Immunol* **189**, 4226-4230 (2012).
392. Im, E., Jung, J. & Rhee, S.H. Toll-like receptor 5 engagement induces interleukin-17C expression in intestinal epithelial cells. *J Interferon Cytokine Res* **32**, 583-591 (2012).
393. Jin, Z., *et al.* Promoter hypermethylation of CDH13 is a common, early event in human esophageal adenocarcinogenesis and correlates with clinical risk factors. *Int J Cancer* **123**, 2331-2336 (2008).
394. Chan, D.W., Lee, J.M., Chan, P.C. & Ng, I.O. Genetic and epigenetic inactivation of T-cadherin in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* **123**, 1043-1052 (2008).
395. Riou, P., *et al.* Expression of T-cadherin in tumor cells influences invasive potential of human hepatocellular carcinoma. *FASEB J* **20**, 2291-2301 (2006).
396. Ye, J.Z., *et al.* TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *J Biol Chem* **279**, 47264-47271 (2004).
397. van Steensel, B., Smogorzewska, A. & de Lange, T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* **92**, 401-413 (1998).

398. Li, B. & de Lange, T. Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres. *Mol Biol Cell* **14**, 5060-5068 (2003).
399. Yamada, M., *et al.* Down-regulation of TRF1, TRF2 and TIN2 genes is important to maintain telomeric DNA for gastric cancers. *Anticancer Res* **22**, 3303-3307 (2002).
400. Li, Z., *et al.* High-resolution melting analysis of ADAMTS18 methylation levels in gastric, colorectal and pancreatic cancers. *Med Oncol* **27**, 998-1004 (2010).
401. Porter, S., Clark, I.M., Kevorkian, L. & Edwards, D.R. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* **386**, 15-27 (2005).
402. Jin, H., *et al.* Epigenetic identification of ADAMTS18 as a novel 16q23.1 tumor suppressor frequently silenced in esophageal, nasopharyngeal and multiple other carcinomas. *Oncogene* **26**, 7490-7498 (2007).
403. Bednarek, A.K., *et al.* WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer Res* **60**, 2140-2145 (2000).
404. Paige, A.J., *et al.* WWOX: a candidate tumor suppressor gene involved in multiple tumor types. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11417-11422 (2001).
405. Driouch, K., *et al.* Alternative transcripts of the candidate tumor suppressor gene, WWOX, are expressed at high levels in human breast tumors. *Oncogene* **21**, 1832-1840 (2002).
406. Kuroki, T., *et al.* Genetic alterations of the tumor suppressor gene WWOX in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* **62**, 2258-2260 (2002).
407. Yendamuri, S., *et al.* WW domain containing oxidoreductase gene expression is altered in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **63**, 878-881 (2003).
408. Kuroki, T., *et al.* The tumor suppressor gene WWOX at FRA16D is involved in pancreatic carcinogenesis. *Clin Cancer Res* **10**, 2459-2465 (2004).
409. Nakayama, S., *et al.* Role of the WWOX gene, encompassing fragile region FRA16D, in suppression of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Sci* **99**, 1370-1376 (2008).
410. Carvalho, B., *et al.* Multiple putative oncogenes at the chromosome 20q amplicon contribute to colorectal adenoma to carcinoma progression. *Gut* **58**, 79-89 (2009).
411. Hermsen, M., *et al.* Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* **123**, 1109-1119 (2002).
412. Cheng, L., *et al.* Identification of genes with a correlation between copy number and expression in gastric cancer. *BMC Med Genomics* **5**, 14 (2012).
413. Huang, Y., *et al.* Gene expression in papillary thyroid carcinoma reveals highly consistent profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15044-15049 (2001).
414. Liu, R., Zheng, H.Q., Zhou, Z., Dong, J.T. & Chen, C. KLF5 promotes breast cell survival partially through fibroblast growth factor-binding protein 1-pERK-mediated dual specificity MKP-1 protein phosphorylation and stabilization. *J Biol Chem* **284**, 16791-16798 (2009).
415. Zheng, H.Q., *et al.* Kruppel-like factor 5 promotes breast cell proliferation partially through upregulating the transcription of fibroblast growth factor binding protein 1. *Oncogene* **28**, 3702-3713 (2009).
416. Tong, D., *et al.* Expression of KLF5 is a prognostic factor for disease-free survival and overall survival in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* **12**, 2442-2448 (2006).
417. Chen, C., Bhalala, H.V., Vessella, R.L. & Dong, J.T. KLF5 is frequently deleted and down-regulated but rarely mutated in prostate cancer. *Prostate* **55**, 81-88 (2003).
418. Noto, J.M., *et al.* Helicobacter pylori promotes the expression of Kruppel-like factor 5, a mediator of carcinogenesis, in vitro and in vivo. *PLoS One* **8**, e54344 (2013).

419. Chen, C., *et al.* KLF5 promotes cell proliferation and tumorigenesis through gene regulation and the TSU-Pr1 human bladder cancer cell line. *Int J Cancer* **118**, 1346-1355 (2006).
420. Kwak, M.K., *et al.* Expression of Kruppel-like factor 5 in human gastric carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* **134**, 163-167 (2008).
421. Soon, M.S., *et al.* Expression of Kruppel-like factor 5 in gastric cancer and its clinical correlation in Taiwan. *Virchows Arch* **459**, 161-166 (2011).
422. Williamson, D., *et al.* Role for amplification and expression of glypican-5 in rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* **67**, 57-65 (2007).
423. Li, Y. & Yang, P. GPC5 gene and its related pathways in lung cancer. *J Thorac Oncol* **6**, 2-5 (2011).
424. Veugelers, M., *et al.* Characterization of glypican-5 and chromosomal localization of human GPC5, a new member of the glypican gene family. *Genomics* **40**, 24-30 (1997).
425. Neat, M.J., *et al.* Localisation of a novel region of recurrent amplification in follicular lymphoma to an approximately 6.8 Mb region of 13q32-33. *Genes Chromosomes Cancer* **32**, 236-243 (2001).
426. De Cat, B. & David, G. Developmental roles of the glypicans. *Semin Cell Dev Biol* **12**, 117-125 (2001).
427. Yu, W., *et al.* GPC5 is a possible target for the 13q31-q32 amplification detected in lymphoma cell lines. *J Hum Genet* **48**, 331-335 (2003).
428. Deloukas, P., *et al.* The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 20. *Nature* **414**, 865-871 (2001).
429. El-Rifai, W., *et al.* Consistent genetic alterations in xenografts of proximal stomach and gastro-esophageal junction adenocarcinomas. *Cancer Res* **58**, 34-37 (1998).
430. Guan, X.Y., *et al.* Recurrent chromosome alterations in hepatocellular carcinoma detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **29**, 110-116 (2000).
431. Nakao, K., *et al.* High-resolution analysis of DNA copy number alterations in colorectal cancer by array-based comparative genomic hybridization. *Carcinogenesis* **25**, 1345-1357 (2004).
432. Hidaka, S., *et al.* Differences in 20q13.2 copy number between colorectal cancers with and without liver metastasis. *Clin Cancer Res* **6**, 2712-2717 (2000).
433. Korn, W.M., *et al.* Chromosome arm 20q gains and other genomic alterations in colorectal cancer metastatic to liver, as analyzed by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **25**, 82-90 (1999).
434. Mahlamaki, E.H., *et al.* Frequent amplification of 8q24, 11q, 17q, and 20q-specific genes in pancreatic cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **35**, 353-358 (2002).
435. Fukushige, S., *et al.* Frequent gain of copy number on the long arm of chromosome 20 in human pancreatic adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* **19**, 161-169 (1997).
436. Wong, M.P., *et al.* Chromosomal aberrations of primary lung adenocarcinomas in nonsmokers. *Cancer* **97**, 1263-1270 (2003).
437. Guo, M., *et al.* Hypermethylation of the GATA genes in lung cancer. *Clin Cancer Res* **10**, 7917-7924 (2004).
438. Tanner, M.M., *et al.* Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **6**, 1833-1839 (2000).
439. Watanabe, T., *et al.* Differentially regulated genes as putative targets of amplifications at 20q in ovarian cancers. *Jpn J Cancer Res* **93**, 1114-1122 (2002).

440. Wakana, K., Akiyama, Y., Aso, T. & Yuasa, Y. Involvement of GATA-4/-5 transcription factors in ovarian carcinogenesis. *Cancer Lett* **241**, 281-288 (2006).
441. Bayani, J., *et al.* Spectral karyotyping identifies recurrent complex rearrangements of chromosomes 8, 17, and 20 in osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* **36**, 7-16 (2003).
442. Hodgson, J.G., Chin, K., Collins, C. & Gray, J.W. Genome amplification of chromosome 20 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **78**, 337-345 (2003).
443. Nonet, G.H., *et al.* The ZNF217 gene amplified in breast cancers promotes immortalization of human mammary epithelial cells. *Cancer Res* **61**, 1250-1254 (2001).
444. Veltman, J.A., *et al.* Array-based comparative genomic hybridization for genome-wide screening of DNA copy number in bladder tumors. *Cancer Res* **63**, 2872-2880 (2003).
445. Zhao, C., *et al.* Elevated expression levels of NCOA3, TOP1, and TFAP2C in breast tumors as predictors of poor prognosis. *Cancer* **98**, 18-23 (2003).
446. Collins, C., *et al.* Positional cloning of ZNF217 and NABC1: genes amplified at 20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8703-8708 (1998).
447. Yang, S.H., *et al.* Gene copy number change events at chromosome 20 and their association with recurrence in gastric cancer patients. *Clin Cancer Res* **11**, 612-620 (2005).
448. Wu, Y., Guo, E., Yu, J. & Xie, Q. High DcR3 expression predicts stage pN2-3 in gastric cancer. *Am J Clin Oncol* **31**, 79-83 (2008).
449. Wu, Y., *et al.* Clinical significance of detecting elevated serum DcR3/TR6/M68 in malignant tumor patients. *Int J Cancer* **105**, 724-732 (2003).
450. Simonsen, A., Bremnes, B., Ronning, E., Aasland, R. & Stenmark, H. Syntaxin-16, a putative Golgi t-SNARE. *Eur J Cell Biol* **75**, 223-231 (1998).
451. Akiyama, Y., *et al.* GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer. *Mol Cell Biol* **23**, 8429-8439 (2003).
452. Pitti, R.M., *et al.* Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* **396**, 699-703 (1998).
453. van Dekken, H., *et al.* Comparative genomic hybridization of cancer of the gastroesophageal junction: deletion of 14Q31-32.1 discriminates between esophageal (Barrett's) and gastric cardia adenocarcinomas. *Cancer Res* **59**, 748-752 (1999).
454. Rossi, E., Klersy, C., Manca, R., Zuffardi, O. & Solcia, E. Correlation between genomic alterations assessed by array comparative genomic hybridization, prognostically informative histologic subtype, stage, and patient survival in gastric cancer. *Hum Pathol* **42**, 1937-1945 (2011).
455. Hammoud, Z.T., *et al.* Allelotype analysis of esophageal adenocarcinomas: evidence for the involvement of sequences on the long arm of chromosome 4. *Cancer Res* **56**, 4499-4502 (1996).
456. Pershouse, M.A., *et al.* Deletion mapping of chromosome 4 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* **14**, 369-373 (1997).
457. Polascik, T.J., Cairns, P., Chang, W.Y., Schoenberg, M.P. & Sidransky, D. Distinct regions of allelic loss on chromosome 4 in human primary bladder carcinoma. *Cancer Res* **55**, 5396-5399 (1995).
458. Buetow, K.H., *et al.* Loss of heterozygosity suggests tumor suppressor gene responsible for primary hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8852-8856 (1989).

459. Vogelstein, B., *et al.* Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* **244**, 207-211 (1989).
460. Al-Mulla, F., Behbehani, A.I., Bitar, M.S., Varadharaj, G. & Goings, J.J. Genetic profiling of stage I and II colorectal cancer may predict metastatic relapse. *Mod Pathol* **19**, 648-658 (2006).
461. Arribas, R., *et al.* Prospective assessment of allelic losses at 4p14-16 in colorectal cancer: two mutational patterns and a locus associated with poorer survival. *Clin Cancer Res* **5**, 3454-3459 (1999).
462. Sugai, T., *et al.* Molecular analysis of gastric differentiated-type intramucosal and submucosal cancers. *Int J Cancer* **127**, 2500-2509 (2010).
463. Sibley, K., Bell, S. & Knowles, M.A. Redefining a critical region of LOH on 4p16.3 in bladder cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **29**, 378-379 (2000).
464. Klatte, T., *et al.* Cytogenetic profile predicts prognosis of patients with clear cell renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* **27**, 746-753 (2009).
465. Reutzler, D., *et al.* Genomic imbalances in 61 renal cancers from the proximal tubulus detected by comparative genomic hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **93**, 221-227 (2001).
466. Gutierrez, M.L., *et al.* Cytogenetic heterogeneity of pancreatic ductal adenocarcinomas: identification of intratumoral pathways of clonal evolution. *Histopathology* **58**, 486-497 (2011).
467. Todd, R., *et al.* Deleted in oral cancer-1 (doc-1), a novel oral tumor suppressor gene. *FASEB J* **9**, 1362-1370 (1995).
468. Tsuji, T., *et al.* Cloning, mapping, expression, function, and mutation analyses of the human ortholog of the hamster putative tumor suppressor gene Doc-1. *J Biol Chem* **273**, 6704-6709 (1998).
469. Matsuo, K., *et al.* p12(DOC-1), a growth suppressor, associates with DNA polymerase alpha/primase. *FASEB J* **14**, 1318-1324 (2000).
470. Hu, M.G., *et al.* Role of p12(CDK2-AP1) in transforming growth factor-beta1-mediated growth suppression. *Cancer Res* **64**, 490-499 (2004).
471. Yuan, Z., Sotsky Kent, T. & Weber, T.K. Differential expression of DOC-1 in microsatellite-unstable human colorectal cancer. *Oncogene* **22**, 6304-6310 (2003).
472. Shintani, S., *et al.* Reduction of p12DOC-1 expression is a negative prognostic indicator in patients with surgically resected oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **7**, 2776-2782 (2001).
473. Choi, M.G., *et al.* Decreased expression of p12 is associated with more advanced tumor invasion in human gastric cancer tissues. *Eur Surg Res* **42**, 223-229 (2009).
474. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42 (2000).
475. Verhagen, A.M., *et al.* Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43-53 (2000).
476. Yoo, N.J., *et al.* Immunohistochemical analysis of Smac/DIABLO expression in human carcinomas and sarcomas. *APMIS* **111**, 382-388 (2003).
477. Sekimura, A., *et al.* Expression of Smac/DIABLO is a novel prognostic marker in lung cancer. *Oncol Rep* **11**, 797-802 (2004).
478. Mizutani, Y., *et al.* Downregulation of Smac/DIABLO expression in renal cell carcinoma and its prognostic significance. *J Clin Oncol* **23**, 448-454 (2005).
479. Sakakura, C., *et al.* Differential gene expression profiles of gastric cancer cells established from primary tumour and malignant ascites. *Br J Cancer* **87**, 1153-1161 (2002).

480. Gerke, V., Creutz, C.E. & Moss, S.E. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 449-461 (2005).
481. Rescher, U. & Gerke, V. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci* **117**, 2631-2639 (2004).
482. Gottsch, J.D., *et al.* Gene expression in donor corneal endothelium. *Arch Ophthalmol* **121**, 252-258 (2003).
483. Reutelingsperger, C.P., *et al.* Differential tissue expression of Annexin VIII in human. *FEBS Lett* **349**, 120-124 (1994).
484. Karanjawala, Z.E., *et al.* New markers of pancreatic cancer identified through differential gene expression analyses: claudin 18 and annexin A8. *Am J Surg Pathol* **32**, 188-196 (2008).
485. Gress, T.M., *et al.* Identification of genes with specific expression in pancreatic cancer by cDNA representational difference analysis. *Genes Chromosomes Cancer* **19**, 97-103 (1997).
486. Logsdon, C.D., *et al.* Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. *Cancer Res* **63**, 2649-2657 (2003).
487. Crnogorac-Jurcevic, T., *et al.* Molecular alterations in pancreatic carcinoma: expression profiling shows that dysregulated expression of S100 genes is highly prevalent. *J Pathol* **201**, 63-74 (2003).
488. Mazzucchelli, L. Protein S100A4: too long overlooked by pathologists? *Am J Pathol* **160**, 7-13 (2002).
489. Rosty, C., *et al.* Overexpression of S100A4 in pancreatic ductal adenocarcinomas is associated with poor differentiation and DNA hypomethylation. *Am J Pathol* **160**, 45-50 (2002).
490. Vimalachandran, D., *et al.* High nuclear S100A6 (Calcyclin) is significantly associated with poor survival in pancreatic cancer patients. *Cancer Res* **65**, 3218-3225 (2005).
491. Perou, C.M., *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-752 (2000).
492. Sorlie, T., *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10869-10874 (2001).
493. Sorlie, T., *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8418-8423 (2003).
494. Lehner, F., Kulik, U., Klempnauer, J. & Borlak, J. The hepatocyte nuclear factor 6 (HNF6) and FOXA2 are key regulators in colorectal liver metastases. *FASEB J* **21**, 1445-1462 (2007).
495. Pezzolo, A., *et al.* Presence of 1q gain and absence of 7p gain are new predictors of local or metastatic relapse in localized resectable neuroblastoma. *Neuro Oncol* **11**, 192-200 (2009).
496. Lo, K.C., *et al.* Gain of 1q is a potential univariate negative prognostic marker for survival in medulloblastoma. *Clin Cancer Res* **13**, 7022-7028 (2007).
497. Balcarkova, J., *et al.* Gain of chromosome arm 1q in patients in relapse and progression of multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* **192**, 68-72 (2009).
498. Hing, S., *et al.* Gain of 1q is associated with adverse outcome in favorable histology Wilms' tumors. *Am J Pathol* **158**, 393-398 (2001).
499. Kjellman, P., *et al.* Gain of 1q and loss of 9q21.3-q32 are associated with a less favorable prognosis in papillary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* **32**, 43-49 (2001).

500. Nakamura, H., *et al.* Partial purification and characterization of human hepatoma-derived growth factor. *Clin Chim Acta* **183**, 273-284 (1989).
501. Nakamura, H., *et al.* Molecular cloning of complementary DNA for a novel human hepatoma-derived growth factor. Its homology with high mobility group-1 protein. *J Biol Chem* **269**, 25143-25149 (1994).
502. Cilley, R.E., Zgleszewski, S.E. & Chinoy, M.R. Fetal lung development: airway pressure enhances the expression of developmental genes. *J Pediatr Surg* **35**, 113-118; discussion 119 (2000).
503. Everett, A.D., Stoops, T. & McNamara, C.A. Nuclear targeting is required for hepatoma-derived growth factor-stimulated mitogenesis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **276**, 37564-37568 (2001).
504. Everett, A.D., Lobe, D.R., Matsumura, M.E., Nakamura, H. & McNamara, C.A. Hepatoma-derived growth factor stimulates smooth muscle cell growth and is expressed in vascular development. *J Clin Invest* **105**, 567-575 (2000).
505. Oliver, J.A. & Al-Awqati, Q. An endothelial growth factor involved in rat renal development. *J Clin Invest* **102**, 1208-1219 (1998).
506. Enomoto, H., *et al.* Hepatoma-derived growth factor is highly expressed in developing liver and promotes fetal hepatocyte proliferation. *Hepatology* **36**, 1519-1527 (2002).
507. Kishima, Y., *et al.* Antisense oligonucleotides of hepatoma-derived growth factor (HDGF) suppress the proliferation of hepatoma cells. *Hepatogastroenterology* **49**, 1639-1644 (2002).
508. Okuda, Y., *et al.* Hepatoma-derived growth factor induces tumorigenesis in vivo through both direct angiogenic activity and induction of vascular endothelial growth factor. *Cancer Sci* **94**, 1034-1041 (2003).
509. Kishima, Y., *et al.* Hepatoma-derived growth factor stimulates cell growth after translocation to the nucleus by nuclear localization signals. *J Biol Chem* **277**, 10315-10322 (2002).
510. Ren, H., *et al.* Expression of hepatoma-derived growth factor is a strong prognostic predictor for patients with early-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **22**, 3230-3237 (2004).
511. Hu, T.H., *et al.* Expression of hepatoma-derived growth factor in hepatocellular carcinoma. *Cancer* **98**, 1444-1456 (2003).
512. Iwasaki, T., *et al.* Hepatoma-derived growth factor as a prognostic marker in completely resected non-small-cell lung cancer. *Oncol Rep* **13**, 1075-1080 (2005).
513. Yamamoto, S., *et al.* Expression of hepatoma-derived growth factor is correlated with lymph node metastasis and prognosis of gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* **12**, 117-122 (2006).
514. Natrajan, R., *et al.* Array CGH profiling of favourable histology Wilms tumours reveals novel gains and losses associated with relapse. *J Pathol* **210**, 49-58 (2006).
515. Bashour, A.M., Fullerton, A.T., Hart, M.J. & Bloom, G.S. IQGAP1, a Rac- and Cdc42-binding protein, directly binds and cross-links microfilaments. *J Cell Biol* **137**, 1555-1566 (1997).
516. Noritake, J., Watanabe, T., Sato, K., Wang, S. & Kaibuchi, K. IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *J Cell Sci* **118**, 2085-2092 (2005).
517. Nojima, H., Adachi, M., Matsui, T., Okawa, K. & Tsukita, S. IQGAP3 regulates cell proliferation through the Ras/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol* **10**, 971-978 (2008).
518. White, C.D., Brown, M.D. & Sacks, D.B. IQGAPs in cancer: a family of scaffold proteins underlying tumorigenesis. *FEBS Lett* **583**, 1817-1824 (2009).

519. Wang, S., *et al.* IQGAP3, a novel effector of Rac1 and Cdc42, regulates neurite outgrowth. *J Cell Sci* **120**, 567-577 (2007).
520. Hartgrink, H.H., Jansen, E.P., van Grieken, N.C. & van de Velde, C.J. Gastric cancer. *Lancet* **374**, 477-490 (2009).
521. Murad, A.M., *et al.* Modified therapy with 5-fluorouracil, doxorubicin, and methotrexate in advanced gastric cancer. *Cancer* **72**, 37-41 (1993).
522. Vanhoefer, U., *et al.* Final results of a randomized phase III trial of sequential high-dose methotrexate, fluorouracil, and doxorubicin versus etoposide, leucovorin, and fluorouracil versus infusional fluorouracil and cisplatin in advanced gastric cancer: A trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Tract Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol* **18**, 2648-2657 (2000).
523. Ajani, J.A., *et al.* Clinical benefit with docetaxel plus fluorouracil and cisplatin compared with cisplatin and fluorouracil in a phase III trial of advanced gastric or gastroesophageal cancer adenocarcinoma: the V-325 Study Group. *J Clin Oncol* **25**, 3205-3209 (2007).
524. Wagner, A.D., *et al.* Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data. *J Clin Oncol* **24**, 2903-2909 (2006).
525. Buzzoni, R., *et al.* Pathological features as predictors of recurrence after radical resection of gastric cancer. *Br J Surg* **93**, 205-209 (2006).
526. Cidon, E.U. Gastric cancer and the search for a good prognostic classification: a challenge. *Clin Exp Gastroenterol* **3**, 113-116 (2010).
527. Xu, D.Z., *et al.* Positive lymph node ratio is an independent prognostic factor in gastric cancer after d2 resection regardless of the examined number of lymph nodes. *Ann Surg Oncol* **16**, 319-326 (2009).
528. Sakar, B., *et al.* Timing of death from tumor recurrence after curative gastrectomy for gastric cancer. *Am J Clin Oncol* **27**, 205-209 (2004).
529. Nitti, D., *et al.* Ratio between metastatic and examined lymph nodes is an independent prognostic factor after D2 resection for gastric cancer: analysis of a large European monoinstitutional experience. *Ann Surg Oncol* **10**, 1077-1085 (2003).
530. Roukos, D.H., *et al.* Pathological serosa and node-based classification accurately predicts gastric cancer recurrence risk and outcome, and determines potential and limitation of a Japanese-style extensive surgery for Western patients: a prospective with quality control 10-year follow-up study. *Br J Cancer* **84**, 1602-1609 (2001).
531. Maehara, Y., *et al.* Age-related characteristics of gastric carcinoma in young and elderly patients. *Cancer* **77**, 1774-1780 (1996).
532. Esaki, Y., Hirayama, R. & Hirokawa, K. A comparison of patterns of metastasis in gastric cancer by histologic type and age. *Cancer* **65**, 2086-2090 (1990).
533. Yokota, T., *et al.* Is tumor size a prognostic indicator for gastric carcinoma? *Anticancer Res* **22**, 3673-3677 (2002).
534. Saito, H., *et al.* Macroscopic tumor size as a simple prognostic indicator in patients with gastric cancer. *Am J Surg* **192**, 296-300 (2006).
535. Marrelli, D., *et al.* Different patterns of recurrence in gastric cancer depending on Lauren's histological type: longitudinal study. *World J Surg* **26**, 1160-1165 (2002).
536. Duarte, I. & Llanos, O. Patterns of metastases in intestinal and diffuse types of carcinoma of the stomach. *Hum Pathol* **12**, 237-242 (1981).
537. Mori, M., *et al.* Correlation between metastatic site, histological type, and serum tumor markers of gastric carcinoma. *Hum Pathol* **26**, 504-508 (1995).
538. Huang, K.H., *et al.* Factors affecting recurrence in node-negative advanced gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* **24**, 1522-1526 (2009).

539. Gouzi, J.L., *et al.* Total versus subtotal gastrectomy for adenocarcinoma of the gastric antrum. A French prospective controlled study. *Ann Surg* **209**, 162-166 (1989).
540. Robertson, C.S., *et al.* A prospective randomized trial comparing R1 subtotal gastrectomy with R3 total gastrectomy for antral cancer. *Ann Surg* **220**, 176-182 (1994).
541. Cuschieri, A., *et al.* Patient survival after D1 and D2 resections for gastric cancer: long-term results of the MRC randomized surgical trial. Surgical Co-operative Group. *Br J Cancer* **79**, 1522-1530 (1999).
542. Saito, H., *et al.* Distinct recurrence pattern and outcome of adenocarcinoma of the gastric cardia in comparison with carcinoma of other regions of the stomach. *World J Surg* **30**, 1864-1869 (2006).
543. Marrelli, D., *et al.* Prediction of recurrence after radical surgery for gastric cancer: a scoring system obtained from a prospective multicenter study. *Ann Surg* **241**, 247-255 (2005).
544. Inoue, H., Matsuyama, A., Mimori, K., Ueo, H. & Mori, M. Prognostic score of gastric cancer determined by cDNA microarray. *Clin Cancer Res* **8**, 3475-3479 (2002).
545. Marubini, E., *et al.* A prognostic score for patients resected for gastric cancer. *Eur J Cancer* **29A**, 845-850 (1993).
546. Victorzon, M., Lundin, J., Haglund, C., Nordling, S. & Roberts, P.J. A risk score for predicting outcome in patients with gastric cancer, based on stage, sialyl-Tn immunoreactivity and ploidy--a multivariate analysis. *Int J Cancer* **67**, 190-193 (1996).
547. Kologlu, M., *et al.* A prognostic score for gastric cancer. *Am J Surg* **179**, 521-526 (2000).
548. Kattan, M.W., Karpeh, M.S., Mazumdar, M. & Brennan, M.F. Postoperative nomogram for disease-specific survival after an R0 resection for gastric carcinoma. *J Clin Oncol* **21**, 3647-3650 (2003).
549. Liebermeister, W. Linear modes of gene expression determined by independent component analysis. *Bioinformatics* **18**, 51-60 (2002).
550. Liu, K.H. & Huang, D.S. Cancer classification using Rotation Forest. *Comput Biol Med* **38**, 601-610 (2008).
551. Kim, M. & Chung, H.C. Standardized genetic alteration score and predicted score for predicting recurrence status of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **135**, 1501-1512 (2009).
552. Shiraishi, N., *et al.* Early and late recurrence after gastrectomy for gastric carcinoma. Univariate and multivariate analyses. *Cancer* **89**, 255-261 (2000).
553. Sun, Z., *et al.* Prognostic significance of microscopic positive margins for gastric cancer patients with potentially curative resection. *Ann Surg Oncol* **16**, 3028-3037 (2009).
554. Ogata, K., *et al.* Factors correlated with early and late recurrence after curative gastrectomy for gastric cancer. *Hepatogastroenterology* **56**, 1760-1764 (2009).
555. Yokota, T., *et al.* Early and late recurrences after gastrectomy for gastric cancer: a multiple logistic regression analysis. *Ups J Med Sci* **107**, 17-22 (2002).
556. Yoo, C.H., Noh, S.H., Shin, D.W., Choi, S.H. & Min, J.S. Recurrence following curative resection for gastric carcinoma. *Br J Surg* **87**, 236-242 (2000).
557. Otsuji, E., Kobayashi, S., Okamoto, K., Hagiwara, A. & Yamagishi, H. Is timing of death from tumor recurrence predictable after curative resection for gastric cancer? *World J Surg* **25**, 1373-1376 (2001).

558. Wick, W., *et al.* Evidence for a novel tumor suppressor gene on chromosome 15 associated with progression to a metastatic stage in breast cancer. *Oncogene* **12**, 973-978 (1996).
559. Rhiem, K., *et al.* Chromosomal region 15q21.1 is a frequent target of allelic imbalance in advanced breast carcinomas. *Int J Cancer* **106**, 74-77 (2003).
560. Richard, F., *et al.* Patterns of chromosomal imbalances in invasive breast cancer. *Int J Cancer* **89**, 305-310 (2000).
561. Park, W.S., *et al.* A distinct tumor suppressor gene locus on chromosome 15q21.1 in sporadic form of colorectal cancer. *Cancer Res* **60**, 70-73 (2000).
562. Balsara, B.R., *et al.* Comparative genomic hybridization and loss of heterozygosity analyses identify a common region of deletion at 15q11.1-15 in human malignant mesothelioma. *Cancer Res* **59**, 450-454 (1999).
563. De Rienzo, A., Balsara, B.R., Apostolou, S., Jhanwar, S.C. & Testa, J.R. Loss of heterozygosity analysis defines a 3-cM region of 15q commonly deleted in human malignant mesothelioma. *Oncogene* **20**, 6245-6249 (2001).
564. Rigaud, G., *et al.* Allelotype of pancreatic acinar cell carcinoma. *Int J Cancer* **88**, 772-777 (2000).
565. Mahlamaki, E.H., *et al.* Comparative genomic hybridization reveals frequent gains of 20q, 8q, 11q, 12p, and 17q, and losses of 18q, 9p, and 15q in pancreatic cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **20**, 383-391 (1997).
566. Beder, L.B., *et al.* Genome-wide analyses on loss of heterozygosity in head and neck squamous cell carcinomas. *Lab Invest* **83**, 99-105 (2003).
567. Cliby, W., *et al.* Human epithelial ovarian cancer allelotype. *Cancer Res* **53**, 2393-2398 (1993).
568. Dodson, M.K., *et al.* Comparison of loss of heterozygosity patterns in invasive low-grade and high-grade epithelial ovarian carcinomas. *Cancer Res* **53**, 4456-4460 (1993).
569. Okada, S., *et al.* Allelotype analysis of common epithelial ovarian cancers with special reference to comparison between clear cell adenocarcinoma with other histological types. *Jpn J Cancer Res* **93**, 798-806 (2002).
570. Han, H.S., Kim, H.S., Woo, D.K., Kim, W.H. & Kim, Y.I. Loss of heterozygosity in gastric neuroendocrine tumor. *Anticancer Res* **20**, 2849-2854 (2000).
571. Hu, N., *et al.* Allelic loss in esophageal squamous cell carcinoma patients with and without family history of upper gastrointestinal tract cancer. *Clin Cancer Res* **5**, 3476-3482 (1999).
572. Stanton, S.E., Shin, S.W., Johnson, B.E. & Meyerson, M. Recurrent allelic deletions of chromosome arms 15q and 16q in human small cell lung carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* **27**, 323-331 (2000).
573. Girard, L., Zochbauer-Muller, S., Virmani, A.K., Gazdar, A.F. & Minna, J.D. Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss, differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and loci clustering. *Cancer Res* **60**, 4894-4906 (2000).
574. He, H. & Sun, Y. Ribosomal protein S27L is a direct p53 target that regulates apoptosis. *Oncogene* **26**, 2707-2716 (2007).
575. Schmidt, D. & Muller, S. Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2872-2877 (2002).
576. Bernardi, R. & Pandolfi, P.P. Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene* **22**, 9048-9057 (2003).
577. Murphy, M., *et al.* Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* **13**, 2490-2501 (1999).

578. Borrow, J., Goddard, A.D., Sheer, D. & Solomon, E. Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. *Science* **249**, 1577-1580 (1990).
579. de The, H., *et al.* The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* **66**, 675-684 (1991).
580. Goddard, A.D., Borrow, J., Freemont, P.S. & Solomon, E. Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Science* **254**, 1371-1374 (1991).
581. Kakizuka, A., *et al.* Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* **66**, 663-674 (1991).
582. Pandolfi, P.P., *et al.* Structure and origin of the acute promyelocytic leukemia myl/RAR alpha cDNA and characterization of its retinoid-binding and transactivation properties. *Oncogene* **6**, 1285-1292 (1991).
583. Wang, Z.G., *et al.* Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science* **279**, 1547-1551 (1998).
584. Gambacorta, M., *et al.* Heterogeneous nuclear expression of the promyelocytic leukemia (PML) protein in normal and neoplastic human tissues. *Am J Pathol* **149**, 2023-2035 (1996).
585. Koken, M.H., *et al.* The PML growth-suppressor has an altered expression in human oncogenesis. *Oncogene* **10**, 1315-1324 (1995).
586. Zhang, P., *et al.* Lack of expression for the suppressor PML in human small cell lung carcinoma. *Int J Cancer* **85**, 599-605 (2000).
587. Gurrieri, C., *et al.* Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. *J Natl Cancer Inst* **96**, 269-279 (2004).
588. Chan, J.Y., Chin, W., Liew, C.T., Chang, K.S. & Johnson, P.J. Altered expression of the growth and transformation suppressor PML gene in human hepatocellular carcinomas and in hepatitis tissues. *Eur J Cancer* **34**, 1015-1022 (1998).
589. Cho, Y., Lee, I., Maul, G.G. & Yu, E. A novel nuclear substructure, ND10: distribution in normal and neoplastic human tissues. *Int J Mol Med* **1**, 717-724 (1998).
590. Lee, H.E., *et al.* Loss of promyelocytic leukemia protein in human gastric cancers. *Cancer Lett* **247**, 103-109 (2007).
591. Morohara, K., *et al.* Gastric and intestinal phenotypic cell marker expressions in gastric differentiated-type carcinomas: association with E-cadherin expression and chromosomal changes. *J Cancer Res Clin Oncol* **132**, 363-375 (2006).
592. Kabbarah, O., *et al.* Integrative genome comparison of primary and metastatic melanomas. *PLoS One* **5**, e10770 (2010).
593. Bollschweiler, E., *et al.* Is the prognosis for Japanese and German patients with gastric cancer really different? *Cancer* **71**, 2918-2925 (1993).
594. Noguchi, Y., Imada, T., Matsumoto, A., Coit, D.G. & Brennan, M.F. Radical surgery for gastric cancer. A review of the Japanese experience. *Cancer* **64**, 2053-2062 (1989).
595. Smith, D.D., Schwarz, R.R. & Schwarz, R.E. Impact of total lymph node count on staging and survival after gastrectomy for gastric cancer: data from a large US-population database. *J Clin Oncol* **23**, 7114-7124 (2005).
596. Kim, D.Y., *et al.* Predictors of long-term survival in node-positive gastric carcinoma patients with curative resection. *Langenbecks Arch Surg* **392**, 131-134 (2007).
597. Kim, D.Y., *et al.* Prognostic factors in patients with node-negative gastric carcinoma: a comparison with node-positive gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* **12**, 1182-1186 (2006).

598. Hermanek, P. Prognostic factors in stomach cancer surgery. *Eur J Surg Oncol* **12**, 241-246 (1986).
599. Piessen, G., Messager, M., Leteurtre, E., Jean-Pierre, T. & Mariette, C. Signet ring cell histology is an independent predictor of poor prognosis in gastric adenocarcinoma regardless of tumoral clinical presentation. *Ann Surg* **250**, 878-887 (2009).
600. Yokota, T., *et al.* Signet ring cell carcinoma of the stomach: a clinicopathological comparison with the other histological types. *Tohoku J Exp Med* **186**, 121-130 (1998).
601. Hyung, W.J., *et al.* Early gastric carcinoma with signet ring cell histology. *Cancer* **94**, 78-83 (2002).
602. Kim, D.Y., *et al.* Clinicopathological characteristics of signet ring cell carcinoma of the stomach. *ANZ J Surg* **74**, 1060-1064 (2004).
603. Park, J.M., *et al.* Gastric cancer histology: clinicopathologic characteristics and prognostic value. *J Surg Oncol* **98**, 520-525 (2008).
604. Davessar, K., Pezzullo, J.C., Kessimian, N., Hale, J.H. & Jauregui, H.O. Gastric adenocarcinoma: prognostic significance of several pathologic parameters and histologic classifications. *Hum Pathol* **21**, 325-332 (1990).
605. Lee, C.C., *et al.* Survival predictors in patients with node-negative gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* **22**, 1014-1018 (2007).
606. Dicken, B.J., *et al.* Gastric cancer: establishing predictors of biologic behavior with use of population-based data. *Ann Surg Oncol* **11**, 629-635 (2004).
607. Barchielli, A., Amorosi, A., Balzi, D., Crocetti, E. & Nesi, G. Long-term prognosis of gastric cancer in a European country: a population-based study in Florence (Italy). 10-year survival of cases diagnosed in 1985-1987. *Eur J Cancer* **37**, 1674-1680 (2001).
608. Zu, H., Wang, F., Ma, Y. & Xue, Y. Stage-stratified analysis of prognostic significance of tumor size in patients with gastric cancer. *PLoS One* **8**, e54502 (2013).
609. Adachi, Y., Oshiro, T., Mori, M., Maehara, Y. & Sugimachi, K. Tumor size as a simple prognostic indicator for gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol* **4**, 137-140 (1997).
610. Giuliani, A., *et al.* Maximum gastric cancer diameter as a prognostic indicator: univariate and multivariate analysis. *J Exp Clin Cancer Res* **22**, 531-538 (2003).
611. Li, C., *et al.* Risk factors of survival and surgical treatment for advanced gastric cancer with large tumor size. *J Gastrointest Surg* **13**, 881-885 (2009).
612. Aoyama, T., *et al.* Macroscopic tumor size as an independent prognostic factor for stage II/III gastric cancer patients who underwent D2 gastrectomy followed by adjuvant chemotherapy with S-1. *Gastric Cancer* **14**, 274-278 (2011).
613. Tschentscher, F., Prescher, G., Zeschnigk, M., Horsthemke, B. & Lohmann, D.R. Identification of chromosomes 3, 6, and 8 aberrations in uveal melanoma by microsatellite analysis in comparison to comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* **122**, 13-17 (2000).
614. Walch, A.K., *et al.* Chromosomal imbalances in Barrett's adenocarcinoma and the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence. *Am J Pathol* **156**, 555-566 (2000).
615. Smith, A.C., *et al.* A network of Rab GTPases controls phagosome maturation and is modulated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Cell Biol* **176**, 263-268 (2007).
616. Hou, Q., *et al.* Integrative genomics identifies RAB23 as an invasion mediator gene in diffuse-type gastric cancer. *Cancer Res* **68**, 4623-4630 (2008).
617. Kim, K.R., *et al.* [Gene expression profiling using oligonucleotide microarray in atrophic gastritis and intestinal metaplasia]. *Korean J Gastroenterol* **49**, 209-224 (2007).
618. Guo, A., *et al.* Open brain gene product Rab23: expression pattern in the adult mouse brain and functional characterization. *J Neurosci Res* **83**, 1118-1127 (2006).

619. Olkkonen, V.M., *et al.* Isolation of a mouse cDNA encoding Rab23, a small novel GTPase expressed predominantly in the brain. *Gene* **138**, 207-211 (1994).
620. Liu, Y.J., *et al.* Rab23 is a potential biological target for treating hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* **13**, 1010-1017 (2007).
621. Fukushige, S., *et al.* Localization of a novel v-erbB-related gene, c-erbB-2, on human chromosome 17 and its amplification in a gastric cancer cell line. *Mol Cell Biol* **6**, 955-958 (1986).
622. Sakai, K., *et al.* Expression of epidermal growth factor receptors on normal human gastric epithelia and gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* **77**, 1047-1052 (1986).
623. Jorgensen, J.T. & Hersom, M. HER2 as a Prognostic Marker in Gastric Cancer - A Systematic Analysis of Data from the Literature. *J Cancer* **3**, 137-144 (2012).
624. Chua, T.C. & Merrett, N.D. Clinicopathologic factors associated with HER2-positive gastric cancer and its impact on survival outcomes--a systematic review. *Int J Cancer* **130**, 2845-2856 (2012).
625. Grabsch, H., Sivakumar, S., Gray, S., Gabbert, H.E. & Muller, W. HER2 expression in gastric cancer: Rare, heterogeneous and of no prognostic value - conclusions from 924 cases of two independent series. *Cell Oncol* **32**, 57-65 (2010).
626. Kunz, P.L., *et al.* HER2 expression in gastric and gastroesophageal junction adenocarcinoma in a US population: clinicopathologic analysis with proposed approach to HER2 assessment. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **20**, 13-24 (2012).
627. Cidon, E.U., Centeno, R.G., Lagarto, E.G. & Peral, J.I. HER-2 Evaluation in a Specific Gastric Cancer Population with the Highest Rate of Mortality in Spain. *J Oncol* **2011**, 391564 (2011).
628. Gomez-Martin, C., *et al.* HER2/neu testing for anti-HER2-based therapies in patients with unresectable and/or metastatic gastric cancer. *J Clin Pathol* **65**, 751-757 (2012).
629. Liu, W., Zhong, S., Chen, J. & Yu, Y. HER-2/neu overexpression is an independent prognostic factor for intestinal-type and early-stage gastric cancer patients. *J Clin Gastroenterol* **46**, e31-37 (2012).
630. Liu, J.M., *et al.* Prognostic implications of the expression of erbB2, topoisomerase II alpha and thymidylate synthase in metastatic gastric cancer after fluorouracil-based therapy. *Jpn J Clin Oncol* **34**, 727-732 (2004).
631. Jain, S., Filipe, M.I., Gullick, W.J., Linehan, J. & Morris, R.W. c-erbB-2 proto-oncogene expression and its relationship to survival in gastric carcinoma: an immunohistochemical study on archival material. *Int J Cancer* **48**, 668-671 (1991).
632. Song, H.S., Do, Y.R., Kim, I.H., Sohn, S.S. & Kwon, K.Y. Prognostic significance of immunohistochemical expression of EGFR and C-erbB-2 oncoprotein in curatively resected gastric cancer. *Cancer Res Treat* **36**, 240-245 (2004).
633. Garcia, I., *et al.* Clinical significance of the epidermal growth factor receptor and HER2 receptor in resectable gastric cancer. *Ann Surg Oncol* **10**, 234-241 (2003).
634. Pinto-de-Sousa, J., *et al.* c-erb B-2 expression is associated with tumor location and venous invasion and influences survival of patients with gastric carcinoma. *Int J Surg Pathol* **10**, 247-256 (2002).
635. Ghaderi, A., *et al.* The expression of c-erbB-1 and c-erbB-2 in Iranian patients with gastric carcinoma. *Pathol Oncol Res* **8**, 252-256 (2002).
636. Wang, Y.L., Sheu, B.S., Yang, H.B., Lin, P.W. & Chang, Y.C. Overexpression of c-erb-B2 proteins in tumor and non-tumor parts of gastric adenocarcinoma--emphasis on its relation to H. pylori infection and clinicohistological characteristics. *Hepatogastroenterology* **49**, 1172-1176 (2002).

637. Kameda, T., *et al.* Expression of ERBB2 in human gastric carcinomas: relationship between p185ERBB2 expression and the gene amplification. *Cancer Res* **50**, 8002-8009 (1990).
638. Marx, A.H., *et al.* HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer. *Hum Pathol* **40**, 769-777 (2009).
639. Barros-Silva, J.D., *et al.* Association of ERBB2 gene status with histopathological parameters and disease-specific survival in gastric carcinoma patients. *Br J Cancer* **100**, 487-493 (2009).
640. Yano, T., *et al.* Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. *Oncol Rep* **15**, 65-71 (2006).
641. Jorgensen, J.T. Targeted HER2 treatment in advanced gastric cancer. *Oncology* **78**, 26-33 (2010).
642. Fabi, A., *et al.* HER2 protein and gene variation between primary and metastatic breast cancer: significance and impact on patient care. *Clin Cancer Res* **17**, 2055-2064 (2011).
643. Somlo, G., *et al.* A phase I/II prospective, single arm trial of gefitinib, trastuzumab, and docetaxel in patients with stage IV HER-2 positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **131**, 899-906 (2012).
644. Seol, H., *et al.* Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance. *Mod Pathol* **25**, 938-948 (2012).
645. Vance, G.H., *et al.* Genetic heterogeneity in HER2 testing in breast cancer: panel summary and guidelines. *Arch Pathol Lab Med* **133**, 611-612 (2009).
646. Lee, H.E., *et al.* Clinical significance of intratumoral HER2 heterogeneity in gastric cancer. *Eur J Cancer* (2012).
647. Kim, M.A., *et al.* Evaluation of HER-2 gene status in gastric carcinoma using immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, and real-time quantitative polymerase chain reaction. *Hum Pathol* **38**, 1386-1393 (2007).
648. Lee, S., de Boer, W.B., Fermoye, S., Platten, M. & Kumarasinghe, M.P. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in gastric carcinoma: issues related to heterogeneity in biopsies and resections. *Histopathology* **59**, 832-840 (2011).
649. Bilous, M., *et al.* HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer. *Hum Pathol* **41**, 304-305; author reply 305-306 (2010).
650. Tafe, L.J., *et al.* Human epidermal growth factor receptor 2 testing in gastroesophageal cancer: correlation between immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Arch Pathol Lab Med* **135**, 1460-1465 (2011).
651. Fenoglio-Preiser, C.M., Wang, J., Stemmermann, G.N. & Noffsinger, A. TP53 and gastric carcinoma: a review. *Hum Mutat* **21**, 258-270 (2003).
652. Ye, Y.W., *et al.* Study on the different expression of molecular markers between cardiac cancer and distal gastric cancer and their correlations with clinicopathological features. *Dig Surg* **26**, 384-391 (2009).
653. Liu, X., *et al.* The prognostic significance of apoptosis-related biological markers in Chinese gastric cancer patients. *PLoS One* **6**, e29670 (2011).
654. Gamboa-Dominguez, A., *et al.* Prognostic significance of p21WAF1/CIP1, p27Kip1, p53 and E-cadherin expression in gastric cancer. *J Clin Pathol* **60**, 756-761 (2007).
655. Feakins, R.M., *et al.* p27(Kip1) loss does not predict survival in patients with advanced gastric carcinoma. *Cancer* **89**, 1684-1691 (2000).
656. Kaye, P.V., Radebold, K., Isaacs, S. & Dent, D.M. Expression of p53 and p21waf1/cip1 in gastric carcinoma: lack of inter-relationship or correlation with prognosis. *Eur J Surg Oncol* **26**, 39-43 (2000).

657. Migaldi, M., *et al.* P27Kip1 expression and survival in NO gastric carcinoma. *Pathol Res Pract* **197**, 231-236 (2001).
658. Liu, X.P., *et al.* Combined examination of p27(Kip1), p21(Waf1/Cip1) and p53 expression allows precise estimation of prognosis in patients with gastric carcinoma. *Histopathology* **39**, 603-610 (2001).
659. Yk, W., *et al.* Assessment of ERBB2 and EGFR gene amplification and protein expression in gastric carcinoma by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Mol Cytogenet* **4**, 14 (2011).
660. Lieto, E., *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is an independent prognostic indicator of worse outcome in gastric cancer patients. *Ann Surg Oncol* **15**, 69-79 (2008).
661. Mammano, E., *et al.* Epidermal growth factor receptor (EGFR): mutational and protein expression analysis in gastric cancer. *Anticancer Res* **26**, 3547-3550 (2006).
662. Gamboa-Dominguez, A., *et al.* Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor survival in gastric adenocarcinoma from Mexican patients: a multivariate analysis using a standardized immunohistochemical detection system. *Mod Pathol* **17**, 579-587 (2004).
663. Reichelt, U., *et al.* Frequent homogeneous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinoma of the esophagus. *Mod Pathol* **20**, 120-129 (2007).
664. Bozzetti, C., *et al.* Comparison of HER2 status in primary and paired metastatic sites of gastric carcinoma. *Br J Cancer* **104**, 1372-1376 (2011).
665. Kim, M.A., Lee, H.J., Yang, H.K., Bang, Y.J. & Kim, W.H. Heterogeneous amplification of ERBB2 in primary lesions is responsible for the discordant ERBB2 status of primary and metastatic lesions in gastric carcinoma. *Histopathology* **59**, 822-831 (2011).
666. Kim, J.H., Kim, M.A., Lee, H.S. & Kim, W.H. Comparative analysis of protein expressions in primary and metastatic gastric carcinomas. *Hum Pathol* **40**, 314-322 (2009).
667. Kuroda, A., *et al.* Genomic profiling of submucosal-invasive gastric cancer by array-based comparative genomic hybridization. *PLoS One* **6**, e22313 (2011).
668. Peng, D.F., Sugihara, H., Mukaisho, K., Ling, Z.Q. & Hattori, T. Genetic lineage of poorly differentiated gastric carcinoma with a tubular component analysed by comparative genomic hybridization. *J Pathol* **203**, 884-895 (2004).