



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS DOCTORAL

MODULACIÓN DE LAS VÍAS DE MEK/ERK EN CÁNCER GÁSTRICO: VALOR PRONÓSTICO

Autor: MARTA MARTÍN- RICHARD

Director: AGUSTÍ BARNADAS MOLINER

Tutor: CARLOS GUARNER AGUILAR

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA (UAB)

DEPARTAMENT DE MEDICINA

Programa de Doctorado de Medicina

2015

INDICE

	Pag.
1. Índice	2
2. Abreviaturas	4
3. Hipótesis de Trabajo y Objetivos	5
4. Introducción	7
4.1 Epidemiología	7
4.2 CG	9
4.3 Vía ERK/ MERK	18
4.3.1. Mecanismo relacionado con MEK/ERK	18
4.3.2. Mecanismo independiente de MEK/ERK	19
4.3.3. Alteraciones de la vía Ras/ RAF / MEK /ERK en cáncer Gástrico	21
5. Material y Métodos	24
5.1 Materiales	24
5.1.1. Pacientes	24
5.1.2 Material de estudio e IHQ	24
5.2 Métodos	25
5.2.1. Estadiaje de los pacientes	25
5.2.2 Factores Pronósticos	25
5.2.3 Elaboración de las matrices tisulares (TMA)	25
5.2.4 IHQ	26
5.2.5 FISH	27
5.2.6 Análisis con PCR	29
5.2.7 Inmunofluorescencia	30
5.2.7 Análisis Estadístico	33
6. Resultados	35

6.1 Características Clínicas	35
6.2 Expresión de ERK, p ERK y expresión nuclear de pERK	38
6.2.1 Expresión por IHQ	38
6.2.2 Expresión por inmunofluorescencia	42
6.3 Expresión de ERK, p ERK y expresión nuclear de pERK:	
Correlación con la supervivencia	49
6.3.1 Características Clínicas y su relación con la supervivencia	49
6.3.2 Correlación de ERK, pERK y pERK nuclear determinado por IHQ con la supervivencia	52
6.3.3 Correlación de ERK, pERK y pERK nuclear determinado por inmunofluorescencia con la supervivencia	55
6.4 Correlación entre la expresión de pERK nuclear y la Expresión de los factores moduladores de la vía	59
6.4.1 Expresión de VEGF, EGFR o HER2	59
6.4.2 Mutación de KRAS y BRAF	63
6.4.3 Expresión de MST2 y RKIP	64
6.5 Correlación de la expresión de los factores Moduladores de la vía y su relación con la Supervivencia	74
6.5.1 Expresión de VEGF, EGFR o HER2	74
6.5.2 Mutación de KRAS y BRAF	77
6.5.3 Expresión de MST2 y RKIP	78
7 Discusión	80
8Conclusiones	85
9Bibliografía	87

Abreviaturas

CG	Cáncer Gástrico
T	profundidad de la invasión de la pared gástrica
N	la afectación ganglionar
IHQ	inmunohistoquímica
IF	inmunofluorescencia
SLE	supervivencia libre de enfermedad
SE	supervivencia específica (SE)
SG	supervivencia global
HP	Helicobacter Pylori

3-Hipótesis de trabajo y objetivos

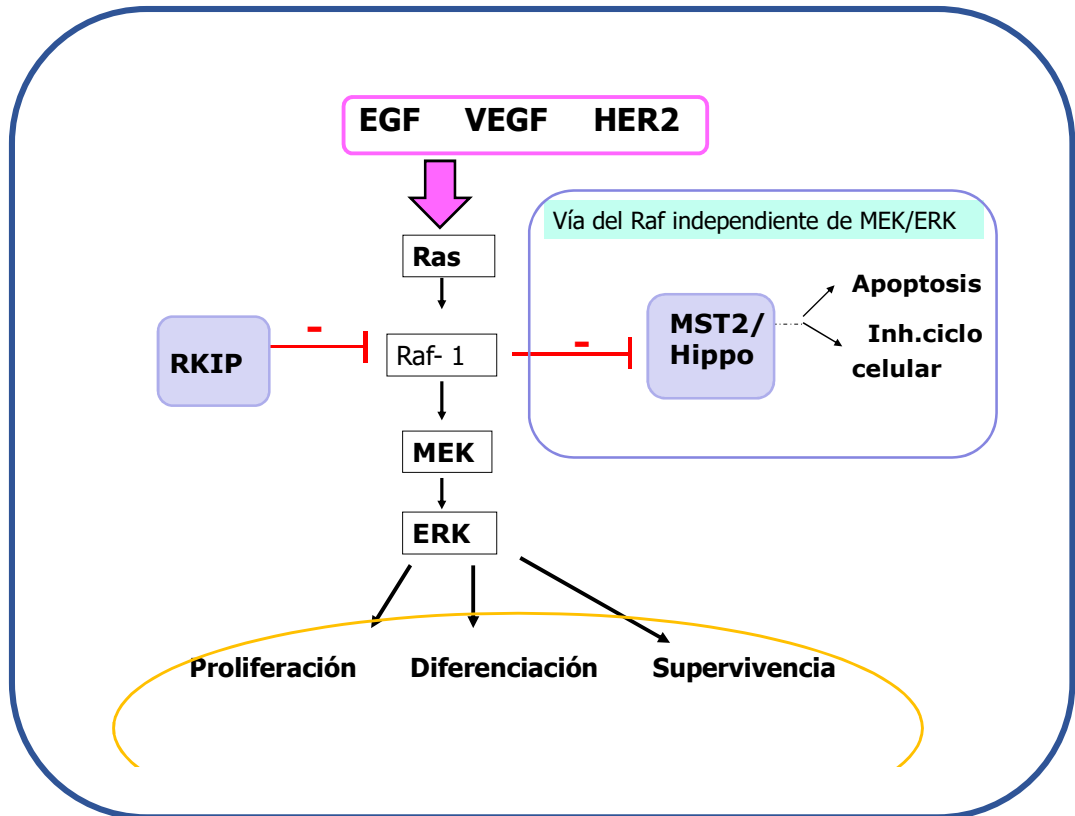
HIPÓTESIS

1. La vía MEK /ERK está excesivamente activada en el cáncer gástrico
2. La hiper activación de esta vía se correlaciona con los estadios más avanzados o con una peor supervivencia
3. La hiper activación puede ser debida a varios mecanismos como son :
 - un aumento de la expresión de factores inductores de la vía como son: EGFR, VEGF o HER2
 - y/ o mutación de miembros de la vía como KRAS y BRAF
 - y / o disminución de la expresión de inhibidores de la vía como RKIP
4. Los niveles de expresión MST2 permitirán evaluar de manera indirecta la activación de la vía .

OBJETIVOS

1. Comprobar que la forma activa de ERK (pERK) y su expresión nuclear (pERK nc) se sobre expresan en los tumores más avanzados.
2. Determinar si la sobre expresión de pERK y/ o de su expresión nuclear (pERK nc) se correlaciona con una peor supervivencia.
3. Evaluar la relación de la expresión de pERK con:
 - a. la sobre expresión de VEGF, EGFR o HER2
 - b. Con la mutación de KRAS o BRAF
 - c. Con la pérdida de expresión de MST2
 - d. con la sobreexpresión de RKIP
4. Determinar si la sobre expresión de los factores inductores de la vía (EGFR, VEGFR, HER2), las mutaciones de KRAS y BRAF o la expresión de los

factores inhibidores de la vía (RKIP) o los niveles de MST2 se correlacionan con una peor supervivencia.



4- Introducción

4.1 Epidemiología

A nivel mundial, las estadísticas del año 2012 muestran que el Cáncer Gástrico representa el quinto tumor más frecuente (tras el cáncer de pulmón, de mama y de colon) y la tercera causa de muerte por cáncer (tras el cáncer de Pulmón y el de Hígado)¹ .

La incidencia varía mucho según las regiones, siendo el área con ratios de incidencia mayor en Asia del este (Corea, Mongolia, Japón y China que es de 40-60/100.000 habitantes. La siguiente área de mayor afectación es Europa Central (35/100.000) seguido de América del Sur (20-30/100.000).

Por lo contrario las zonas de menor incidencia son África 0.6-3/100.000 y Norte América (5-6/100.000)³.

Aun así se estima, que en Estados Unidos en el año 2012, se diagnosticaron 21.320 casos nuevos y el número de muertos por dicho cáncer fue de 10.540 casos.¹

La incidencia varía entre diferentes grupos étnicos en una misma región geográfica. Por ejemplo en EEUU, los hispanos, seguidos de los Afro- Americanos y los indios nativos se ven más afectados que los Caucásicos. Pero no se puede afirmar que se deba solo a una predisposición racial sino que también puede contribuir componentes socioeconómicos. El entorno también influye al haberse observado una disminución del riesgo de CG en poblaciones que emigran desde zonas geográficas de alto riesgo a regiones de bajo riesgo.

En muchas regiones del mundo, se ha observado una disminución de la incidencia en los últimos 50 años. Esto se ha correlacionado con el uso de refrigeradores para conservar los alimentos, el aumento de la ingesta de fruta y verduras, el descenso del uso de sal para conservar los alimentos, la disminución de la infección por *Helicobacter pylori* (HP) y la disminución del hábito de fumar ⁴ .

Pero por el contrario en los últimos 40 años, están aumentando la incidencia de los tumores de cardias en hombres blancos tanto en población de Occidente (Europa y en USA)⁵.

Incidencia en España

En nuestro medio disponemos de la información Europea recogida en el registro EUROCARE. Este es el registro poblacional de cáncer más grande de Europa⁶.

En España se registraron 157.149 casos entre el año 2000 y el 2007. Pero estos datos de incidencia hay que tomarlos con cautela puesto que los datos de España proceden de los registros de Navarra y Tarragona. Solo cubre el 17% de la población cuando la media de los países de Europa del Sur (en los que estamos incluidos) es del 36% y muy alejados de los registros de las demás regiones Europeas (Europa del Norte 100%, UK- Irlanda 100%, Europa del Este 52% o Europa Central 35%).

Por la escasez de cobertura de nuestro registro, no nos permite comparar nuestra Incidencia con el resto de los 29 países que participan en el EUROCARE.

Supervivencia

Según los datos de la WHO, la mortalidad por Cáncer está disminuyendo en Europa desde el año 2000. Esto es debido a que la Supervivencia de los pacientes diagnosticados de Cáncer está aumentando en general y el descenso es mayor entre los años 2005-2009⁷. Si bien existen diferencias entre países, esta está mejorando en global⁶.

En cuanto al Cáncer gástrico, la supervenida relativa a 5 años de media en Europa es del 25.1%.

Estos resultados son muy diferentes a los casos que tienen una mejor supervivencia como son: cáncer de testículo (88.6%), de labios (88.15%), tiroides (86.5%), melanoma (83.2%) o el de cáncer de mama (81.8%). El Cáncer gástrico se encuentra a la cola de los 46 tipos de cáncer recogidos. Y en concreto se sitúa en el octavo lugar de los de menor supervivencia, sólo superados por ejemplo por el colangiocarcinoma (18%), cáncer de pulmón (13%) esófago (12%) y páncreas (8%).

La supervivencia por cáncer gástrico varía entre hombres y mujeres, y por zonas geográficas dentro de Europa. Así por ejemplo es significativamente menor en Holanda y Dinamarca ($p < 0.0001$) rondando el 16%, y es más elevada en Europa Central (28.1%) y sobre todo en Europa del Sur (29.6%)⁶

No se conocen exactamente, a que se deben estas aferencias pero se ha postulado que puedan deberse a diferencias en el estadio al diagnóstico, al acceso al cuidado especializado, la intensificación en el diagnostico como por ejemplo las políticas de screening pero muy posiblemente tenga un papel muy relevante la biología del cáncer.

La supervivencia en Europa del Sur está mejorando, pasando de 23.3% en el periodo de 199-2001 a 25.1% en 2005-2007⁶.

España tiene por tanto una supervivencia superior a la media Europea (25.6%) y algo inferior a los países colindantes (Italia 32.6% y Portugal 31.8%).

De los datos de la WHO, parece que la muerte por Cáncer gástrico representa la quinta causa de muerte por Cáncer en España (21.79/ 100.000 habitantes) , detrás de cáncer de colon, mama , pulmón y páncreas⁷. Si bien hay que resaltar que al menos tres de ellos, la incidencia es mucho mayor.

4.2 CG

Factores de riesgo

La causa etiológica del CG es multifactorial. Entre ellas se encuentran causas infecciosas principalmente relacionados con el HP pero también se ha sugerido por VHB, causas relacionadas con el entorno y otras relacionadas con el huésped como son los polimorfismos genéticos o el CG familiar y por ultimo otras causas predisponentes son la anemia perniciosa, síndrome Menestrier o *muñón gástrico* .

- **Infecciones :**

Helicobacter Pylori (HP)

Desde 1994 el HP está reconocido como carcinógeno tipo I del cáncer gástrico. Se asocia tanto a los tumores de tipo difuso como de tipo intestinal. Se ha relacionado con el 77% del CG distal, pero la relación con el cáncer de cardias es mucho menor.

HP produce una inflamación aguda y crónica que conlleva una alteración del epitelio del estómago induciendo la transformación maligna. Los mecanismos de carcinogénesis que se le han atribuido son:

- la alteración de la oxidación del DNA y las mutaciones
- hipermetilación del DNA con silenciación de genes supresores

Esta capacidad de carcinogénesis depende, por un lado del tipo de la cepa bacteriana y por otro lado, está en relación con factores del huésped como se describe a continuación.

Factores relacionados con la cepa bacteriana:

- Las cepas más virulentas producen Cag A. Es una proteína oncogénica que es transferida a las células epiteliales, produciendo así un aumento del riesgo de formación de lesiones premalignas y CG⁸. Los diferentes mecanismos oncogénicos de Cag A se basan en: ruptura de unión intercelular del epitelio, alteración de la polaridad de las células epiteliales, aumento de la proliferación disminución de la apoptosis⁹.
- Otro gen de HP asociado a la transformación es VacA que codifica la síntesis para una toxina que produce un aumento de la mitosis y un aumento de la apoptosis de células epiteliales. Se ha observado que algunas variantes genéticas de VacA están asociadas con mayor riesgo de CG¹⁰
- Otras cepas presentan alteración de los genes que codifican para moléculas de adhesión como BabA¹¹

Factores relacionados con el huésped:

- Menos del 1% de individuos infestados por HP desarrollarán un CG. Además se han objetivado que regiones del mundo con una incidencia de infección por HP muy alta, pero que presentan baja incidencia de CG tal y como sucede en África.

VEB

Se ha observado una incidencia de infección por VEB en el 9-16% de los CG. Por ello se ha propuesto la posibilidad de que el VEB pudiera tener un papel en su etiología, aunque esta relación no ha quedado confirmada. Lo que si se ha observado es que Los CG con VEB son más frecuentes en hombres que en mujeres y más frecuentes en cardias – cuerpo que en los tumores de antro. Sin embargo un estudio reciente muestra que la infección por VEB sería un factor de buen pronóstico¹².

• Entorno

Tabaco

Se ha demostrado que el tabaco es un factor de riesgo claro para la gastritis, úlcera, metaplasia y para el CG distal y proximal. Se considera que el 18% de los CG están relacionados con el habito tabáquico aunque esta relación es 2 veces mayor en el CG de cardias que en el distal. Además existe una interacción positiva entre el tabaco y la infección por HP¹¹.

Ingesta de sal

La sal tiene una acción directa sobre la mucosa gástrica y la reparación necesaria de la misma, produce un aumento de la proliferación celular de la misma. También existe una interacción con el HP al haberse demostrado en estudios in vitro, que el cultivo de cepas de Hp en medios ricos en sal, se produce un aumento de la expresión de la oncoproteína Cag a, que como ya hemos comentado convierte a la cepa en más virulenta.

Dieta mediterránea

Según los datos del estudio de Cohortes EPIC, las dietas ricas en frutas y verduras parecen disminuir el riesgo de padecer CG¹³. Sin embargo se ha visto que en la población europea, existe una asociación entre la ingesta de carne y el riesgo de presentar CG distal, especialmente en pacientes con infección por HP¹³.

Alcohol

Se ha propuesto una relación entre el consumo de alcohol y el aumento del riesgo de CG pero esta correlación no parece consistente entre los hallazgos de diferentes estudios. Sin embargo un meta- análisis realizado muestra una alta correlación entre elevado consumo de alcohol y CG¹⁴

- **Huésped**

Polimorfismos genéticos (PG)

Se han correlacionado diversos PG con el riesgo de CG. La mayoría de ellos son genes relacionados con la inflamación como los genes que codifican la síntesis de citocinas IL β 1 y TNF α . Estas citocinas producen una disminución de la producción de ácido gástrico y favorecen la extensión de la infección por HP desde el antro hasta el fundus, extendiendo así la gastritis atrófica y el riesgo de CG.

Se ha demostrado que los sujetos portadores del alelo IL β 511T, producen altos niveles de IL-1 β . Diferentes estudios lo han correlacionado con aumento del CG tipo intestinal en la población caucásica pero no en la asiática^{15,16}.

Así mismo los portadores de IL1RNR en población no asiática, presentan un mayor riesgo de presentar adenocarcinomas de tipo intestinal de predominio distal¹⁶

Los estudios genómico completos que se están empezando a realizar ahora permiten estudiar miles de polimorfismos de manera simultánea. De esta manera se han detectado diferentes locis de mayor susceptibilidad en relación con el CG que ahora se podrán estudiar¹⁶.

CG familiar

Cuando existe historia familiar, el riesgo de CG es de 2 a 10 veces mayor, si bien o es por una alteración genética sino por compartir los mismos factores de riesgo ambientales como la infección por HP o la dieta ¹³.

Pero existen diferentes síndromes hereditarios con asociación con el CG como por ejemplo: síndrome de Lynch, Poliposis familiar adenomatosa, síndrome de Li-Fraumeni, Síndrome de Peutz Jeghers.

El Cáncer gástrico difuso hereditario es un síndrome autosómico dominante que representa del 1- 3% del CG familiar. Se debe a mutaciones en el gen CDH1 (E-cadherina). Estas mutaciones producen un defecto en la función de la proteína. El ser portador de una de estas mutaciones, produce un riesgo de padecer CG del 70-80% por lo que se recomienda la gastrectomía profiláctica a los 20 años de edad ¹⁷.

Otras causas:

Se han relacionado con el aumento de riesgo de presentar un CG a la anemia perniciosa, Síndrome de Menestrier y el poseer un muñón gástrico tras una gastrectomía por otras causas.

- **Prevención :**

En la prevención se ha propuesto la ingesta de dietas ricas en frutas y verduras, evitar los excesos de sal y la exposición al tabaco.

Algunos estudios han recomendado tratamiento para erradicar la infección por HP cuando existe gastritis puesto que se ha visto que esto disminuye el riesgo de transformación d lesiones pre malignas y el riesgo de CG^{18,19}

No obstante, otras escuelas han propuesto no realizar tratamiento por el riesgo de producir HP resistente o infección por otras bacterias y se piensa que su uso indiscriminado ha producido el aumento de incidencia de reflujo gastro- esofágico, y en los casos de esófago de Barret, el aumento de la incidencia de tumores de la unión gastro- esofágica.

Lo que se propone es el seguimiento estricto cuando se detectan lesiones precancerosas. La frecuencia de estos controles se basa en el riesgo que se ha establecido de desarrollar un CG a los 10 años posteriores. Este riesgo es de 0.8%

en caso de atrofia gástrica hasta un 33% en el caso de displasia de alto grado¹⁹. Se han propuesto diferentes algoritmos consensuados internacionalmente para los seguimientos de estas lesiones

Tipos histológicos

Existen diferentes clasificaciones histológicas como la de Lauren, la de WHO²⁰ o la Japonesa²¹.

En el tipo histológico más frecuente, los adenocarcinomas, la clasificación más utilizada es la de Lauren. Esta identifica 2 subtipos con características clínicas y epidemiológicas diferentes: el tipo intestinal y el tipo difuso. Una pequeña proporción de casos puede compartir ambos subtipos (tipo mixto)²².

Tipo intestinal

El adenocarcinoma de tipo intestinal es precedido por una secuencia de lesiones histológicas con características bien definidas denominada La Cascada de Correa que consiste en: gastritis no atrófica, gastritis atrófica multifocal sin metaplasia, metaplasia intestinal de tipo completo, metaplasia intestinal de tipo incompleto y displasia hasta finalmente formar el adenocarcinoma. Se ha visto que la infección por HP puede desencadenar esta cascada.

Este tipo es el más frecuente en las zonas de alto riesgo de CG.

Existen un subtipo coloide (mucinoso) que puede ser tanto de tipo intestinal como difuso²² pero las células mucinosas deben representar > 50% de las células totales.

Tipo Difuso

Se observa en personas más jóvenes y no se ha observado diferencias entre sexos. Los adenocarcinomas con células en anillo de sello representan un subtipo, y deben presentar más del 50% de las células de este tipo para denominarse así²⁰.

Tipo mixto

Una combinación de los anteriores.

Localización del tumor

Clásicamente se han diferenciado dos localizaciones: proximal y distal. Además de las diferencias anatómicas, se consideran que estas localizaciones son realmente dos entidades diferentes con características clínicas y epidemiológicas diferenciadas.

Proximal:

Es la denominada inicialmente proximal y que anatómicamente comprende la región de 1 cm distal a la unión escamosa – columnar pero cuya definición ha ido evolucionando y actualmente se considera como cardias (o unión gastro – esofágica). Así por ejemplo, la 7ª edición de la clasificación TNM define como tumores de la unión gastro- esofágica (cardias) a los tumores de la unión y los 5 cm proximales de la cavidad gástrica²³.

La incidencia está aumentando en los países Occidentales, especialmente en la población caucásica. Se cree que está relacionada con el reflujo gastro- esofágico pero no con la infección por HP.

Parece presentar un peor pronóstico puesto que la invasión mural suele ser más profunda y presenta más frecuentemente invasión ganglionar, que son los factores pronósticos validados. Así por ejemplo la supervivencia media a 5 años en USA, de una CG proximal es del 14% frente al 26% de los tumores dístales⁵.

Distal:

Se denomina así al resto del estómago. Frecuentemente subdividida en cuerpo y antro.

Factores pronósticos

El único factor pronóstico claramente establecido y que se utiliza en la práctica clínica, es el estadio como viene recogido en la clasificación TNM (^{23,24 25}).

Tras el análisis de series largas, se han propuesto otros factores como es por ejemplo el tipo de cirugía. Pero cuando el análisis de factores pronósticos, se restringe a series de pacientes con resección con intención curativa, el tipo de cirugía pierde el valor pronóstico y por tanto parece que el supuesto valor pronóstico podría deberse más al tipo histológico, que es lo que realmente indica el tipo de cirugía a realizar²⁴

Se ha propuesto que los tumores difusos podrían tener un peor pronóstico, pero puede ser debido a que estos tumores tienen mayor predilección por afectar las áreas ganglionares, por lo que frente al estadio no tienen un valor pronóstico²⁶⁻²⁸. Otro factor propuesto es el subtipo células en anillo de sello. Si bien los hallazgos en diferentes estudios tienen resultados contrarios. Su incidencia es baja (entorno al 12-15%) pero cuando en el análisis, se consideran sólo los tumores avanzados, parece adquirir un valor pronóstico aunque las diferencias encontradas muchas veces no alcanzan la significación estadística ²⁴.

Tratamiento adyuvante

A pesar de que los pacientes puedan ser sometidos a una cirugía radical con una linfadenectomía extensa (D2), la supervivencia a 5 años está en torno a 30-35% en centros especializados^{2,29}. Por ello se han valorado diferentes estrategias de tratamiento adyuvante. En el mundo Occidental, el esquema de tratamiento adyuvante mayormente aceptado es la combinación de quimio- radioterapia basada en 5 Fluorouracilo. Esto se basa en los resultados del Ensayo fase III, denominado comúnmente Esquema Macdonald.³⁰ En este estudio se incluyeron 556 pacientes que tras una cirugía radical, tenían estadios Ib-III y se randomizaron a recibir el tratamiento combinado frente a la rama control. El tratamiento adyuvante demostró una mejoría clara de la SG a 5 años que pasó de 27 a 36 m con un HR 1.35 (CI 0.9-1.6, p 0.005). Desde ese momento se consideró un tratamiento estándar en la adyuvancia de CG.

Biología Molecular del CG esporádico

- Las diferentes causas, la incidencia así como el diferente curso clínico muestran que el CG es una entidad muy diversa y compleja ³¹ y esto se traduce lógicamente en una heterogeneidad en sus bases moleculares. Diferentes vías de señalización intracelular se han mostrado como causantes de esta patología y esto se produce tanto por alteraciones genéticas como epigenéticas. Las vías la familia de EGFR, FGFR y en definitiva la vía PI3k/ AKT/mTOR y la vía RAS/RAF / MEK (^{32 25,33}). Estudios completos del perfil de expresión génica entre células de

adenocarcinoma gástrico y células del tejido gástrico normal, muestran diferencias en la expresión de más de 2.500 genes. Esto explica que existan muchos patrones de expresión génica diferentes en el CG³⁴ y es

una demostración más de la heterogeneidad de este tumor. Basándose en estos diferentes de expresión génica y cruzándolo con las características patológicas y epidemiológicas, M. Shah propuso 3 subtipos: el proximal, el difuso y el distal no difuso³⁵. El Tipo 1 (tipo proximal) se caracterizaría por carcinoma de tipo intestinal con sobre expresión muy frecuentemente de HER2 y estaría relacionado con la inflamación y el reflujo. El Tipo 2 (difuso) tendría una sobre expresión de Her2 infrecuentemente y no estaría relacionado con la inflamación. El último tipo, Tipo 3, presentaría frecuentemente sobre expresión de Her2 y su etiología estaría relacionada con la inflamación por HP. Aunque estos subtipos comparten muchos genes, existen otros genes con un índice de expresión diferente como PSCA (prostate stem cell Ag), PGA3 (pepsinogeno A) y TRIM 32.

- Un estudio posterior publicado en el 2014 dentro del Proyecto Gene Atlas Research Network, que estudia más de 295 muestra de cáncer gástrico y combina estudios secuenciación completa del genoma, con estudios del perfil de metilación del DNA, secuenciación de micro RNA y del RNA mensajero. Este estudio dibuja otros cuatro subtipos moleculares, que no se solapan con la clasificación anteriormente propuesta. En esta nueva clasificación no se encuentra diferencias en la distribución geográfica entre los subtipos ni en la supervivencia, pero sí que existen diferencias en la distribución anatómica del tumor. Las diferencias entre los subtipos serían las siguientes:
 - - subtipo VEB: representa el 9% de los tumores y se caracterizarían por las hipermetilaciones del promotor, amplificaciones frecuentes de diferentes genes (JAK 2, LDL1y 2) y mutación frecuente de PI3K
 - - subtipo MSI(inestabilidad de microsatélites): 22% con múltiples mutaciones, entre ellas la del MLH1
 - - tumores estables: 20%. Frecuentemente de patrón histológico difuso. Suelen ser adenocarcinomas de tipo intestinal, con mutación de p53 frecuente y activación de la vía del RAS.

Podemos concluir, que a pesar de la información facilitada por estos estudios más recientes y complejos, que intentan identificar el genotipo completo de los carcinomas gástricos, aun no disponemos de la identificación e imagen completa de estos tumores. Si bien estos trabajos coinciden a la hora de identificar algunas características en los diferentes subgrupos propuestos la heterogeneidad de estos tumores y el papel en su desarrollo de vías intracelulares específicas, entre ellas la vía de ERK/ PERK^{3236 37}, aún quedan por determinar.

4.3 Vía ERK/ MERK

Esta vía está relacionada con³⁸:

- proliferación
- diferenciación
- supervivencia
- angiogénesis
- adhesión
- migración

MEK= (Mitogen Extracelular Kinase) (ERK= extracellular signal Related Kinase)

Esta vía esta hiper regulada en el 30% de los canceres.

La vía Ras/ Raf/ ERK / MERK es una Familia de las serina/treonina protein quinasas citosólicas. Se considera una cascada lineal donde Ras es el primer activador de la cadena (upstream) y MEK el último sustrato (downstream).

Esta vía se activa por unión de factores de crecimiento a sus receptores de membrana como: EGF, VEGF, PDGF, TGF. La unión de uno de estos factores a su receptor (RTK), activa la parte intracelular y está activa a Ras. Este se une a RAF y produce a su vez, su activación. Y esto desencadena 2 mecanismos diferentes: el mecanismo relacionado con MEK/ERK y el independiente.

4.31. Mecanismo relacionado con MEK/ERK:

La unión de Ras a Raf (a cualquiera de sus isoformas: Raf-1, A-raf, b-raf) y produce el transporte de este complejo a la membrana celular con la fosforilación y activación de la isoforma Raf (excepto b-Raf que tiene la propiedad de autofosforilarse el solo). Cuando se activan, fosforilan a MEK que al activarse fosforila a ERK y esta actúa sobre más de 50 sustratos en el citosol o en el núcleo como por ejemplo:

- p90RSK: modifica factores de transcripción e histonas
- factor de transcripción como HIF(factor inducible por hipoxia)
- quinasas relacionadas con ciclo celular: Mdm2, p27, ARF...

En general produce proliferación y supervivencia por lo que si esta vía esta sobre regulada en cáncer favorece la tumorigénesis y la progresión celular.

4.3.2. Mecanismo independiente de MEK/ERK:

La activación de Raf 1, en este caso, tiene un efecto de control sobre la apoptosis y de control sobre el ciclo celular. No se conocían bien el mecanismo que lo hacían³⁹. Se han propuesto diferentes actuaciones como:

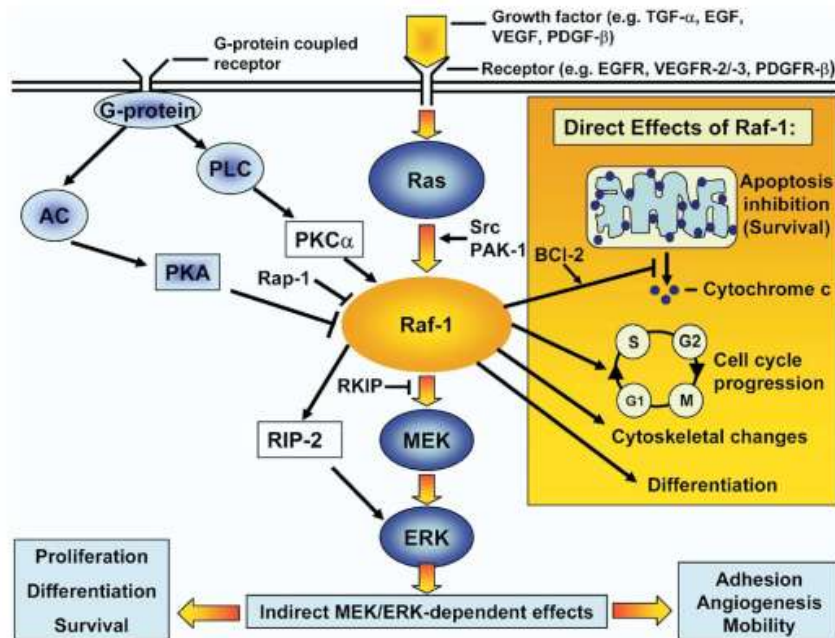
1) inhibe la vía intrínseca de la apoptosis. Para ello se requiere su translocación a la mitocondria (no se conocen los mediadores).

- La regulación de la vía intrínseca de la apoptosis radica en el control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Cuando la vía intrínseca de la Apoptosis, se activa, produce un daño de la membrana mitocondrial con la subsiguiente liberación de Citocromo C y otras sustancias al citosol. Esta liberación produce la activación de la vía de las caspasas y esto lleva a la muerte celular⁴⁰.
- La integridad de la membrana mitocondrial está regulada por un balance entre los factores apoptoticos (BAX, BAK) y los de factores anti- apoptóticos (como Bcl 2y otros⁴⁰.
- La activación de Raf-1 produce la dimerización con Bcl- 2 y conlleva la activación de la función antiapoptóticas de bcl-2³⁹. y evita la liberación de Citocromo C (por mecanismo dependientes de quinasa) y por tanto la muerte celular.

2) Induce el ciclo celular a través de Cdc25, Rb y p53³⁹.

3) tiene efectos sobre el cito esqueleto

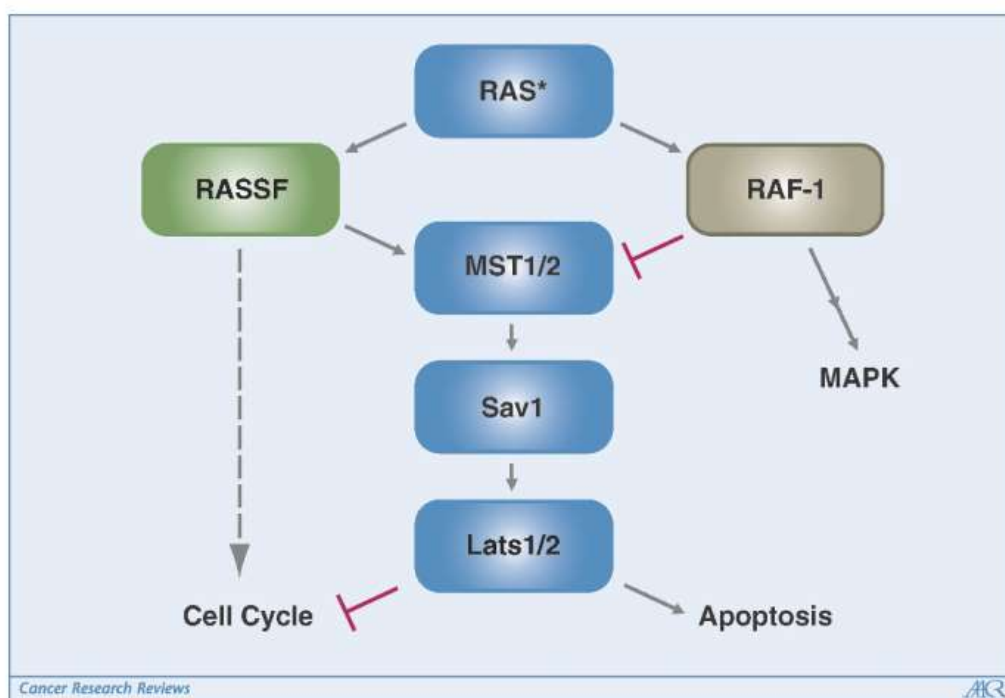
4) induce la Diferenciación celular



Más recientemente, se ha descrito en estudios en *Drosophila*, una **vía intracelular Hippo** cuya activación promueve la Apoptosis y la inhibición del ciclo celular. Esta vía está conservada en todas las especies y en mamíferos, el primer eslabón es el factor MST2⁴¹. Es sólo en los últimos tres años, en se han descrito los componentes de toda la cascada y su función. Así se ha visto que se activa una cascada de kinas que fosforilan a YAP que es un factor de transcripción. Al ser fosforilado, impiden su internalización al núcleo y su actividad de transcripción de genes diana controladores de la supervivencia e inductores del ciclo celular. Por lo tanto la activación de MST2 promueve la apoptosis y el paro del ciclo celular.

En el momento de la elaboración de este proyecto, sólo se conocía que Raf1 inter actuaba con MST2 en ausencia de factores de crecimiento o de mutaciones de KRAS. Dicha activación de RAF-1, impedía la dimerización de MST2 y por tanto su actividad⁴². Por ello se estaba postulando que esta interacción entre raf1 y la vía Hippo podía ser el mecanismo principal de actuación de la denominada vía MEK/ERK independiente pero todavía no había publicaciones donde se evaluara la expresión de este factor en cáncer. Posteriormente se empezaron a publicar los primeros trabajos en diferentes tumores como cáncer de colon o próstata, donde se describía una

disminución de expresión de MST2 en tejido tumoral frente a tejido normal^{43,44} pero no había datos en CG.



4.3.3 Alteraciones de la vía Ras/ RAF / MEK /ERK en cáncer Gástrico

En otros tumores se han propuesto diferentes alteraciones moleculares que pueden ocasionar hiper activación de esta vía. Los iremos revisando detalladamente, especificando si hay alguna evidencia de dichas alteraciones descritas en CG.

EGFR

La activación del EGFR en modelos preclínicos produce un aumento de la agresividad tumoral y la desregulación de esta vía se puede deber a sobreexpresión, amplificación o mutación como se ha objetivado en diferentes tumores. Por ello, en la última década los inhibidores de EGFR se han empezado a utilizar y forman parte del arsenal terapéutico en el tratamiento de diferentes tumores (pulmón, colon, mama). En CG se han descrito sobreexpresión en un 42%- 80% y una amplificación entorno al 13% de los casos^{45, 46, 47}. En algunos trabajos se ha correlacionado con la supervivencia aunque su valor pronóstico no se ha confirmado, dado que los resultados son contradictorios entre diferentes series^{45, 48}.

VEGF

Hay diferentes pasos necesarios que las células tumorales tienen que superar para la progresión tumoral y formación de metástasis, como son: la angiogénesis, la invasión

vascular, la supervivencia en torrente sanguíneo, la extravasación y proliferación en el tejido alcanzado. La familia VEGF (formada por diferentes factores VEGF A- E y receptores VEGFR) ha mostrado ser el estímulo más importante para el control de la angiogénesis, produciendo proliferación de células endoteliales, motilidad y permeabilidad. El VEGF- A y VEGFR se encuentran expresados en células endoteliales pero se ha comprobado su sobreexpresión en diferentes líneas tumorales. En CG se han descrito sobreexpresión en un porcentaje muy alto de tumores pero su correlación con la supervivencia tan poco se ha establecido claramente ⁴⁹⁻⁵¹.

HER2

La activación de este receptor de membrana está implicado en la proliferación, adhesión, migración y diferenciación tumoral y por ende claramente relacionado con la tumorigenesis en diferentes tumores. En CG su sobreexpresión o amplificación se ha demostrado en un 7- 34% de tumores ⁵² y se ha correlacionado con tumores más avanzados^{53,54} aunque no claramente con la supervivencia. El uso de un inhibidor, el trastuzumab ha demostrado su utilidad en cáncer de mama y también lo ha demostrado en CG ⁵⁵ lo que confirma el papel de HER2 en la proliferación tumoral. Si bien no se ha podido comprobar que tenga un valor pronóstico.

KRAS

Hace más de 15 años, que se demostró que la Mutaciones o alteraciones de KRAS podían producir un crecimiento incontrolado de las células al ser independiente de la activación de la vía por los factores de crecimiento y ser una de las causas de la tumorigenesis. Pero también está implicado en la proliferación y control de la angiogénesis y por ello el estudio de como moldearlo ha sido durante mucho tiempo uno de los principales objetivos en el tratamiento del cáncer⁵⁶. Las mutaciones de KRAS se han demostrado en muchos tumores, siendo los principales entre otros en el cáncer de páncreas, colon y pulmón. En el momento de plantear este estudio, apenas disponíamos de datos publicados en CG ⁵⁷.

BRAF

Con el mismo mecanismo de actuación, se ha correlacionado la mutación de BRAF con diferentes tumores como por ejemplo melanoma. Su existencia en el CG tan poco había sido estudiada ⁵⁸.

RKIP

Se ha descrito como inhibidor endógeno de la vía de MEK/ERK a nivel de la fosforilación de MEK por Raf-1^{59 60}. Más recientemente también se ha visto que es capaz de bloquear la vía de NFkB⁶¹.

Esta expresado de manera general en todos los tejidos, pero se⁴⁸ ha comprobado una disminución de su expresión en tumor frente a tejido normal en carcinomas de colon, próstata⁶², mama⁶³ y hepatocarcinoma. Una expresión baja de RKIP se ha correlacionado con la recidiva en cáncer de próstata⁶².

En cáncer de colon estadio Dukes C, se vio que aquellos tumores que expresaban RKIP tenían una supervivencia similar a la de estadio iniciales (Dukes A y B) mientras que los que tenía una expresión leve o no expresaban RKIP tenían una supervivencia muy baja, independientemente de otros factores pronósticos⁶¹. En el momento de plantear este estudio, no existían publicaciones que analizaran la expresión de este factor en CG.

5. Material y Métodos

5.1 Material

5.1.1 Pacientes

En la búsqueda de poder analizar factores pronósticos del Cáncer Gástrico localmente avanzado, no metastásico, consideramos que era muy importante que la serie de pacientes fuera homogénea en cuanto al tratamiento recibido para no producir ningún sesgo que pudiera alterar los resultados. Por ello seleccionamos los pacientes que hubieran realizado el tratamiento que en nuestro medio consideramos estándar. Esta es la cirugía radical con resección completa (R0) seguido de tratamiento adyuvante con el esquema de quimio radioterapia basada en 5- Fluorouracilo, denominado esquema de MacDonald.

Dicho tratamiento, desde la publicación en 2001 del estudio randomizado que incluyó 556 paciente afectos de estadio s IB-III de adenocarcinoma gástrico o de la unión esófago- gástrica con resección completa, mostró que el tratamiento adyuvante aumentaba claramente la supervivencia global de los pacientes frente a la rama de observación. La mediana de supervivencia fue de 36 meses frente a 27 meses en la rama de observación con una clara significación estadística ($p = 0.005$) y un RH de 1.35 (CI 1.09-1.66)³⁰, y hoy por hoy se considera el tratamiento estándar en Occidente (EEUU y muchos países Europeos). Dicho tratamiento se instauró en nuestro centro en 2003, y por ello nos planteamos analizar nuestra serie de pacientes con estadio Ib a III intervenidos de adenocarcinoma gástrico con una resección completa desde esa fecha.

5.1.2 Material de estudio e IHQ

Se recuperó los bloques tumorales parafinados de dichos pacientes, deseleccionando las zonas tanto de tumor primario, zona de tejido gástrico normal y zonas de ganglios afectos en los casos que las tuvieran afectos, para poder realizar las matrices tisulares (TMA, del inglés tissue micro array).

5.2 Métodos

5.2.1 Estadía de los pacientes

Los pacientes tras ser diagnosticados en nuestro centro de adenocarcinoma gástrico o cuando son diagnosticados fuera del centro pero remitidos al mismo para valorar tratamiento, se les realiza un estudio de extensión. Dicho estudio comprende la realización de TC abdominal y radiografía de tórax y analítica de sangre completa con marcadores tumorales. Si no se objetiva enfermedad a distancia y el paciente no presenta contraindicaciones médicas o quirúrgicas para la intervención, se procede a ella. Previa a la realización de la resección, se practica una laparoscopia diagnóstica para descartar diseminación peritoneal.

5.2.2 Factores Pronósticos

En el CG localmente avanzado no metastásico los factores pronósticos claramente establecidos son los que recogen la clasificación TNM, es decir la T: profundidad de afectación de la pared gástrica por el tumor y la afectación o no de los ganglios regionales^{21,64}. Otros muchos factores clínicos o patológicos aparecen en muchas series como factores pronósticos, aunque no se suelen confirmar en otras series. Nos propusimos también analizarlos, y son los siguientes:

- Edad
- Sexo
- Clasificación Lauren
- Invasión neural
- Invasión vascular
- Células anillo de sello
- Localización anatómica

5.2.3 Elaboración de las matrices tisulares (TMA)

A partir de tejido tumoral fijado en formol e incluido en parafina de tumores gástricos se ha realizado una tinción con hematoxilina y eosina (H&E) para valorar el contenido tumoral, la necrosis y la calidad global, seleccionándose áreas representativas de

tumor y tejido normal. A partir de éstas se ha obtenido, para cada paciente, 4 cores de un diámetro de 1mm² de tejido, de los cuales 3 correspondían a tejido tumoral y uno a tejido normal. Se han confeccionado 4 TMAs, (20 pacientes/TMA). Mediante microtomía, de cada TMA se han obtenido 6 secciones de tejido, de 4-6µm de grosor. Una sección se ha teñido con H&E para valorar la cantidad y calidad final del área de tumor incluida, mientras que las otras 5 se han usado para los ensayos de FISH, IHQ e inmunofluorescencia múltiple.

5.2.4 IHQ

Para la realización de las tinciones, seguimos el protocolo estándar de avidina- biotina inmuno peroxidasa⁶⁵, que consiste en:

- Secciones de tejido desparafinado de 5- µm
- Inclusión del antígeno y lavado durante 15 minutos en 10 mmol/L buffer de citrato
- tratamiento con suero normal al 10% durante 30 minutos, seguido del Anticuerpo primario e incubación toda la noche a 4° C
- inclusión del anticuerpo secundario durante 30 minutos
- Incubación con Inmunoglobulinas biotinuiladas durante 30 minutos seguidas complejo avidina- biotina pro 30 minutos
- Adición de daiminobenzidinas como cromógenos y Hematoxilina como contraste nuclear.
- Lectura bajo microscopio de luz estándar

Los anticuerpos utilizados fueron:

- ERK: p44/42 MAPK Erk1/2 (Cell Signaling, Beverly, MA)
- pERK: Phospho-p44/42 MAPK Erk1/2 Thr202/Tyr204 (Cell Signaling,Beverly, MA).
- EGFR: EGFRpharmDX), y en una segunda fase, mediante el anticuerpo CONFRIM ANTI-EGFR (3c6), IDV (Ref. 5278341001, Roche Diagnostics, SL)
- VEGF: VEGF (Abcam, Cambridge, UK).
- Her2neu : IHC, Herceptest™ se analizó por duplicado, en una primera fase utilizando el kit Herceptest™ (Dako), y posteriormente, mediante el PATHWAY anti-HER-2/neu (4B5) Rabbit Monoclonal PAb (Ref. 5278368001, Roche Diagnostics SL)

- MST2: STK3 (MST2) (Abcam, Cambridge, UK).
- RKIP: PBP antibody (EPR2875Y) (Ref. ab76582, Abcam)

La inmunoreactividad a cada anticuerpo se clasificó considerando por un lado la intensidad: (=: negativo, 1: bajo, 2: moderado, 3: alto) y el porcentaje de células teñidas. Se consideró positivo, cuando al menos el 10% de las células estaban teñidas con una intensidad ≥ 1 . En el caso de MST2 sólo se consideró positivo cuando la intensidad era de 2. En el caso de HER2 , se consideraron positivo los caso con intensidad débil completa o de toda la membrana baso lateral en >10% de las células (score 2+) o los casos con una intensidad moderada o alta completa o de toda la membrana baso lateral en >10% de las células(score 3+) siguiendo el Consenso del score HER2 en Cáncer gástrico⁶⁶.

5.2.5 FISH

La hibridación *in situ* fluorescente utiliza moléculas marcadas con fluorescencia para localizar y analizar regiones específicas de ADN.

La técnica consiste utilizar pequeños fragmentos de ADN de una sola hebra, denominados sondas, complementarios a las secuencias de ADN objeto de estudio en la muestra problema. Las sondas, mayoritariamente comerciales, pueden estar marcadas con distintos fluorocromos y combinarse para detectar varias regiones en un mismo proceso.

En la FISH sobre tejido parafinado la sonda se introduce en el núcleo interfásico de las células del corte de tejido fijado e incluido en parafina. El valor de la prueba se basa en detectar la presencia o ausencia, su localización y/o el número total de señales de una determinada sonda o una sonda respecto a otra. De éste modo la técnica permite detectar la pérdida, ganancia, amplificación o reordenamiento de genes o loci específicos.

En una primera fase, se trata el corte tisular de la muestra problema mediante digestión enzimática para eliminar la matriz extracelular presente en el tejido y permitir que la sonda penetre en el núcleo. Posteriormente se procede a desnaturalizar el ADN, separando las hebras complementarias que forman la doble hélice, de forma que al añadir la sonda, ésta hibrida con la zona de ADN que le es complementaria, pudiéndose detectar la señal mediante un microscopio de fluorescencia.

La técnica de FISH se realizó sobre secciones sin teñir de los TMAs, siguiendo los protocolos estandarizados facilitados por los laboratorios que comercializan estos kits.

Brevemente, las secciones fueron incubadas a 60°C durante la noche. Posteriormente fueron desparafinizadas e incubadas en 10mmol/L de citrato sódico (pH 6). El desenmascaramiento antigénico se realizó en olla a 120°C durante 20 minutos. Después se realizó la digestión del tejido con pepsina-HCl durante 8 minutos a 37°C. Las muestras fueron deshidratadas y las sondas fueron aplicadas directamente a las preparaciones. Se utilizó un corte individual de cada muestra para la evaluación del número de copias génicas de EGFR y PTEN. Las muestras fueron desnaturalizadas a 80°C durante 4 minutos usando una cámara de hibridación automatizada, y luego incubadas toda la noche a 37°C. Tras dos lavados con tampón posthibridación (2×SSC-0,3% NP-40, pH 7,2) durante 2 minutos a temperatura ambiente y 2 minutos a 73°C, respectivamente, el núcleo de las muestras fue contra teñido con DAPI I (1000 ng/μL, Vysis).

Las sondas utilizadas fueron:

- HER2: PathVysion HER2 DNA Probe Kit (Vysis, Inc). El kit incluye una sonda centromérica, marcada en fluorocromo de color verde (SpectrumGreen), que permite cuantificar el número de cromosomas 17 por núcleo, y una sonda que hibrida con el gen HER-2/neu, marcada en fluorocromo naranja (SpectrumOrange), que permite determinar el número de copias del gen.
- EGFR: LSI EGFR/CEP 7 dual colour probe (Vysis, Inc). El kit incluye una sonda centromérica, marcada en fluorocromo de color verde (SpectrumGreen), que permite cuantificar el número de cromosomas 7 por núcleo, y una sonda marcada en fluorocromo rojo (SpectrumRed) que hibrida con el gen EGFR y permite determinar el número de copias del gen por núcleo analizado.

Para la valoración de la hibridación se utiliza un microscopio de epifluorescencia 80i (Nikon) equipado con filtros específicos (Dapi, Orange, FITC y TxRed) y un objetivo de 100 aumentos.

La evaluación de la hibridación fue realizada por dos observadores experimentados a doble ciego, sin conocer los datos clínicos de los pacientes y el resto de resultados del estudio. Se evaluó toda la superficie de los cores hibridados, realizando el recuento del número de señales de cada sonda en un mínimo de 20 núcleos tumorales bien delimitados en la contra tinción con DAPI. Por cada núcleo se valoró la presencia o ausencia de señal de cada sonda, siempre y cuando estas fueran nítidas y claras. Se valoraron de forma independiente los tres cores de cada tumor, usándose el tejido

normal como control interno no alterado. Se asignó posteriormente un resultado único representativo por caso/tumor para el análisis estadístico.

Tras recontar el número de señales por núcleo de cada sonda, en el caso de HER2 se calculó el ratio HER2/Cr.17, considerándose un resultado positivo para amplificación de HER2 los ratios superiores a 2,2, mientras que los ratios inferiores a 1,8 se consideraron como negativo para amplificación del gen.

Para la valoración de la amplificación del gen EGFR se utilizaron las 6 categorías definidas en el estudio de Capuzzo et al ⁶⁷ y que se definen como:

- 1) Disomía: ≤ 2 copias en $>90\%$ de los núcleos
- 2) Baja trisomía: ≤ 2 copias en $\geq 40\%$ de los núcleos, 3 copias en $10\%–40\%$ de los núcleos o, ≥ 4 copias en $<10\%$ de los núcleos)
- 3) Alta trisomía (≤ 2 copias en $\geq 40\%$ de los núcleos, 3 copias en $\geq 40\%$ de los núcleos, ≥ 4 copias en $<10\%$ de los núcleos);
- 4) Baja polisomía (≥ 4 copias en $10\%–40\%$ de los núcleos);
- 5) Alta polisomía (≥ 4 copias en $\geq 40\%$ de los núcleos); y
- 6) Amplificación génica (definida como la presencia de clústeres de señal densos y/o una ratio de gen EGFR/cromosoma 7 superior a 2 o más de 15 copias de EGFR por núcleo en $\geq 10\%$ de los núcleos analizados).

Se consideraron como resultado positivo para amplificación de EGFR la alta polisomía (HP) y la amplificación (AMP).

5.2.6 Análisis con PCR

Se realizó el estudio mutacional del gen KRAS (exón 2) y BRAF (exón 15) mediante secuenciación.

Para la obtención de ADN, se realizaron secciones completas de 5 μm de grosor tejido parafinado y fijado en formalina de cada paciente, que se dispusieron en laminillas. Una de las secciones se tiñó con Hematoxilina-Eosina a fin de que un patólogo confirmara la presencia de tejido tumoral (adenocarcinoma), delimitando el área de mayor densidad tumoral, evitando zonas necróticas, hemorrágicas o con mucosa

gástrica normal. Utilizando la sección teñida como platilla, se realizó macro disección manual de estas áreas en las laminillas sin teñir, tras desparafinado del tejido. El tejido obtenido se introdujo en un tubo eppendorf estéril de 1,5 mL, en el que se realizó la digestión tisular mediante proteínasa K. El número de secciones por muestra varió en función del área rica en tejido tumoral y las características histológicas del tumor, con un rango entre 6 y 8, requiriéndose un menor número de secciones cuanto más compacto y extenso era el tumor.

La extracción de DNA genómico se realizó mediante fenol-cloroformo. Tras cuantificación por espectrofotometría, se utilizaron 200s ng de DNA para cada reacción de PCR en las que se amplificaron el exón 2 del gen KRAS (291 pb) y el exón 15 del gen BRAF (224 pb) utilizando cebadores y condiciones anteriormente descritos en la literatura. Para ello se utilizó un equipo GeneAmp® PCR System 9700 (Life Technologies). La eficiencia de la amplificación se comprobó mediante electroforesis en agarosa, usando el sistema E-Gel® 2% con SYBR Safe™ (Invitrogen). Sí mismo, se amplificó un fragmento de 268 pb del gen globina humana a modo de test de calidad de extracción genómica.

Posteriormente, el producto amplificado se purificó mediante columna (Qiagen) y la reacción de secuenciación cíclica se realizó mediante el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) utilizando los mismos cebadores de la amplificación. Tras purificación mediante columna (Life Technologies), la reacción, el producto de secuenciación, tanto en Sense como en antisense, se analizó mediante un secuenciador automático ABI310 (Life Technologies).

5.2.7 Inmunofluorescencia

La técnica de inmunofluorescencia múltiple se basa en la técnica de inmunohistoquímica, pero en este caso, la expresión de la unión antígeno/anticuerpo se revela mediante unión de un fluorocromo, siendo posible realizar un ensayo con múltiples anticuerpos combinados con distintos fluorocromos, hecho que permite evaluar y cuantificar, en una única sección de tejido, la expresión de distintos bio marcadores.

Para desarrollar los ensayos de IF partimos de las condiciones para el análisis mediante IHQ de los marcadores de interés, ya sean las recomendadas por el propio fabricante o las publicadas en otros estudios. A partir de estas condiciones, todos los marcadores propuestos se testan en ensayos de IF simple, combinándolos con

diferentes fluorocromos (Zenon Alexa Fluors) que cubren toda la franja del espectro lumínico, a fin de identificar la combinación óptima para cada uno de ellos, ponderando qué combinaciones son más afines y cuáles más críticas o restrictivas. Para ello, se utilizan bloques control, elaborados a partir de líneas celulares o tejidos en los que se conozca la expresión de cada marcador. Las mismas muestras se evalúan también en IHQ estándar, y el patrón de expresión obtenido es utilizado de guía para analizar los ensayos de IF simple.

Para el presente estudio de estandarizaron en IF simple y múltiple los siguientes anticuerpos:

- pERK
- ERK
- Citoqueratina AE1/AE3 (permite la identificación del componente tumoral de la muestra)

Una vez estandarizadas las condiciones para las distintas combinaciones anticuerpo-fluorocromo, se desarrolla el ensayo múltiple, en el que, de todas las combinaciones posibles, se incluyen aquellas que son más compatibles en cuanto las características propias de cada anticuerpo (p.ej. recuperación antigénica), la selección del fluorocromo (se priorizan los anticuerpos que únicamente funcionan en el compartimento celular a estudio) (p. ej. nuclear vs. Citoplasma). En general las combinaciones se diseñaron en función de las características propias de cada Ac (p.ej., recuperación antigénica), la selección del fluorocromo (p.ej superposición de señales en caso de que dos Ac únicamente funcionen con el mismo fluorocromo) y la localización de los compartimentos celulares que expresan los marcadores a interrogar (p.ej., expresión citoplasmática vs. nuclear).

Así, utilizando controles en los que la expresión de los distintos marcadores es conocida, se testan las distintas combinaciones de anticuerpos/fluorocromos hasta encontrar la combinación que permite evaluar la expresión de los marcadores de forma específica, nítida e intensa.

Se construyó, en una primera fase, el ensayo de IF múltiple pERK/ERK/CKAE1-AE3 en el que los anticuerpos y fluorocromos se combinaron según la siguiente tabla:

Anticuerpo	Casa	Dilución	Isotipo	Fluorocromo

	comercial			
ERK1/2	CST	1:250	RlgG1	R488
pERK1/2	CST	1:25	RlgG	R594
AE1-AE3	DAKO	1:100	MIgG1	M647

Una vez estandarizada la combinación de IF mplex utilizando tejidos control, se procedió al análisis de las muestras incluidas en los TMAs. Se obtuvieron imágenes digitalizadas de cada uno de los cores analizados. Para ello, se utilizó un microscopio Nikon 90i equipado con filtros especiales Chroma (DAPI, Fitc, M1 y M2) y una cámara CRI Nuance que permite la captación de imágenes multiespectrales en todo el espectro lumínico. El software Metamorph 7.6.5.0 permite la adquisición automatizada de las imágenes, así como su posterior análisis cuantitativo. A partir de los resultados obtenidos en los tejidos control, en los que la expresión de los distintos marcadores es conocida, se define el perfil de señal puro de cada fluorocromo, distinguiéndolo de la fluorescencia inespecífica o señal de fondo. La aplicación de algoritmos a la imagen multiespectral cruda permite la obtención de imágenes individuales para cada marcador, y de una imagen conjunta en la que se puede estudiar y cuantificar la expresión individual y simultánea de los marcadores analizados además de su localización intracelular.

En una segunda fase se simplificó la combinación de IF múltiple, eliminado el marcador ERK con la finalidad de mejorar y depurar la detección de la expresión de pERK. La combinación anticuerpo/fluorocromo final fue:

Anticuerpo	Casa comercial	Dilución	Isotipo	Fluorocromo
pERK1/2	CST	1:25	RlgG	R594
AE1-AE3	DAKO	1:100	MIgG1	M647

La cohorte completa de muestras se analizó también con esta combinación.

5.2.8 Análisis Estadístico

Se utilizaron los siguientes test o análisis dependiendo del tipo de variables:

Correlación de variables entre sí:

- Para el análisis de la correlación entre variables clínico patológicas y las variables biológicas con expresión cualitativa (por ejemplo sobreexpresión de ERK, mutación KRAS, etc) se utilizaron el test exacto de Fisher y la X^2 de Pearson.
- Para el análisis de variables clínico patológicas y las variables biológicas con expresión en forma de variable continua (cualitativas) (por ejemplo las IF) o a correlación de variables biológicas continuas (IF), y las variables biológicas categóricas (por ejemplo IHQ) se utilizaron los test UNIANOVA.
- Para la comparación de variables biológicas continuas (IF) y otras continuas (IF) se utilizó test paramétriales de X^2 de Pearson.

Correlación de variables con la supervivencia:

- Se utilizó el test de Log Rank para estudiar la correlación entre una variable clínico patológica o biológica y su correlación con la supervivencia.

En la definición de supervivencia se utilizaron tres tipos y que se definieron de la siguiente manera.

- Supervivencia libre de enfermedad (SLE): el tiempo desde la cirugía hasta la fecha de la primera progresión, muerte o Segundo tumor.
- Supervivencia específica (SE): el tiempo transcurrido desde la fecha de la cirugía hasta la fecha de muerte por progresión del tumor.
- Supervivencia global (SG): el tiempo transcurrido desde la fecha de la cirugía hasta la fecha de muerte por cualquier causa.

Para la estimación de la diferencias entre las medianas, se utilizaron las curvas de Kaplan- Meier.

Para el análisis multivariado se utilizó el modelo de Regresión de Cox.

Consideraciones estadísticas.

- Consideramos estadísticamente significativo un valor de probabilidad de dos caras < 0.05
- Todas las variables con un nivel de significación > 0.1 en el análisis univariado, son utilizadas para su análisis en el modelo regresión de Cox para determinar si son valores pronósticos independientes, considerando como significativos los que alcanzan una $p < 0.05$.
- Para todos los cálculos, usamos el programa estadístico SPSS de Windows (versión 18.0) de SPSS Inc. (Chicago, IL).

6- Resultados

6.1 Características Clínicas

Entre **Julio de 2003 y Julio de 2012**, 142 pacientes afectados de adenocarcinomas gástricos con estadios IB a III fueron intervenidos en nuestro centro. De ellos 66 presentaban contraindicaciones médicas para realizar tratamiento adyuvante o un estado general deteriorado (ECOG 3) en las ocho semanas tras la intervención que contraindicaba realizar un tratamiento adyuvante y 2 rechazaron el tratamiento adyuvante. Finalmente 74 pacientes realizaron tratamiento de quimio- radioterapia adyuvante con el esquema de Macdonald (basado en 5 Fluorouracilo) y fueron el objeto de nuestro estudio.

Las características de nuestra serie se detallan en la **Tabla 1**.

En especial cabe destacar de ellas, que la **edad media** de nuestra serie era de 66 años, siendo el **sexo** predominante el masculino (68%) y presentando la mayoría de ellos (69%) un buen **estado general** a pesar de la cirugía realizada (ECOG 0-1).

En cuanto a la **localización del tumor**, la mayoría eran de antro (62%) y sólo una minoría de unión gastro- esofágica (7%).

Dentro de la **clasificación histológica**, el tipo difuso fue el más frecuente (51%) existiendo un 8% de tumores mixtos. En cuanto a la presencia concreta de células en anillo de sello sólo se observó en menos de un tercio de los casos (30%).

Con respecto al **estadio del tumor** tras el análisis anatómo-patológico y basándonos en la clasificación TNM 7º edición (AJCC), la mayoría de ellos fueron tumores con afectación profunda de la pared: el 90% son T3-4.

El número de ganglios medios extirpados en la **linfadenectomía** fue de 18 con un rango de 4 a 44, pudiéndose considerar óptima cuando es superior a 15 ganglios, según se recogen en las guías Occidentales y Asiáticas ^{21,64}. Bajo estas consideraciones, se practicó una **linfadenectomía óptima** en el 68 % de los casos.

Teniendo en cuenta la calidad de la linfadenectomía realizada, tan sólo un 22% presentó un tumor con ganglios negativos.

Por lo tanto el estadio final de los tumores de nuestra serie es mayoritariamente tumores avanzados; el 64% de los casos correspondían a estadios III

TABLA 1. CARACTERISTICAS CLINICAS

Características	N (%)
Edad	
- Media	66
- rango	(35-83)
Edad	
- ≤ 65años	26 (35)
- >años	48 (65)
Sexo	
- hombre	50 (69)
- mujer	24 (31)
PS	
- 0-1	51 (59)
- 2	23 (31)
ECOG	
- 0	12 (16)
- 1	39 (53)
- 2	23 (31)
Localizacion	
- cardias	5 (7)
- antro	36 (62)
- cuerpo	23 (1)
Localización:	
- union GE	5 (7)
- - gastrico	69 (93)
Profundidad de infiltración	
- T1-2	7 (9)
- T3	19 (24)
- T4	48 (65)
Profundidad de infiltración	
- T1-2	7(9)
- T3-4	67 (91)
Nº ganglios resecados	
- Media –rango	18 (4-44)
Linfadenectomía optima	
- Si	50 (68)
- no	24 (32)
Afectación ganlionar	
- N0	16 (22)
- N1-3	58 (78)
Afectación ganlionar	
- N0	16 (22)
- N1	15 (20)
- N2	20 (27)
- N3	23 (31)

Estadio	
- IB- IIA	10 (14)
- IIB	17 (23)
- IIIA	11 (16)
- IIIB	18 (24)
- III C	18 (24)
Estadio	
- IB- II	27 (36)
- III	47 (64)
Clasificación Lauren	
- Difuso	38 (51)
- Intestinal	30 (41)
- Mixto	6 (8)
Diferenciación	
- Bien	12
- Moderado	18
- Pobremente	35
- Indiferenciado	1
Histología	
- Tubular	38 (51)
- Mucinoso	30 (41)
- Papilar	6 (8)
Invasión vascular	
- presente	58 (78)
- Ausente	16 (22)
Invasión neural	
- Presente	59 (80)
- Ausente	15 (20)
Carcinoma con células Anillo de Sello	
- Presente	22 (30)
- Ausente	52 (70)

6.2 Expresión de ERK, p ERK y expresión nuclear de pERK:

6.2.1 Expresión por IHQ:

Para responder al **objetivo número 1**, (Comprobar que la forma activa de ERK (pERK) y su expresión nuclear (p ERK nc) se sobreexpresan en tumores más avanzados vamos a detallar la expresión de ERK y su forma activa pERK y su expresión nuclear.

ERK

El 89% de los tumores mostraron una expresión citoplasmática de ERK. Dicha expresión sin embargo era menos frecuente en los pT3-4 (88%) que en los tumores más superficiales: pT1-2 (100%) al igual que en los tumores con afectación ganglionar (pN1-3: 87%) frente a los que no presentaban afectación ganglionar (N0: 94%). Por tanto la expresión tendía a ser menos frecuente en los tumores más avanzados (Estadio III: 85%) frente a los tumores más iniciales (estadio Ib- II: 96%) (p 0.14).

La expresión de ERK no mostró diferencias entre los tipos histológicos ni la localización anatómica del tumor, ni con respecto a las otras características clínicas.

(**Tabla 2**)

TABLA 2. CORRELACION de la EXPRESION DE ERK, pERK y pERK nuclear y las Características Clínicas.

	ERK (72 casos)		Valor <i>p</i>	pERK (74 casos)		%	Val or <i>p</i>	pERKnuclear(74)		%	Valor <i>p</i>
	Neg.	Pos.		Neg.	Pos.			Negativo	Positivo		
Sexo			0.49				0.05				0.38
Hombre	6	43		20	30	92		45	5	10	
- mujer	2	21		2	22	65		23	1	4	
PS			0.04				0.11				0.29
-0-1	8	42		18	33	65		48	3	6	
-2	0	22		4	19	83		20	3	13	
Profundidad de invasión			0.09				0.32				0.68
- T1-2	0	7		1	6	86		7	0	0	
- T3	0	18		4	15	79		17	2	11	
- T4	8	39		17	31	65		44	4	8	
Profundidad de invasión			0.32				0.34				0.40
- T1-2	0	7		1	6	86		7	0	0	
- T3-4	8	57		21	46	67		61	6	9	
Afectacion ganglionar			0.48				0.64				0.18
- N0	1	15		4	12	75		16	0	0	
- N1-3	7	49		18	40	69		52	8	13	
Estadio			0.14				0.28				0.29
- Ib-II	1	25		6	21	78		26	1	4	
- III	7	39		16	31	66		42	5	11	
Clasificacion Lauren			0.9				0.70				0.08
Difuso	4	33		11	27	71		37	1	3	
Intestinal	34	26		10	20	67		25	5	17	
mixto	1	5		1	5	83		6	0	0	
C. Anillo sello			0.65				0.76				0.46
- ausente	5	45		16	36	69		47	5	10	
- presente	3	19		6	18	75		21	1	5	
Localización			0.68				0.37				0.78
- cardias	0	5		2	32	94		5	0	0	
- cuerpo	3	19		9	14	61		21	2	9	
- antro	5	10		11	35	76		42	4	9	

ERK activado: p ERK

El 70% de los tumores presentaron una expresión citoplasmática de ERK activado. Dicha expresión parecía disminuir en tumores más profundos (pT3-4. 67%) frente a los pT1-2(86%) y también en los tumores pN1-3 (69%) frente a los pN0 (75%). Por tanto parecía existir una menor expresión en tumores más avanzados (Estadio III: 66%) frente a Ib-II (78%) sin que las diferencias, lleguen a alcanzar una significación estadística (p 0.28).

No se objetivo diferencias en la expresión entre los diferentes tipos histológicos ni localizaciones del tumor. Tampoco se observaron diferencias entre las otras características clínicas excepto una mayor expresión en mujeres (92%) frente a hombres (60%).

Existe una clara correlación (p 0.04) entre la expresión de ERK activado y su forma natural (ERK) De tal forma que el 75% de los casos con expresión de ERK, expresan pERK frente al 63% de los casos sin expresión de ERK. (**Tabla 3**)

TABLA 3. CORRELACION de la EXPRESION DE ERK, pERK y pERK nuclear por IHQ, entre si

	pERK		% (positivo)	p	pERK nuclear		% (positivo)	p
	Negativo	Positivo			Negativo	Positivo		
ERK -negativo - positive	6 16	2 48	25 75	0.04	8 58	0 6	0 9	0.36
pERK -negativo - positive					20 48	2 4	9 8	0.84

Expresión ERK activado a nivel nuclear: p ERK nuclear (pERK nc).

En 6 casos (8.1%) se detectó una expresión de p ERK localizada a nivel del núcleo celular (pERK nc).

Dicha expresión estaba escasamente descrita en la literatura, por lo que desconocíamos cual podía ser su interpretación.

Existía una tendencia a una mayor expresión en los tumores profundos (pT3-4: 9% vs pT1-2: 0%), y en los casos con afectación ganglionar (pN1-3: 12% vs pN0: 0%), existiendo una tendencia a mayor expresión por tanto en estadios más avanzados (III: 11% vs Ib-II: 4%) (p 0.29).

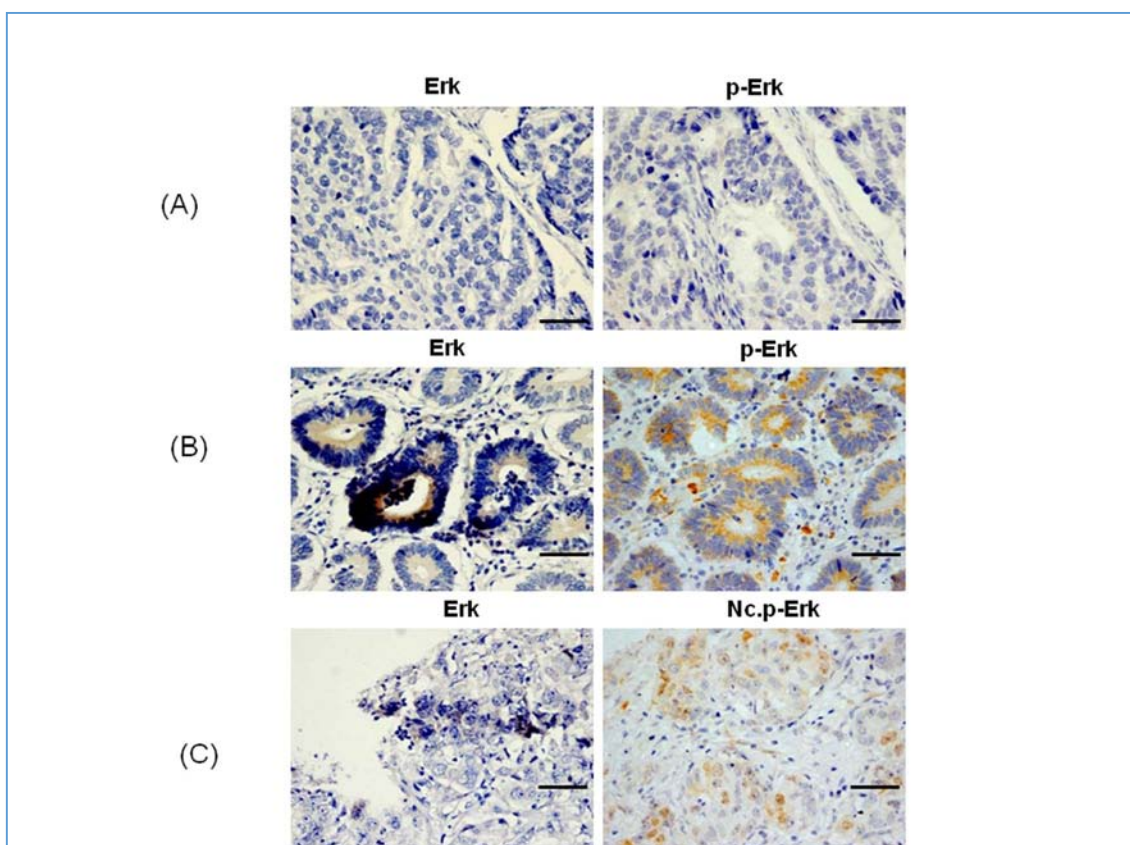


FOTO 1. IHQ de ERK, pERK y pERK nuclear.

Casos representativos tanto de fenotipos negativos como positivos. El 8% de los casos se caracterizan por ausencia de expresión tanto de ERK como de su forma activa pERK. Existe una correlación significativa entre la expresión de ERK y su forma activa pERK (p 0.04) (**B**). Los seis casos que presentan expresión nuclear de pERK también expresan ERK (**C**).

La expresión parecía correlacionarse con el tipo histológico de Lauren: así era más frecuente en los tumores de tipo intestinal (17%) con respecto a los de tipo difuso (3%) pero sin alcanzar la significación ($p = 0.08$). Este hallazgo parece correlacionarse con el hecho de que solo 1 de los 6 casos que mostraron expresión de pERK nuclear aconteció en adenocarcinoma con expresión de células en anillo de sello siendo el resto de casos en tumores sin células en anillo de sello.

La expresión de pERK nucleado no parece correlacionarse con ninguna otra característica clínica. (**Tabla 2**)

En cuanto a la correlación con la expresión de ERK y pERK, parece existir una tendencia a que la expresión de ERK con p ERK nuclear. Los 6 casos con expresión nuclear de pERK, también expresaban ERK ($p = 0.36$).

Sin embargo no existe correlación entre la expresión de pERK citoplasmático y la expresión nuclear, dado que 2 de los 6 casos con expresión nuclear no tenían expresión citoplasmática. (**Tabla 3**)

6.2.2 Expresión por inmunofluorescencia

ERK

Al igual que en la determinación por IHQ, la expresión de ERK disminuía en los estadios más avanzados, alcanzando esta diferencia la significación estadística ($p = 0.02$). (**Tabla 4B**)

Tan poco se encontró correlación de la expresión de ERK con otras características clínicas cuando se analizó mediante IF, como se observó por IHQ.

Sin embargo, sí que se vio que era mayor la expresión de ERK en los tumores con presencia de células en anillo de sello ($p = 0.008$). (**Tablas 4A y 4B**)

TABLA 4.A. CORRELACION DE DATOS INMUNO FLUORESCENCIA CON LAS CARACTERISTICAS CLÍNICAS (variables categóricas)

	ERK + (%)	p.	pERK + (%)	p	pERK nuclear + (%)	p
Sexo		0.26		0.48		0.95
- Hombre	60		85		35	
- Mujer	74		91		35	
PS		0.68		0.54		0.50
-0-1	63		86		33	
-2	68		91		41	
Profundidad de invasión		0.69		0.89		0.65
- T1-2	71		86		43	
- T3-4	64		87		34	
Afectación ganglionar		0.70		0.38		0.33
- N0	68		94		25	
- N1-3	64		85		38	
Estadio		0.79		0.67		0.79
- Ib-II	67		85		33	
- III	64		87		36	
Clasificación Lauren		0.38		0.83		0.76
Intestinal	60		86		34	
Diffuse	73		90		40	
mixed	50		83		33	
Invasión neural		0.86		0.09		0.43
-no	64		84		37	
-si	67		100		27	
Invasión vascular		0.33		0.40	0.4	0.70
-no	62		89		36	
-si	75		81		31	

C. Anillo sello		0.06		0.74		0.13
- ausente	71		87		40	
- presente	47		89		21	
Localización		0.95		0.67		0.57
- cardias	60		100		20	
- cuerpo	67		85		43	
- antro	64		87		33	

TABLA 4.B. CORRELACION DE DATOS IF CON LAS CARACTERISTICAS CLINICAS (variables continuas)

	ERK + Media	p.	pERK + Media	p	pERK nuclear + Media	p
Sexo		0.16		0.56		0.05
- Hombre	578		194		4	
- Mujer	781		223		9	
Edad		0.52		0.03		0.11
<65 a	586		146		8.1	
>65 a	676		235		4.3	
PS		0.007		0.90		0.64
-0-1	584		209		5.8	
-2	934		190		5.2	
Profundidad de invasión		0.24		0.42		0.0001
- T1-2	1088		157		22	
- T3-4	595		209		3	
Afectación ganglionar		0.99		0.54		0.92
- N0	633		238		4.9	
- N1-3	647		194		5.8	

Estadio		0.02		0.82		0.013
- Ib-II	859		203		8.9	
- III	512		204		3.6	
Invasión vascular		0.20		0.06		0.005
-no	594		232		3.9	
-si	814		106		11.6	
C. Anillo sello		0.008		0.64		0.13
- Ausente	753		203		6.8	
- Presente	345		206		2.4	
Localización		0.50		0.88		0.67
- Unión GE Gástrico	634		204		5.5	
	370		197		7.0	

ERK activado: p ERK

No se objetivó correlación con ninguna característica ni clínica ni patológica, ni se detectó una tendencia a correlacionarse con estadios más iniciales a diferencia de la determinación por IHQ.

Al igual que por IHQ, sí que se observó una correlación entre la expresión de ERK y su forma activa pERK. (Tabla 4C)

TABLA 4.C. CORRELACION DE EXPRESION POR IF DE ERK, pERK y pERK nuclear

	pERK		% (positivo)	p	pERK nuclear		% (positivo)	p
	Negativo	Positivo			Negativo	Positivo		
ERK				0.03				0.02
-negativo	6	19	76		21	4	16	
- positivo	3	43	93		25	21	46	
pERK								0.08
-negativo					9	0	0	
- positivo					37	25	40	

Expresión ERK activado a nivel nuclear: p ERK nuclear.

No se ha encontrado ninguna correlación con las características clínicas ni patológicas. La expresión en estadios avanzados era similar al de los estadios más iniciales (36% vs 33%) si bien en los casos que la expresaban, la media era mayor en estadios más iniciales. (**Tablas 4A y 4B**)

En este caso sí que existía tanto una correlación con ERK (p 0.02) como con pERk (p 0.01).

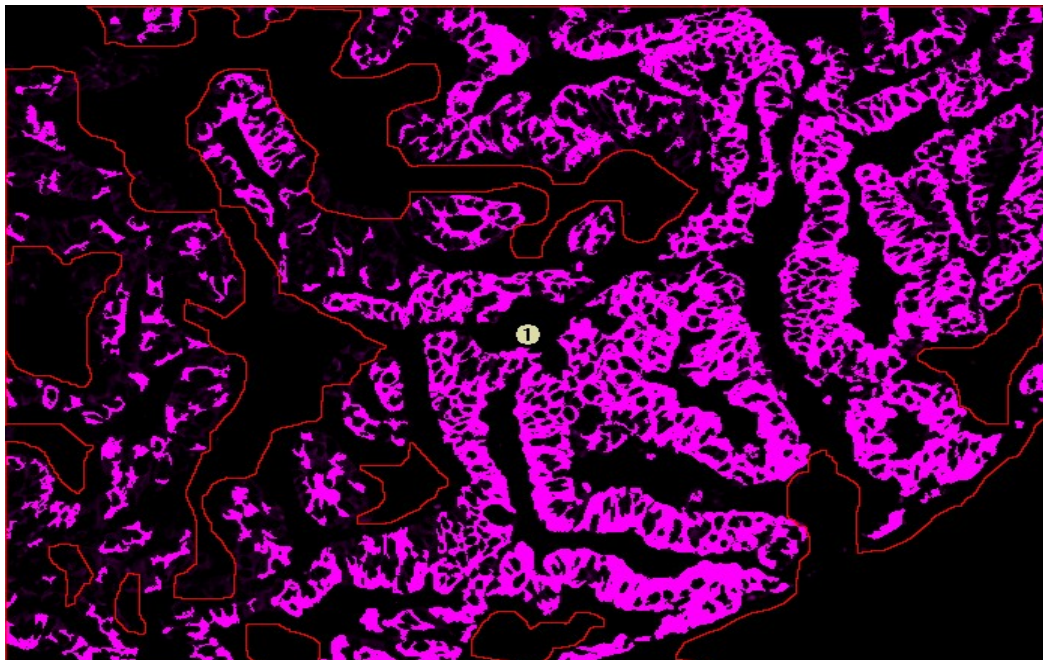


FOTO 2. Técnica de IF En la imagen se aprecia la expresión de CK AE1/AE3 (color rosado), mediante la que seleccionamos las áreas tumorales en las que queremos realizar el análisis. 20x

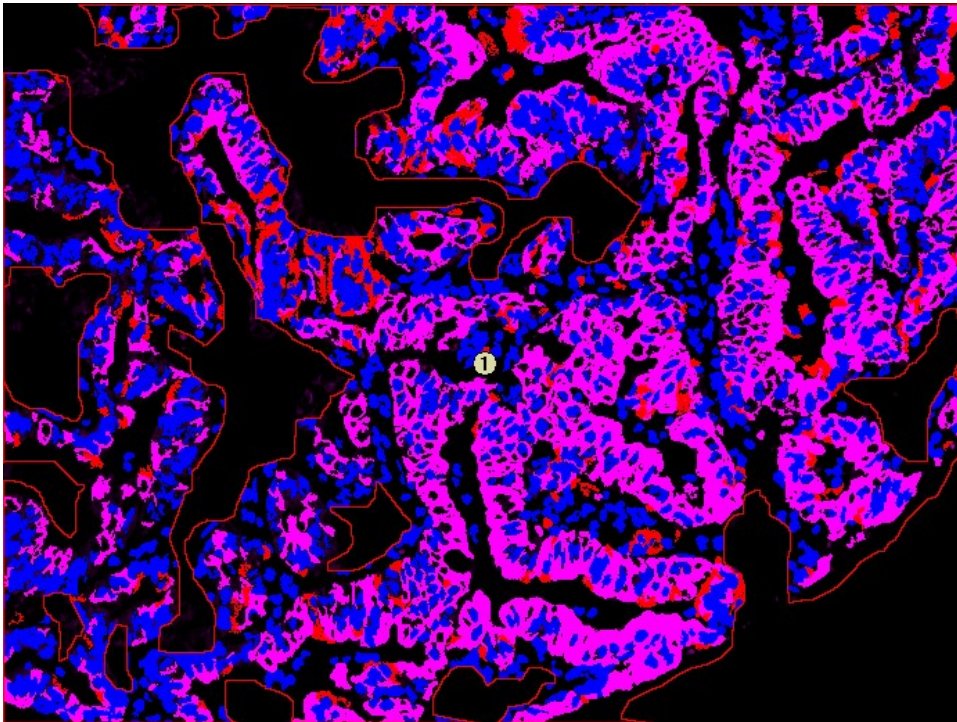


FOTO 3. Técnica de IF En la imagen se muestra la expresión de CKAE1AE3 en color rosado, la expresión de pERK en rojo y los núcleos celulares contrateñidos con DAPI, en azul. 20x

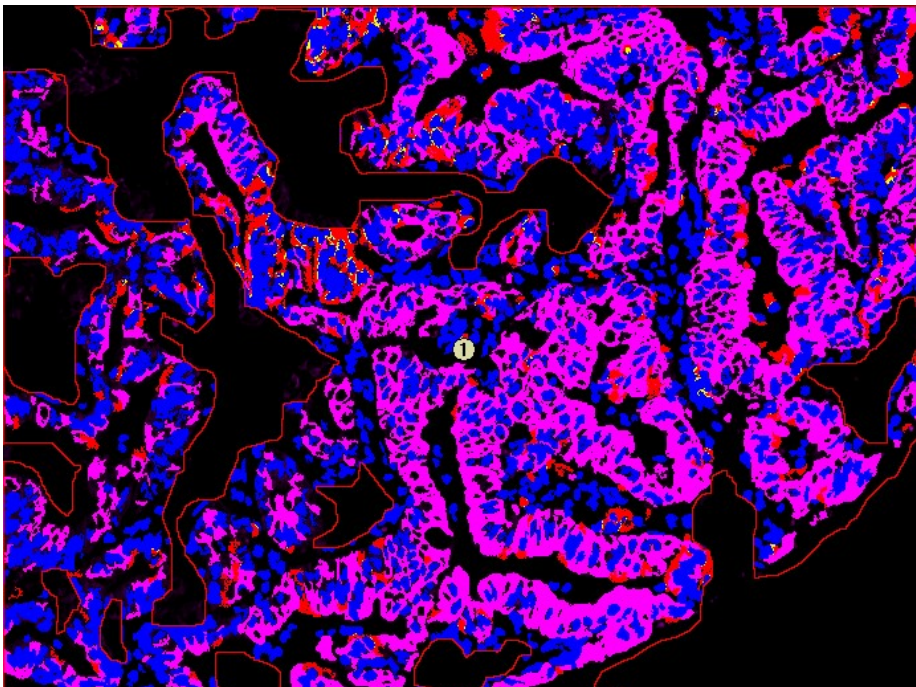


FOTO 4. Técnica de IF En la imagen se puede apreciar la fracción de pERK que colocaliza con el DAPI (núcleo), representada en color amarillo. En este caso, la expresión de pERK representa un 6.4% del total del área analizada y un 1.5% de ésta colocaliza con DAPI, es decir, con los núcleos celulares. 20x

Correlación entre la expresión por IHQ y IF:

Existe una correlación entre la expresión de cada factor cuando se valora por IHQ y por IF: para ERK (p 0.03), pERK (0.006) y una tendencia para pERK nuclear (0.09). (Tabla 4D)

TABLA 4.D. RELACION DE EXPRESION POR IHQ y por IF: T- Test y Cross Table

IF	IHQ																		
		ERK					pERK						pERK nuclear						
		T-test Medias Neg Pos		p	Cross Table % Neg Pos		p	T-test Medias Neg Pos		p	Cross Table % Neg Pos		p	T-test Medias Neg Pos		p			
	ERK	31	667	0.03	33	67	0.10	359	748	0.07	58	67	0.46	628	821	0.65	65	67	0.92
	pERK	34	218	0.09	50	90	0.05	89	245	0.006	79	90	0.20	207	169	0.20	86	100	0.32
pERK nucle	0	6.3	0.19	0	38	0.06	3.3	6.7	0.42	16	42	0.03	5.4	8.4	0.74	32	67	0.09	

6.3 Expresión de ERK, p ERK y expresión nuclear de pERK: correlación con la supervivencia.

Con el fin de responder al **Objetivo 2**: determinar si la sobreexpresión de pERK y/ o de su expresión nuclear (pERK nc) se correlaciona con una peor supervivencia, se evaluó estos tres parámetros en los siguientes apartados:

- Si existían características clínicas que mostraran un valor pronóstico
- Si la expresión de ERK, pERK o pERK nuclear evaluado por IHQ se correlacionaba con la supervivencia.
- Si la expresión de ERK, pERK o pERK nuclear evaluado por inmunofluorescencia se correlacionaba con la supervivencia

6.3.1 Características Clínicas y su relación con la supervivencia:

Tras un seguimiento medio de 8.1 años (2.6- 12), la mediana de supervivencia libre de enfermedad (SLE) fue de 28.9 meses , la mediana de Supervivencia Especifica (SE) de 38.5 meses y la de Supervivencia global (SG) de 37,9 meses.

El **estudio de la correlación de los diferentes factores clínicos** con las SLE, SE y SG nos mostraron los siguientes resultados: (**Tabla 5**)

- **Género**: Las mujeres alcanzaban una mejor supervivencia libre de enfermedad no alcanzada vs 21.6m ($p= 0.03$), y Supervivencia global no alcanzada vs 33.9 meses en los varones ($p= 0.002$).
- Así mismo, los pacientes con un mejor **estado general** (ECOG) presentaban una tendencia a mayor SLE ($p= 0.15$), SE($p= 0.22$) y SG como por ejemplo una mediana no alcanzada , de 43.5 m y de 44.9 m en los ECOG:0 vs1 vs 2, respectivamente) ($p= 0.35$).
- En referencia a la **estatificación**:
 - en relación a la **pT**: existía una tendencia a mayor SLE, SE y supervivencia global en los pacientes con tumores más superficiales, siendo esta última de 48.8 m (en T1-2) frente a 43.5 m (T3-4) ($p 0.21$).
 - en relación a la **pN**: Las diferencias en supervivencias, tanto SLE, SE como SG alcanzan una clara significación entre los tumores con afectación ganglionar frente a los casos con ganglios negativos,

siendo por ejemplo la mediana de SG de 47.7m frente a 38.4m ($p=0.002$).

Todo ello se traduce en unas diferencias con significación estadística marcada en cuanto al **estadio**: estas aparecían tanto en SLE , SE como SG , entre los estadios IB-II frente a los estadio III, pasando por ejemplo en SG de una mediana en estadio Ib-II no alcanzada, siendo de 33.9 m en estadio III ($p < 0.001$).

El análisis de las otras características clínicas como histológicas como por ejemplo: la edad, localización del tumor, tipo histológico invasión vascular, peri neural no mostraron un claro valor pronóstico. (**Tabla 5**)

Tabla 5 CORRELACION DE CARACTERISTICAS CLINICAS CON SG, SLE Y SE

Characteristics	N (%)	Supervivencia Global		Superv.Libre de Enferm.		S. Especifica	
		Mediana	Valor p	Mediana	Valor p	Mediana	Valor p
Edad							
- Media	66						
- Rango	(35-83)						
Edad			0.40		0.92		0.86
- ≤ 65 years	26 (35)	65		61.2*		62.9*	
- >65 years	48 (65)	38.4		63.1*		65.1	
Sexo			0.002		0.03		0.06
- Hombre	50 (69)	33.9		21.6		38.4	
- Mujer	24 (31)	NA		NA		NA	
PS			0.44		0.93		0.088
- 0-1	51 (59)	65.4		NA		NA	
- 2	23 (1)	44.9		48.32		49.2	
ECOG			0.35		0.15		0.22
- 0	12 (16)	NA		NA		NA	
- 1	39 (53)	43.5		29.3		47.7	
- 2	23 (31)	44.9		48.3		49.2	
Localizacion			0.56		0.72		0.22
- cardias	5 (7)	44.9		22.6		44.9	
- antro	36 (62)	48.8		NA		NA	
- cuerpo	23 (31)	38.7		NA		65.4	
Localización:			0.85		0.7		0.76
- union GE	5 (7)	48.8		NA		NA	
- gastrico	69 (93)	44.9		22.6		44.9	
Profundidad de infiltración			0.21		0.14		0.10
- T1-2	7 (9)	48.8		NA		73.2	
- T3-4	67 (91)	43.5		65.4		48.3	
Nº ganglios reseca							
- Media	18						
- Rango	(4-44)						
Afectación ganlionar			0.002		0.04		0.02
- N0	16 (22)	47.7		NA		NA	
- N1-3	58 (78)	38.4		48.0		49.2	

Estadio							
- IB- II	27 (36)	NA	<0.001	NA	0.05	NA	0.004
- III	47 (64)	33.9		24.3		38.1	
Clasificación Lauren			0.34		0.60		0.41
- Difuso	38 (51)	49.2		NA		NA	
- Intestinal	36 (41)	48.8		NA		NA	
- Mixto	6 (8)	25.1		22.7		25.1	
Diferenciación			0.75		0.97		0.94
- Bien	12	14.1		14.0		14.1	
- Moderado	18	47.7		29.3		NA	
- Pobremente	35	43.5		NA		NA	
- Indiferenciado	3	NA		NA		NA	
Histología			0.19		0.42		0.15
- Tubular	38 (51)	49.2		NA		NA	
- Mucinoso	30 (41)	48.8		NA		NA	
- Papilar	5 (7)	39.3		48.0		65.4	
- Calulas en Anillo de sello	1 (1)	14.1		14.0		14.1	
Characteristics		Supervivencia Global		Superv.Libre de Enferm.		S. Especifica	
	N (%)	Mediana	Valor <i>p</i>	Mediana	Valor <i>p</i>	Mediana	Valor <i>p</i>
Invasion vascular			0.30		0.45		0.31
- si	58 (78)	65.4		NA		NA	
- no	16 (22)	38.1		21.6		47.7	
Innvasion neural			0.41		0.34		0.61
Si	59 (80)	48.8		48.3		NA	
No	15 (20)	43.5				49.2	
Carcinoma con celulas Anillo de Sello			0.93		0.72		0.84
- Presente	22 (30)	47.7		59.9		NA	
- Ausente	52 (70)	93.5		63.9		65.4	

NA: no alcanzado

En el **estudio multivariado** mostró una correlación con el estadio con un HR de 2.3 (95% CI 1-6.9), (p 0.05) y con el género, presentando el sexo femenino un HR 0.22 (95% CI 0.9-5). (**Tabla 10**)

6.3.2 Correlación de ERK, pERK y pERK nuclear determinado por IHQ con la supervivencia:

ERK

Como hemos visto previamente, la mayoría de los tumores mostraban una expresión de ERK, pero dicha expresión no se correlaciona ni con la SLE ni con la SE ni con la SG (ver [Tabla 6](#)).

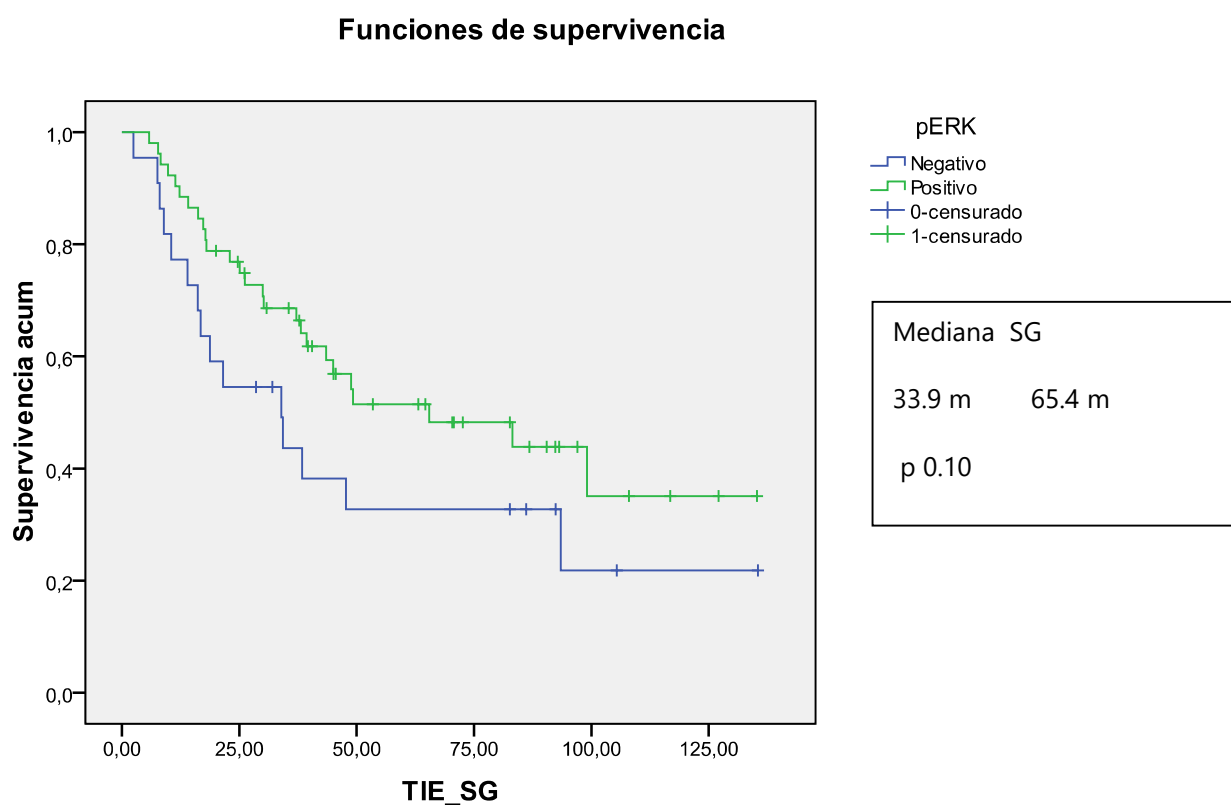
TABLA 6. SUPERVIVENCIAS y EXPRESIÓN DE ERK, pERK y pERK NUCLEAR por IHQ

Características		Supervivencia Global		Superv.Libre de Enferm.		S. Especifica	
	N (%)	Mediana	Valor <i>p</i>	Mediana	Valor <i>p</i>	Mediana	Valor <i>p</i>
ERK							
Negativo	8 (11)	21.5 m	0.4	15.6 m	0.71	47.7 m	0.6
Positivo	64 (89)	48.8 m		NA		NA	
pERK							
Negativo	22 (30)	33.9m	0.10	22.6m	0.22	38.4m	0.18
Positivo	52 (70)	65.4 m		NA		NA	
pERK nuclear							
Negativo	68 (92)	49.2 m	0.006	NA	0.004	NA	0.025
Positivo	6 (8)	8.2m		7.0 m		18.7 m	

pERK

Su expresión citoplasmática de pERK, se producía en la mayoría de los casos. Parecía existir una tendencia a una mayor supervivencia tanto de la SLE, SE como de la SG en los casos que mostraban expresión de pERK. La mediana de SG de los casos con sobreexpresión era de 65.4 meses frente a 33.9 m en los casos negativos ($p=0.10$) ([Figura 1](#)). Sin embargo el análisis multivariado, no confirmó su valor pronóstico.

FIGURA 1. Supervivencia Global en relación a Expresión de pERK por IHQ

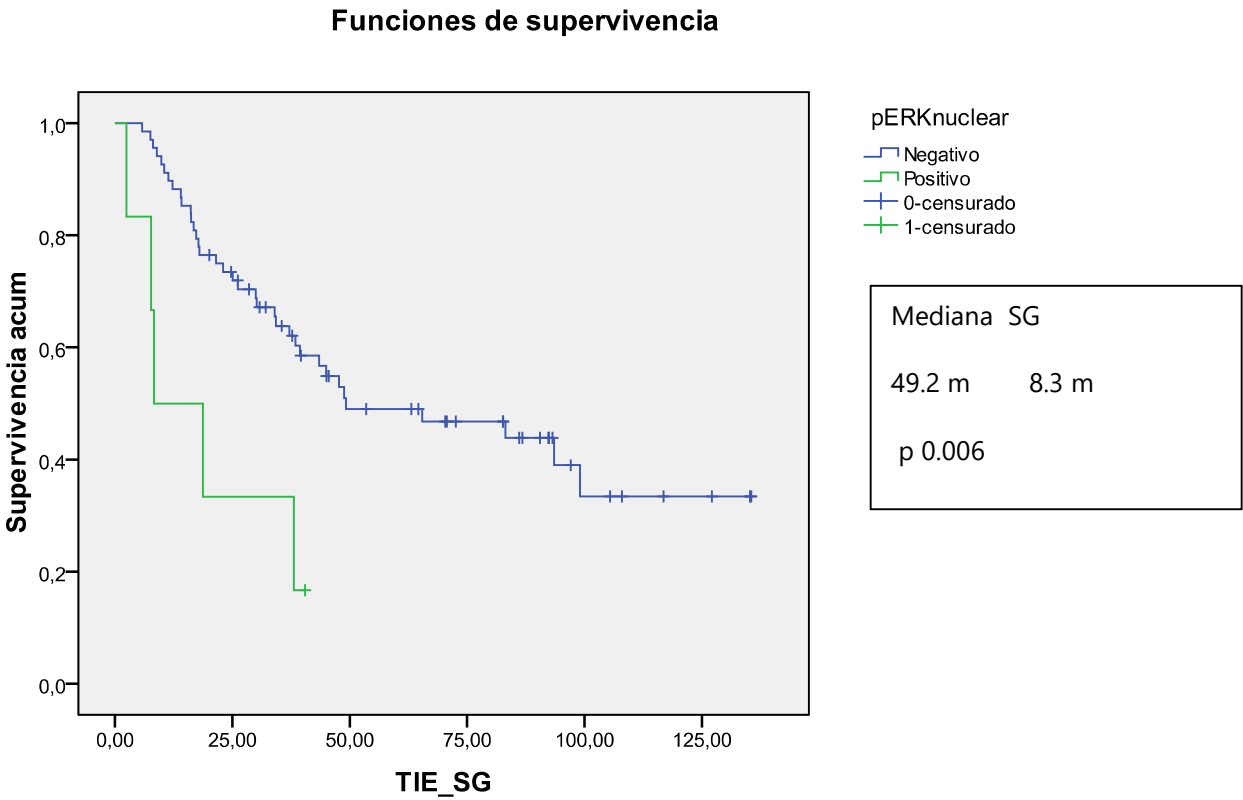


pERK nuclear

A pesar de que como hemos descrito, la expresión nuclear se da en muy pocos casos, objetivamos que los pacientes con tumores que mostraban expresión de pERK en el núcleo, muestran claramente una menor supervivencia. Esto se objetiva con una diferencia que alcanza la significación estadística, tanto en la supervivencia libre de enfermedad ($p=0.006$) como SE ($p=0.01$) y supervivencia global. Las medianas de esta última eran de 8.2m en los casos que expresan el pERK nuclear frente a 49.2 m en los casos que no la expresaban ($p=0.006$). (**Figura 2**)

FIGURA 2. Supervivencias en relación a Expresión de pERK nuclear por IHQ

A. SG



Este hallazgo se confirma cuando realizamos el análisis multivariado, donde la expresión de pERK nuclear presentaba una HR de: de 2.64 (95% CI 1,00-6,94), (p= 0.04) ([Tabla 10](#))

6.3.3 Correlación de ERK, pERK y pERK nuclear determinado por inmunofluorescencia con la supervivencia:

ERK

La expresión de ERK tenía una tendencia a correlacionarse con una mejor SLP Y SE pero las diferencias sí que alcanzaban una significación en la supervivencia global, siendo la mediana en los casos sin expresión de 30.1m frente a 83.1 m en los casos positivos ($p= 0.03$). (**Tabla 8**)

pERK

Al igual, que con ERK, la expresión de pERK tendía a correlacionarse con una mayor supervivencia pero sin que las diferencias llegaran a alcanzar la significación estadística.

P ERK nuclear

Como se ha mostrado previamente, PERK/DAPI /AE es el que cuantifica la expresión de pERK a nivel nuclear.

Cuando analizamos su correlación con la supervivencia, observamos, que su expresión mostraba una tendencia a una menor SLP ($p=0.07$) y alcanzaba una significación en la SE ($p=0.04$) siendo cercana a la significación en la supervivencia global, donde la mediana era de 37.1 m en los casos con expresión frente a 83.1 m en los que no la muestran ($p= 0.13$) (**Tablas 8 y 9**).

TABLA 8 SUPERVIVENCIA y EXPRESIÓN DE ERK, PERK y ERK NUCLEAR por IF

VARIABLE CATEGORICA														
Caracteristicas		Supervivencia Global				Superv.Libre de Enferm.				S. Especifica				
		KM				KM				KM				
	N (%)	Mediana	Valor <i>p</i>			Mediana	Valor <i>p</i>			Meda.	Valor <i>p</i>			
VARIABLE CATEGORICA														
ERK Negativo Positivo	25 (X) 46 (X)	30.1 m 83.1 m	0.03			24.3 m NA	0.57			47.7 m NA	0.27			
pERK Negativo Positivo	9(X) 62(X)	26.1 m 49.2 m	0.16			15.6m NA	0.09			26.1 m NA	0.08			
		Supervivencia Global					Superv.Libre de Enferm.				S. Especifica			
	N (%)	Mediana	Valor <i>p</i>	R COX		Meda.	Valor <i>p</i>	R COX		Meda .	Valor <i>p</i>	R COX		
pERK nuclear Negativo Positivo	46 (x) 25 x)	83.1 m 37.1	0.01	1.64 (0.85- 3.17)	0.01	NA 22.7 m	0.07	1.85 (0.92- 3.47)	0.08	NA 37.1	0.04	2.1 (0.01- 4.35)	0.04	

TABLA 9. EXPRESION DE PERK nuclear y SUPERVIVENCIAS:

	<i>p</i>	pERK nuclear Negativo	pERK nuclear Positivo
Por IHQ			
SG	0.006	49.2 m	8.2 m
SE	0.019	NA	18.7 m
SLE	0.011	NA	7.0 m
Por IF (variable 56ategorica)			
SG	0.13	83.1 m	37.1 m
SE	0.04	NA	37.1 m
SLE	0.07	NA	22.7 m

TABLA 10. A. MULTIVARIADO

Variables en la ecuación								
	B	SE	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95,0% CI para Exp(B)	
							Inferior	Superior
TpERKncr	,974	,492	3,911	1	,048	2,648	1,009	6,949
GEN	-1,486	,422	12,426	1	,000	,226	,099	,517
Nc	-1,133	,736	2,368	1	,124	,322	,076	1,364
EST2	,850	,482	3,103	1	,050	2,339	,909	6,021

TABLA 10.B. MULTIVARIADO

	Análisis Univariado				Análisis Multivariado	
	N ^o pacientes	Mediana	HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	p
ERK				0.4		
- Negativo	8	21.5	1		-	
- Positivo	64	48.8	0.69			
Cy.p-ERK				0.10		
- Negativo	22	33.9	1		-	
- Positivo	52	65.4	0.59			
Nc-pERK				0.009		0.04
- Negativo	68	49.2	1		-	
- Positivo	6	8.2	3.5			
EGFR				0.50		
- Negativo	16	43.5	1		-	
- Positivo	56	65.4	0.78			
EGFR membranoso				0.47		
- No	64	49.2	1			
- Si	8	38.1	1.41			
EGFR (FISH)				0.56		
- Negativo	59	48.8	1		-	
- Positivo	12	38.4	1.26			
VEGF				0.55		
- Negativo	53	49.2	1		-	
- Positivo	20	38.4	1.23			
HER 2				0.26		
- Negativo	59	49.2	1		-	
- Positivo	4	34.2	1.97			
KRAS				0.26		
- Negativo	25	38.1	1		-	
- Positivo	3	NA	0.32			
MST2				0.92		
- Negativo	11	93.5	1		-	
- Positivo	62	48.8	1.04			
RKIP				0.81		
- Negativo	50	49.2	1		-	
- Positivo	23	39.3	1.08			
Sexo				0.003		0.001
- hombre	50	33.9	1		Ref	
- mujer	24	NA	0.29		0.22(0.9-5.1)	
Estadio				<0.001		0.05
-I-II	27	NA	1		ref	
- III	47	33.9	3.5		2.3(0.9-6)	

6.4 Correlación entre la expresión de pERK nuclear y la de los factores moduladores de la vía

Con el fin de poder responder al **objetivo 3**, que era determinar si la expresión de pERK nuclear es debido a la sobreexpresión de uno de los inductores de la vía (VEGF, EGFR o HER2) o estaba relacionado con la mutación de KRAS o BRAF o más bien era por activación de las vías inhibitoras (como la pérdida de expresión de MST2 o la activación de RKIP). Estas correlaciones se detallan a continuación.

6.4.1 Expresión de VEGF, EGFR o HER2

VEGF

El 27.7% de este los caso expresaban VEGF. La expresión estaba más reducida en los tumores más avanzados, puesto que los tumores con ganglios negativos lo expresaban en un 50% frente al 28% de los pN1-3 ($p= 0.02$) y esto se traducía en una diferencia significativa en la expresión entre los estadios I-II (44%) frente a los estadios III (17%) con clara significación estadística ($p =0.01$).

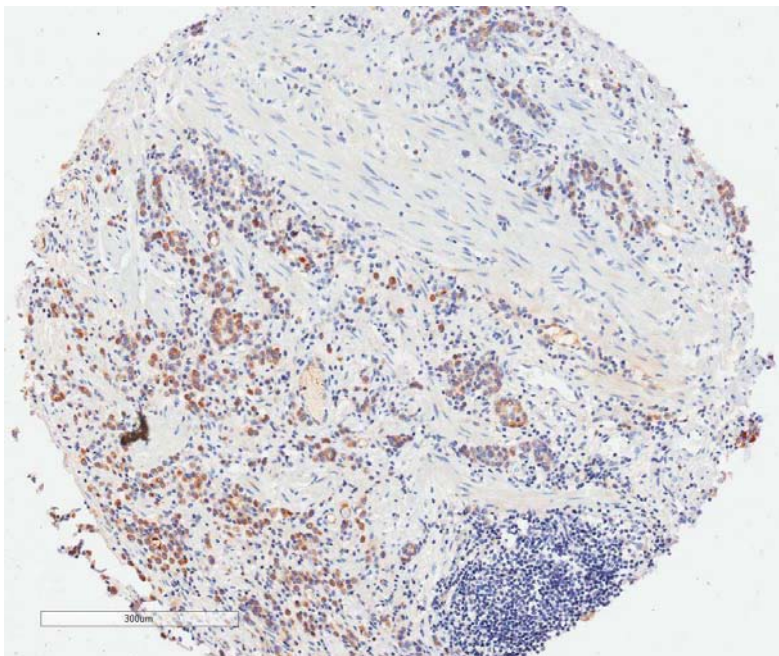


FOTO 5. Caso de VEGF positivo por IHQ

No se detectó ninguna asociación con las demás características clínicas. (Tabla 11)

En cuanto a la correlación con la expresión de ERK, existía una tendencia a que los casos que expresaban VEGF también expresaran pERK (85% vs 64% de los que no lo expresaban) ($p = 0.08$). Sin embargo no existía una correlación con pERK nucleado. (Tabla 12)

EGFR

- La mayoría de los tumores presentaban **una expresión del EGFR** por inmuno- histoquímica (63.8%). Pero no parecía existir diferencias en la expresión con las diferentes características clínicas. La expresión de EGFR tan poco parecía correlacionarse con la expresión de ERK ni de su forma activa pERK. Si bien todos los casos con expresión nuclear de pERK, expresaban EGFR aunque esta correlación no llegaba a la significación estadística. (Tabla 12)
- Ocho de los casos, mostraban **una expresión membranosa** (11.1%). Esta expresión se correlaciona con los tumores de tipo intestinal (23% frente a 3% de los difusos) y por tanto también se observaban diferencias claras en la expresión entre los tumores sin células en anillo de sello 23% mientras que no se detectaba en los tumores con células en anillo de sello ($p = 0.04$).

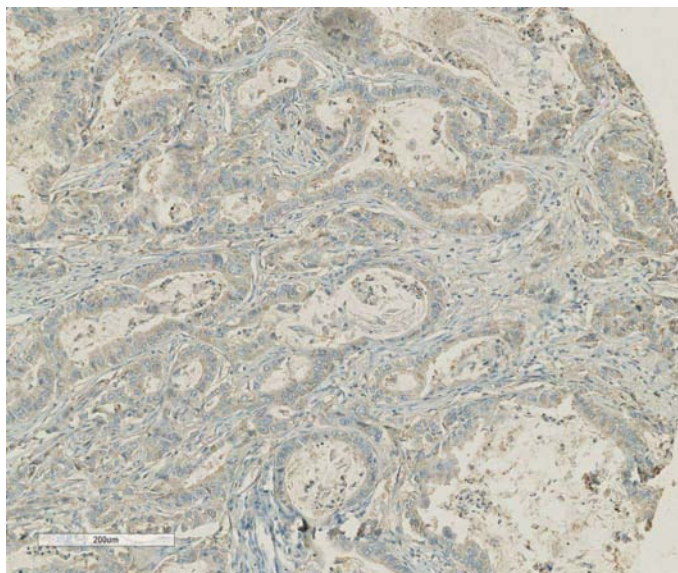


FOTO 6. Caso de Adenocarcinoma de tipo intestinal con expresión positiva de EGFR membranoso por IHQ

Esta expresión membranosa del EGFR no se relacionó con ninguna otra característica clínica. Tampoco se relacionó con la expresión de ERK ni pERK pero sí que existía una correlación clara de la expresión de EGFR membranosa con la expresión de pERK nuclear (38% frente a 5% en los tumores que no expresaban EGFR membranosa) ($p=0.02$).

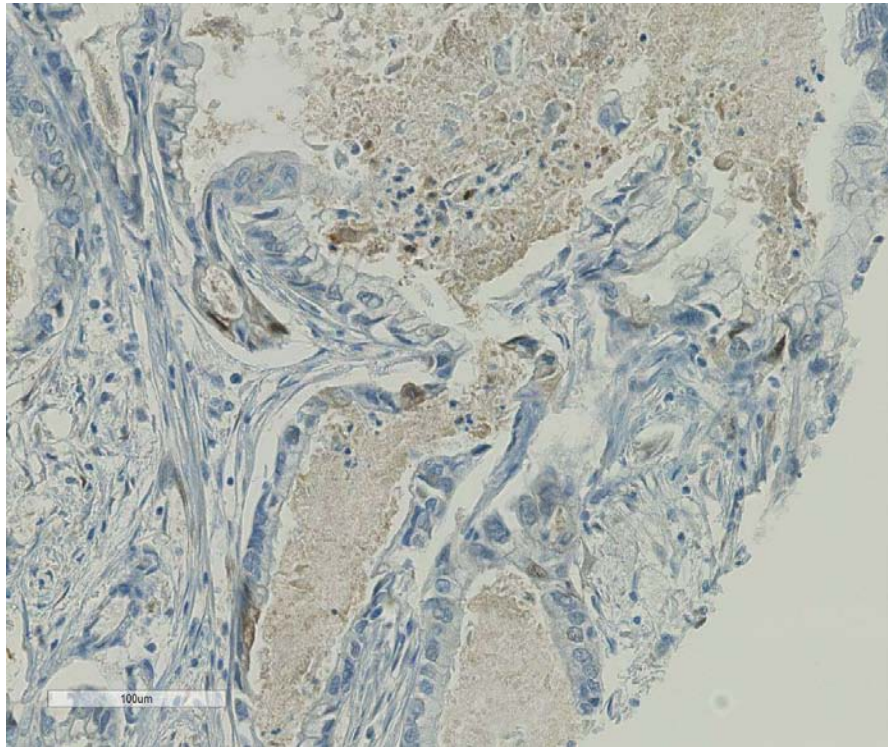


FOTO 7. Mismo caso que el anterior de Adenocarcinoma de tipo intestinal con expresión positiva de EGFR membranoso que expresa también pERK nuclear por IHQ

- Doce de los casos mostraban una **amplificación de EGFR por FISH** (16.6%). Dicha amplificación se correlacionó con la expresión de EGFR por IHQ ($p=0.04$). Todos los casos amplificados mostraron expresión de EGFR frente al 72% de los casos sin amplificación.

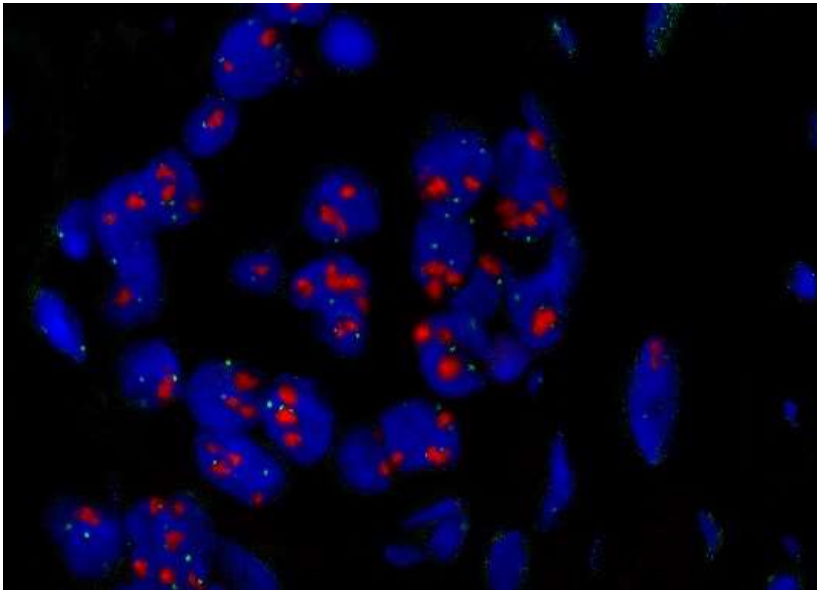


FOTO 8. Caso de amplificación de EGFR positiva por FISH

Asimismo la amplificación de FISH se correlacionó con la expresión EGFR membranosa ($p = 0.04$) (27% de los casos amplificados vs 7% de los no amplificados). La amplificación de EGFR, presentó una tendencia a correlacionarse con el tipo intestinal y con la ausencia de células en anillo de sello (**Tabla 11**). Tampoco se encontró una correlación con la expresión de ERK ni pERK pero si una tendencia a que los casos con amplificación de mostraran una mayor proporción de expresión de pERK nuclear (17% vs 5%, $p = 0.15$) como sucedía con la expresión membranosa de EGFR.

En conclusión, parece existir una correlación de la expresión EGFR en especial la membranosa) y su amplificación con la expresión de pERK nuclear.

HER 2

Se determinó la expresión de **HER 2 por IHQ**- pero sólo 1 caso mostró una sobreexpresión con una intensidad >2 , por lo que no se ha podido establecer ninguna correlación.

Sin embargo la valoración de **HER 2 por FISH** mostró una amplificación en el: 6.3% de los casos.

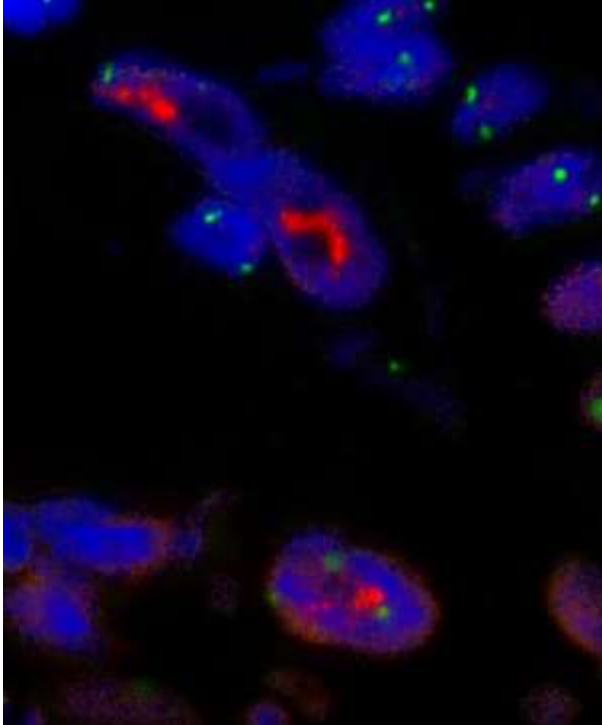


FOTO 9. Caso de amplificación de HER2 positiva por FISH

No se detectó ninguna correlación con las características clínicas, si bien parecía existir una tendencia correlacionarse con los tumores de cardias (25%) frente a los de antro o cuerpo gástrico (5%). También se correlacionaba con los tumores que no presentaban células en anillo de sello (9%) frente a los que si las presentan (0%). (**Tabla 11**) La amplificación de HER2 no parece correlacionarse ni con la expresión de ERK, ni p ERK ni p ERK nuclear.

6.4.2 Mutación de KRAS y BRAF

KRAS

Se detectó mutación en el gen KRAS en el 9% de los pacientes. Pero no se hallaron ninguna asociación con el estadio, clasificación histológica de Lauren o localización del

tumor. Ninguno de los caso mutados, presentaron expresión de ERK activo ni de su expresión en el núcleo⁶⁸.

BRAF

No se detectó ninguna mutación del gen BRAF. Estos hallazgos están en concordancia con la literatura donde están descritas ⁶⁸

6.4.3 Expresión de MST2 y RKIP

MST2

La mayoría de los tumores tenían expresión de MST2: 85.9%, siendo la intensidad de 1 o en la mayoría de los casos de intensidad 2 (52%). La expresión se correlacionaba inversamente con el estadio, así los tumores más avanzados (est III) presentaban menor expresión (78%) que los estadio Ib- II (96%, p 0.03). Por el contrario, la expresión era más frecuente en el tipo intestinal que en el difuso (93% vs 76%) (p= 0.07) y así se observaba una menor expresión en los adenocarcinomas con células en anillo de sello que en los que las presentaban. (71% vs 90%, p 0.04). No existía una asociación con las demás características clínicas. (**Tabla 11**) En cuanto a la relación con la expresión de la vía MEK/ ERK, si bien existe una mayor proporción de expresión de ERK en los tumores que co-expresan MST2 (97% vs 82%, p 0.04) no existe correlación entre la expresión de MST2 con ERK activo ni con la expresión nuclear de pERK. (**Tabla 12**)

En el tejido normal , la expresión de MST2 era también muy alta (94%), siendo la mayoría con una intensidad de 2 (68%). Cuando valoramos el cambio de intensidad de la expresión entre el tejido normal y el tumoral , encontramos que el 69% de los casos disminuían su intensidad, mientras que el resto la mantenía o la aumentaba.

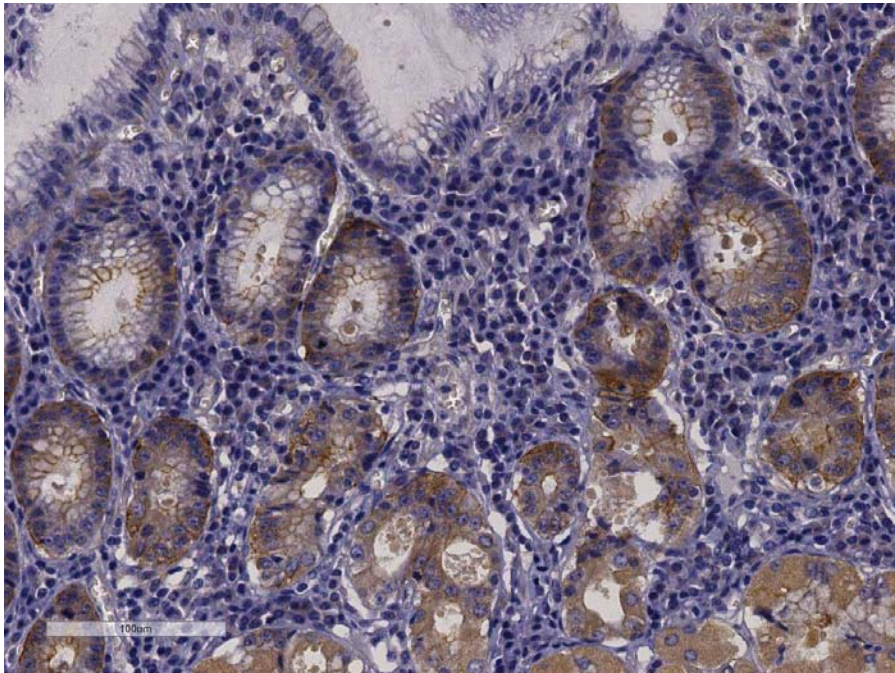


FOTO 10. Caso de expresión de MST2 positiva con intensidad de 2+ en tejido gástrico normal

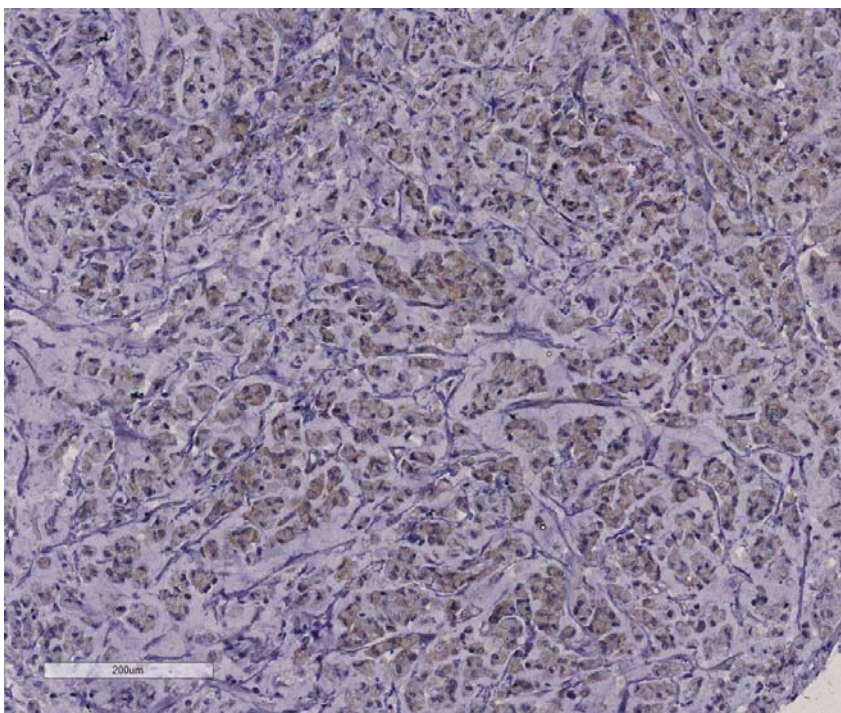


FOTO 11. Mismo caso que el anterior con expresión de MST2 positiva con intensidad de 1+ en tumor

Si se analizaba esta variable, como pérdida de expresión, se observó que tenía una tendencia a correlacionarse con el estadio, presentando los casos más avanzados un mayor número de casos con disminución (39% vs 19%, $p=0.07$). En este caso también se observaba una correlación con la expresión de ERK, pero ninguna con la expresión de pERK ni pERK nuclear (**Tablas 11 y 12**).

RKIP

El 32.4% de los tumores mostraban expresión de RKIP. Pero dicha expresión no se correlacionaba con el estadio. Únicamente observamos una correlación con un estado general más deteriorado (PS2: 48% frente a PS0-1: 25%). En cuanto a las características patológicas solo existía una tendencia a correlacionarse con la invasión vascular ($p=0.09$) (**Tabla 11**). Si bien sí que su expresión se correlacionaba claramente con la expresión de ERK ($p=0.03$), con pERK ($p=0.05$). Curiosamente, también se encontró una correlación con pERK nucleado. Así los tumores que expresaban RKIP tenían una mayor expresión de pERK nuclear (17% vs 4% casos sin expresión) ($p=0.06$) por IHQ o de 58% vs 23% ($p=0.04$) cuando se determina por IF (**Tabla 12**). **C**

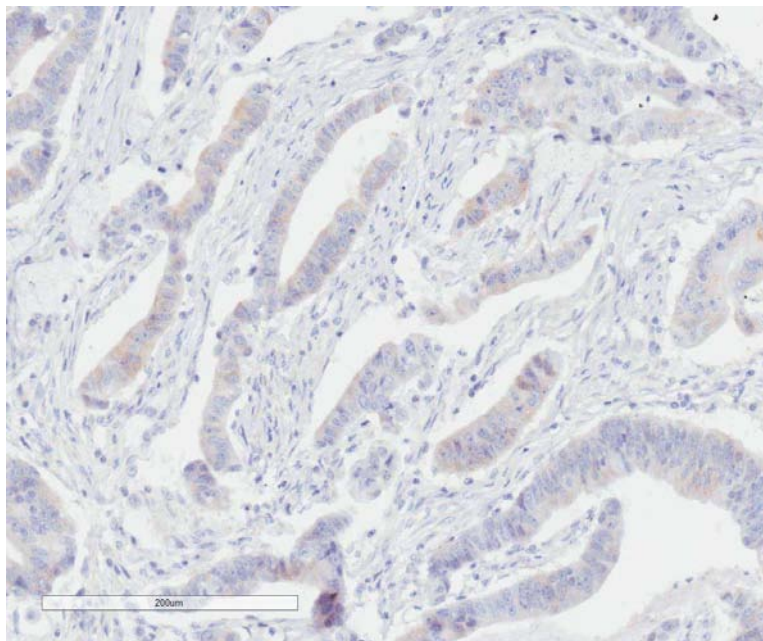


FOTO 12. Caso de RKIP positivo por IHQ

TABLA 11. EXPRESION DE LOS FACTORES MODULADORES DE LA VÍA Y LAS CARACTERISTICAS CLINICAS

	EGFR (%)	p.	EGFR menb + (%)	P	EGFR por FISH + (%)	p
Sexo		0.84		0.59		0.23
Hombre	77%		13%		20%	
Mujer	79%		8%		9%	
Edad		0.89		0.48		0.88
- ≤ 65years	77%		8%		12%	
- >65years	78%		13%		20%	
PS		0.24		0.71		0.07
-0-1	74%		12%		22%	
-2	86%		9%		5%	
Profundidad de invasion		0.67		0.32		0.98
- T1-2	71%		0%		17%	
- T3-4	78%		14%		17%	
Afectación ganglionar		0.28		0.84		0.82
- N0	88%		13%		19%	
- N1-3	75%		11%		16%	
Estadio		0.64		0.38		0.79
- Ib-II	81%		15%		15%	
- III	76%		9%		18%	
Clasificacion Lauren		0.09		0.02		0.12
Difuso	70%		3%		8%	
Intestinal mixto						

	90%		23%		28%	
	60%		0%		17%	
Invasion neural		0.64		0.75		0.27
- no	78%		11%		19%	
- si	73%		13%		7%	
Invasion vascular		0.7		0.27		0.77
- no	77%		9%		18%	
- si	81%		19%		14%	
C. Anillo sello		0.49		0.04		0.28
- ausente	80%		16%		20%	
- presente	73%		0%		10%	
Localización		0.03		0.37		0.88
- cardias	80%		0%		20%	
- cuerpo	59%		18%		14%	
- antro	87%		9%		18%	

	vEGF (%)	p.	HER2 por FISH + (%)	p
Sexo		0.06		0.41
Hombre	34%		5%	
Mujer	13%		10%	
Edad		0.24		0.66
- ≤ 65years	19%		5%	
- >65years	32%		7%	
PS		0.25		
-0-1	24%			
-2	36%			
Profundidad de invasion		0.41		0.89
- T1-2	14%		25%	
- T3-4	29%		5%	
Afectacion ganglionar		0.02		0.89
- N0	50%		7%	
- N1-3	21%		6%	
Estadio		0.01		0.56
- Ib-II	44%		9%	
- III	17%		5%	
Clasificación Lauren		0.79		0.39
Difuso	27%		3%	
Intestinal	30%		11%	
mixto	17%		0%	

Invasion neural		0.22		0.39
- no	24%		8%	
- si	40%		0%	
Invasion vascular		0.22		0.95
- no	29%		6%	
- si	20%		7%	
C. Anillo sello		0.57		0.15
- ausente	25%		9%	
- presente	32%		0%	
Localización		0.80		0.28
- cardias	40%		25%	
- cuerpo	26%		5%	
- antro	27%		5%	

	MST2 (%)	p.	MST2 Disminuc.	p	RKIP + (%)	p	KRAS mut (%)	p
Sexo		0.09		0.30		0.24		0.84
Hombre	90%		27%		28%		10%	
Mujer	75%		39%		42%		13%	
Edad		0.87		0.68		0.76		0.20
- ≤ 65years	1%		28%		35%		0%	
- >65years	85%		33%		31%		16%	

PS		0.70	41%	0.32		0.05		0.33
-0-1	16%				25%		14%	
-2	83%				48%		0%	
Profundidad de invasión		0.24		0.88		0.81		0.52
- T1-2	100%		29%		29%		0%	
- T3-4	83%		31%		33%		12%	
Afectación ganglionar		0.26	19%	0.22		0.9		0.06
- N0	94%		35%		31%		50%	
- N1-3	82%				33%		8%	
Estadio		0.03	19%	0.07		0.69		0.45
- Ib-II	96%		39%		30%		20%	
- III	78%				34%		9%	
Clasificación Lauren		0.07		0.03		0.62		0.39
Difuso	76%		24%		32%		7%	
Intestinal	93%		20%		30%		10%	
Mixto	100%		0%		50%		33%	
Invasión neural		0.45		0.19		0.48		0.72
- no	86%		28%		31%		10%	
- si	79%		46%		40%		14%	
Invasión vascular		0.15		0.28		0.09		0.84
- no	88%		28%		28%		10%	
- si	73%		43%		50%		13%	
C. Anillo sello		0.04		0.64		0.31		0.39
- ausente	90%		29%		29%		6%	
- presente	71%		35%		41%		0%	
Localización		0.93		0.73		0.77		0.39
cardias	80%		20%		20%		0%	
cuerpo antro	86%		36%		35%		22%	

	85%		30%		30%		6%	
--	-----	--	-----	--	-----	--	----	--

TABLA 12A Correlación de Expresión de ERk (por IHQ) con los otros factores

	ERK		%	p	pERK		%	p	pERK nuclear		%	p
	Negativo	Positivo			Negativo	Positivo			Negativo	Positivo		
EGFR				0.56				0.56				0.17
- Negativo	1	15	94%		8	8	50%		16	0	0%	
- Positivo	6	48	89%		14	42	75%		50	6	11%	
EGFR membrano				0.69				0.71				0.002
- Negativo	6	57	90%		20	44	69%		61	3	5%	
- Positivo	1	6	86%		2	6	75%		5	3	38%	
EGFR (FISH)				0.10				0.84				0.15
- Negativo	5	53	91%		18	41	69%		56	3	5%	
- Positivo	3	9	75%		4	8	67%		10	2	17%	
VEGF				0.30				0.08				0.73
- Negativo	7	45	87%		19	34	64%		49	4	8%	
- Positivo	1	19	95%		3	17	85%		18	2	10%	
HER2 (FISH)				0.42				0.37				0.27
- Negativo	8	50	86%		17	42	71%		54	5	8%	
- Positivo	0	4	100%		2	2	50%		3	1	25%	
KRAS				0.31				0.14				0.52
- wild type	3	22	88%		7	18	72%		22	3	12%	
- mutación	1	2	67%		3	0	0%		3	0	0%	
RKIP				0.03				0.05				0.06
- Negativo	8	40	83%		20	30	60%		48	2	4%	
- Positivo	0	24	100%		2	22	92%		20	4	17%	
MST2 (i1+2)				0.001				0.23				0.90
- Negativo	5	5	50%		5	6	55%		10	1	9%	
- Positivo	3	58	95%		7	45	87%		57	5	8%	
MST2				0.013				0.51				0.89
- no variación	1	46	98%		14	35	71%		45	4	8%	
- pérdida	2	16	76%		8	14	64%		20	2	9%	

TABLA 12B Correlación de Expresión de Erk (por IF) con los otros factores

	ERK		%	p	pERK		%	p	pERK nuclear		%	p
	Negativo	Positivo			Negativo	Positivo			Negativo	Positivo		
EGFR				0.09				0.56				0.50
- Negativo	2	12	86%		3	12	80%		10	4	29%	
- Positivo	21	24	53%		5	50	91%		34	21	38%	
EGFR membrano				0.79				0.81				0.10
- Negativo	20	41	67%		6	55	90%		41	20	33%	
- Positivo	3	5	63%		1	7	88%		3	5	63%	
EGFR (FISH)				0.24				0.56				0.41
- Negativo	18	38	68%		6	50	89%		35	21	38%	
- Positivo	6	6	50%		2	10	83%		9	3	25%	
VEGF				0.65				0.72				0.9
- Negativo	19	32	63%		7	44	86%		33	18	35%	
- Positivo	6	13	68%		2	17	89%		12	7	37%	
HER2 (FISH)				0.62				0.45				0.56
- Negativo	21	35	63%		7	49	88%		36	20	36%	
- Positivo	2	2	50%		0	4	100%		2	2	50%	
KRAS				0.84				0.52				0.17
- wild type	17	18	51%		3	22	88%		15	10	40%	
- mutación	1	2	67%		0	3	100%		3	0	0%	
RKIP				0.19				0.43				0.04
- Negativo	19	28	60%		7	40	85%		36	11	23%	
- Positivo	6	18	75%		2	22	92%		10	14	58%	
MST2 (i1+2)				0.24				0.17				0.83
- Negativo	9	20	69%		1	28	97%		14	6	30%	
- Positivo	10	10	50%		4	16	80%		12	7	37%	
MST2				0.10				0.17				0.55
- no variacion	4	34	89%		0	4	100%		30	18	38%	
- pérdida	5	10	67%		4	16	80%		14	6	30%	

6.5 CORRELACIÓN de la expresión de los FACTORES MODULADORES DE LA VIA y su relación con la SUPERVIVENCIA

Para alcanzar el **Objetivo 4**, hemos analizado si existía alguna correlación entre la expresión de los diferentes factores (VEGF, EGFR, MST2, RKIP) o de las amplificaciones de HER2 o EGFR o de las mutaciones de KRAS y BRAF con la Supervivencia global.

6.5.1 Expresión de VEGF, EGFR o HER2

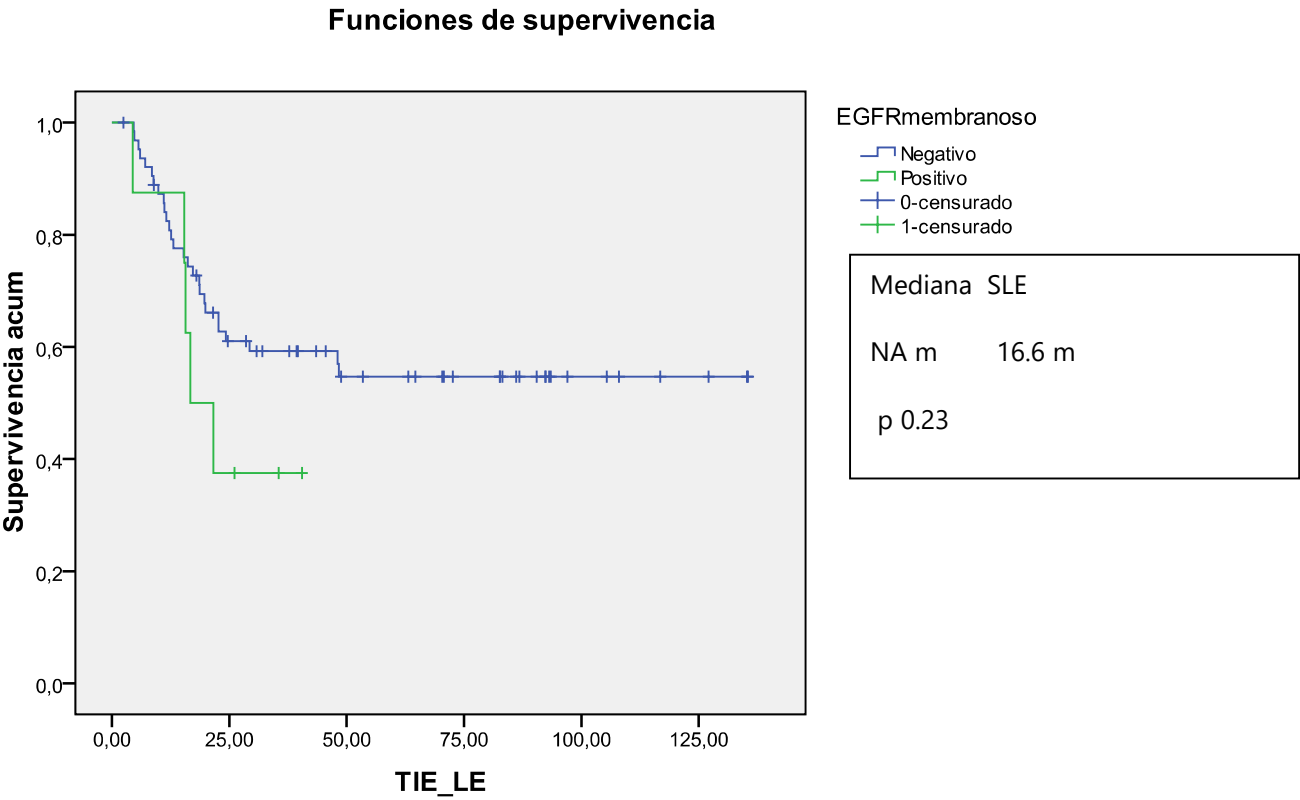
VEGF

Los pacientes con tumores que expresaban VEGF presentaban una mediana de Supervivencia libre de enfermedad (SLE), supervivencia específica (SE) y supervivencia global (y SG) menor que los pacientes con tumores que no la expresaban, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. (**Tabla 13**)

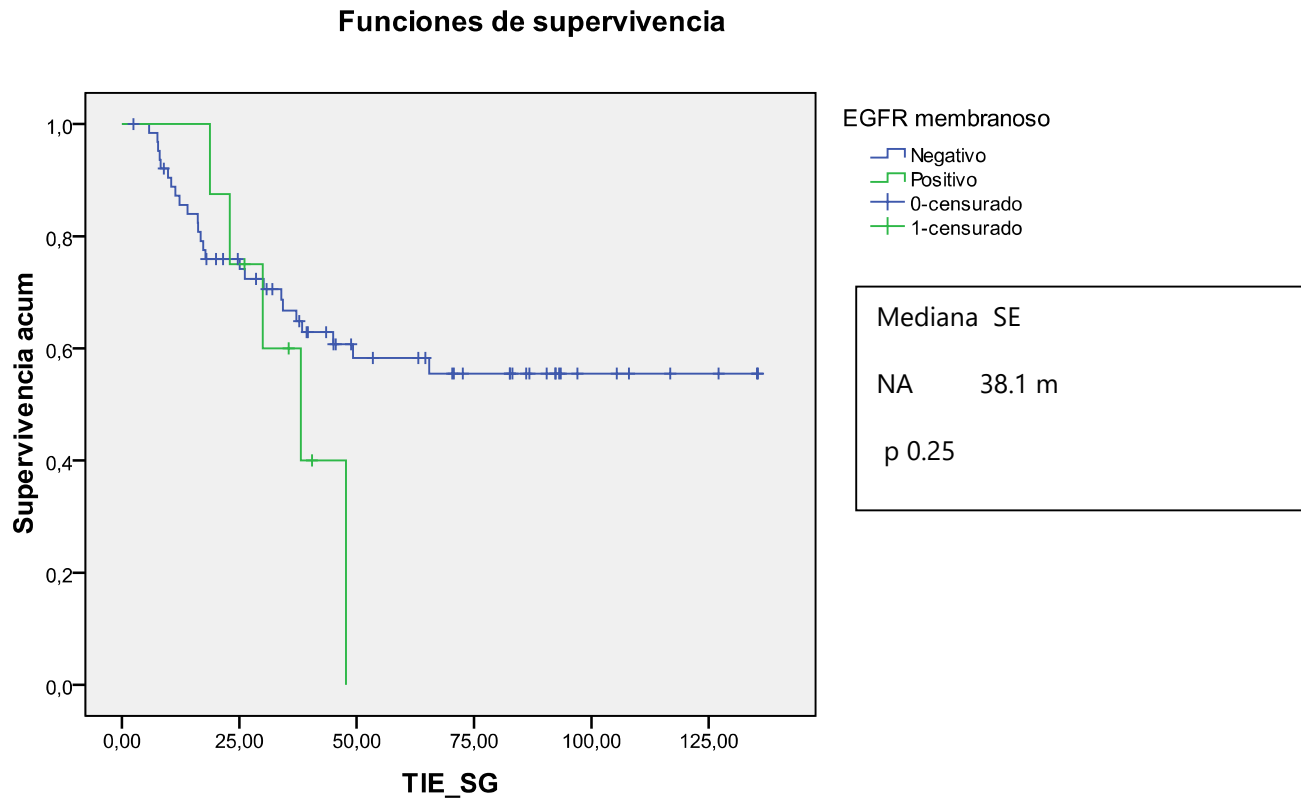
EGFR

Los casos con expresión de EGFR tenían una SLE, SE y SG mayor que cuando no existía expresión pero sin ninguna significación estadística. Por el contrario, la expresión de EGFR membranoso o cuando existe una amplificación del EGFR, la mediana de SE, SLE, SE y SG era menor. Así por ejemplo, las SLE y SE de los casos con expresión de EGFR membranoso eran de no alcanzada frente a 16.6 meses y de 86.3 meses frente a 36.4 meses, respectivamente (0.23 y 0.25). (**Figura 3 a y 3 b**)

FIGURA 3. Supervivencias de EGFR membranoso: 3 A- Supervivencia Libre de Enfermedad



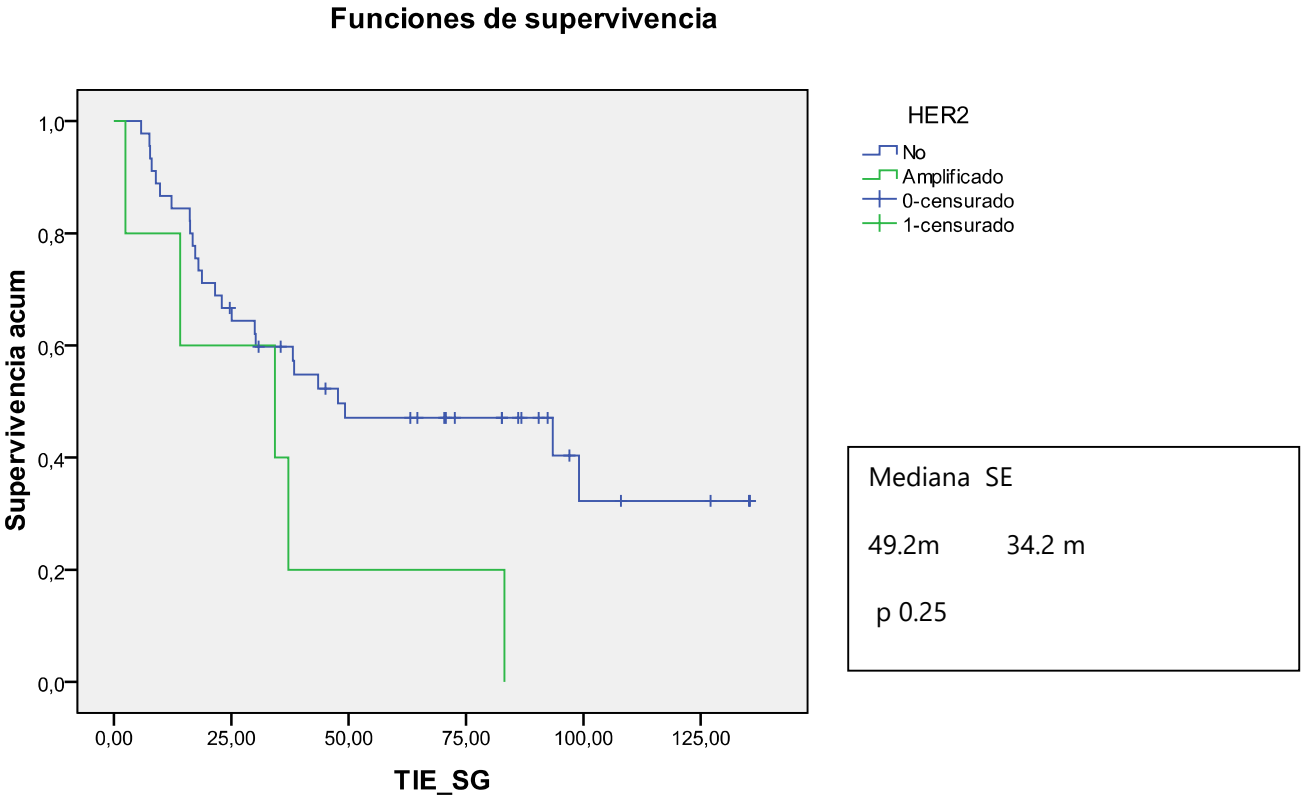
3B- Supervivencia Especifica



HER2

Solo se encontraron 4 casos de amplificación en nuestra serie, pero las medianas de SLE, SE y SG de los casos con amplificación de HER2 fueron menores que cuando no existía amplificación. La mediana de supervivencia global de los casos amplificados era de 34.2 meses frente a 49.2 meses en los no amplificados) (p 0.24) (**Figura 4**).

FIGURA 4. Supervivencia Global y HER2 amplificado (FISH +)

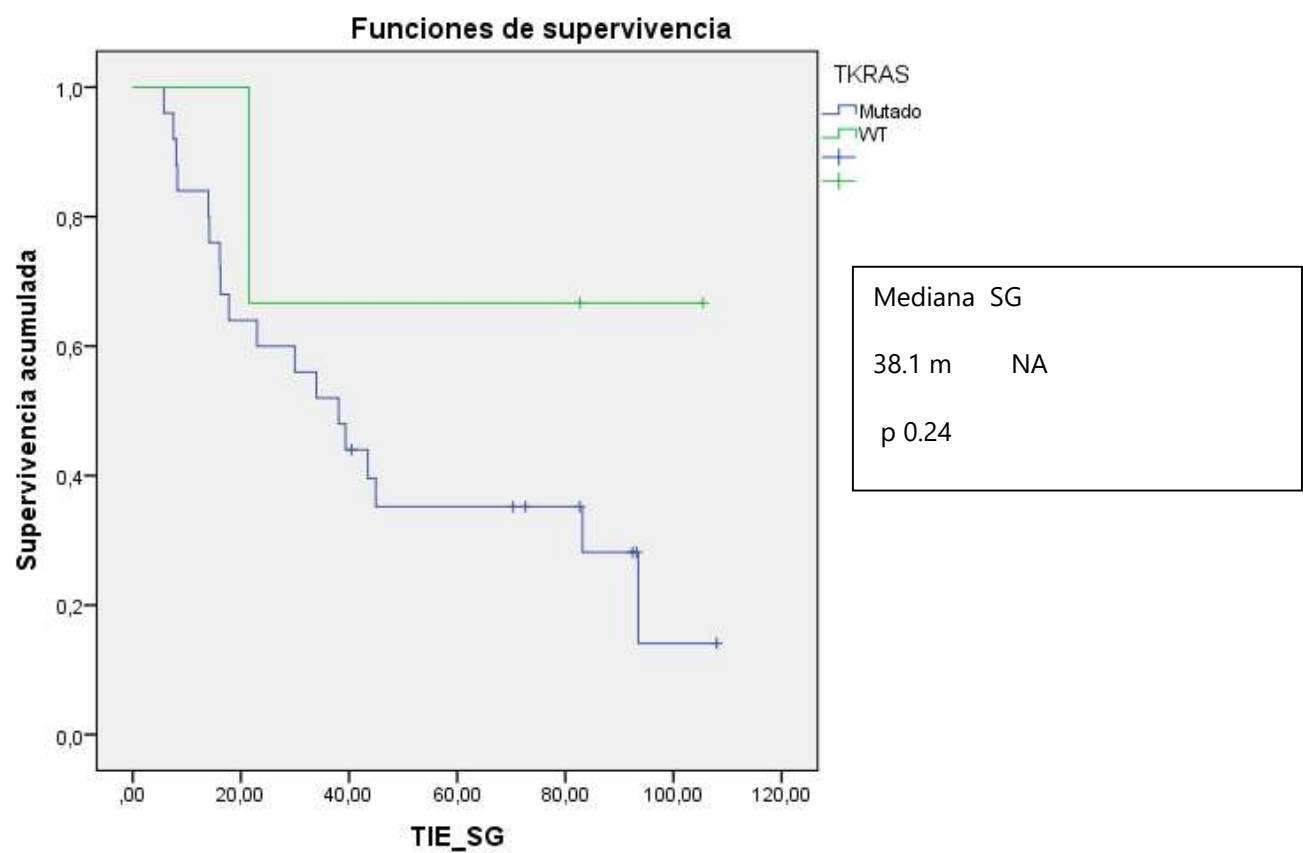


6.5.2 Mutación de KRAS y BRAF

KRAS

A pesar del pequeño número de casos en que se encontró una mutación de KRAS (0.7%), se observó que existía una tendencia a presentar una mayor SLE, SE y SG. Así por ejemplo la mediana de SG de 38.1 meses en los casos sin mutación frente a no alcanzada en los mutados (p 0.24) (Figura 5).

FIGURA 5. Supervivencia Global y KRAS



BRAF

No se encontró ningún caso con mutación por lo que no es valorable.

6.5.3 Expresión de MST2 y RKIP

MST2

Las medias de SLE, SE y fueron similares entre los casos que expresaban y los que no expresaban MST, existiendo un entrecruzamiento en las curvas. Tampoco parecía existir ninguna diferencia en las supervivencias entre los casos que mostraban una pérdida de expresión frente al tejido normal y los que mantenían la misma expresión que en el tejido normal.

RKIP

No parecen existir diferencias en las medias de SLE; SE o SG entre los casos que tenían expresión o ausencia de expresión de RKIP.

13. TABLA DE SUPERVIVENCIA y los DEMAS FACTORES

		SLE		SE		SG	
	N ^o patients	Mediana		Mediana		Mediana	P
EGFR			0.94		0.76		0.50
- Negativo	16	48.3		49.2		52.7	
- Positivo	56	NA		NA		72.5	
EGFR membranoso			0.23		0.25		0.47
- No	64	NA		86.3		49.2	
- Si	8	16.6		36.4		38.1	
EGFR (FISH)			0.39		0.72		0.56
- Negativo	59	NA		NA		48.8	
- Positivo	12	9.9		12.9		38.4	
VEGF			0.36		0.39		0.55
- Negativo	53	NA		NA		49.2	
- Positivo	20	19.9		38.4		38.4	
HER 2			0.48		0.57		0.25
- Negativo	59	NA		34.2		49.2	
- Positivo	4	22.6				34.2	
KRAS			0.12		0.14		0.24
- Negativo	25	NC		NC		38.1	
- Positivo	3	NC		NC		NA	
MST2*			0.61		0.69		0.92
- Negativo	11	79.1		79.0		65.3	
- Positivo	62	76.6		80.9		69.6	
MST2*			0.79		0.7		0.70
-no variación	49	81.2		86.2		65.4	
-perdida	22	69.4		70.7		48.8	
RKIP*			0.72		0.69		0.81
- Negativo	50	80.2		84.3		69.6	
- Positivo	23	70.4		78.0		66.1	

NC: no calculable

* Medias para SLE y SE

7- Discusión

La selección de esta serie de pacientes cumple el objetivo primordial imprescindible cuando se busca comprobar el valor pronóstico de un factor; este es la homogeneidad de los pacientes en el tratamiento recibido, para evitar así la existencia de sesgos que puedan falsear los resultados. Por ello, todos los pacientes recibieron el mismo tratamiento adyuvante tras someterse a la cirugía radical. Esta homogeneidad de nuestra serie se ve comprobada en el hecho que el estadio, que es el único factor pronóstico validado en el CG resecado, también aparece como factor pronóstico en el análisis univariado de nuestra serie, y linda con la significación estadística en el análisis multivariado, lo que valida la calidad de nuestra serie.

El sexo masculino también resulta ser un factor de mal pronóstico independiente en la regresión de Cox. Los varones muestran una peor SLE y SG, con una significación estadística, pero no así de la supervivencia específica. Este último dato podría matizar el valor pronóstico del género en nuestra serie al que no encontramos explicación biológica y que no se repite en los resultados de otras series.

A pesar de su limitado tamaño, el hallazgo como otro factor pronóstico independiente de nuestra serie, la expresión de pERK nuclear, refuerza el valor pronóstico real de este factor en CG.

Con el amplio estudio inmunohistoquímico que hemos realizado, y apoyados por la inmunofluorescencia y el estudio genético podemos confirmar nuestra hipótesis planteada, que la vía de MEK/ERK está activada en el CG. Observamos un claro cambio en la expresión tanto de ERK y PERK entre tumores más iniciales y los más avanzados. Así los tumores más avanzados (T3-4 o ganglios positivos) presentan una menor expresión que los estadios más iniciales, aunque esta diferencia no alcanza la significación estadística. Sin embargo la expresión de pERK nuclear, tiene una tendencia a ser más frecuente en estadios avanzados, estadios III frente a Ib-II.

Existe una correlación entre la expresión de pERK y la de ERK, pero no alcanza la significación con pERK nuclear cuando se mide por IHQ (aunque sí cuando es por IF). Así mismo existe una correlación entre ERK y pERK nuclear cuando se valora por IF (tendencia cuando se mide por IHQ al ser un análisis más categórico). Todo ello parece indicar que pERK nucleado, y no su forma citoplasmática, es el marcador real

de la activación de esta vía. Esto concuerda claramente con el hecho de que la translocación nuclear de pERK es un paso obligatorio para su activación⁶⁹. Un trabajo reciente de Taylor and Co, muestra que en líneas celulares de cáncer de mama, cuando se activa ERK con PIGF (Placental growth factor), aumenta el número de células con la expresión de pERK nuclear. Pero cuando se utiliza un inhibidor de PIGF, disminuye el número de células con expresión de pERK nuclear⁷⁰.

El segundo objetivo de nuestro trabajo, era valorar si la activación de esta vía, podía tener un valor pronóstico. Así pudimos comprobar, que la activación de la vía, reflejado en la expresión de pERK nucleado, parece inducir un mal pronóstico. El hecho de que existe una correlación de la expresión pERK nuclear tanto para la supervivencia libre de enfermedad, supervivencia específica como la Global con una significación estadística clara, así lo refleja. Sin embargo, en la expresión de ERK ni de pERK citoplasmático no tiene relación con las supervivencia (SLE, SE,SG). Aunque la expresión de pERK parece tener una tendencia a mejor SG, estas diferencias no alcanzan la significación y parecen producirse puesto que su expresión es más frecuente en estadios más iniciales. Esta posible explicación, se confirma con los resultados obtenidos en el estudio multivariado. El pERK carece de valor pronóstico si bien el estadio sí que lo tiene.

Y muestra también que la expresión de pERK nuclear, muestra un valor pronóstico independiente, en este caso negativo.

A pesar de que se han realizado, numerosos estudios en CG que intentaban identificar algún marcador molecular con valor pronóstico, todavía no se ha encontrado ninguno que lo alcance, lo que acentúa el posible valor de nuestro hallazgo.

La expresión de pERK nuclear, no se asocia a ninguna característica clínica analizada, aunque llama la atención que la frecuencia en los tumores de tipo intestinal es el 17% frente al 3% en los de tipo difusos, sin que esta diferencia se acerque a la significación estadística ($p = 0.4$) y por tanto podría deberse a la casualidad.

El tercer objetivo de nuestro trabajo buscaba caracterizar la causa de la activación de esta la vía MEK/ ERK. El primer paso que realizamos, fue la valoración del estado mutacional de KRAS y BRAF, cuya mutación se ha descrito en muchos tumores. No obstante, no encontramos ningún caso de mutación de BRAF en nuestra serie. Esto coincide con los hallazgos de otros autores, en los que tan poco detectaron

mutaciones^{58,71,72}, por lo que parece que BRAF no juega un papel importante en el desarrollo del tumor ni en la activación de MEK/ ERK en CG⁷³⁻⁷⁵.

Detectamos mutaciones de KRAS en 10.7% de los casos, frecuencia similar a las observadas en otros trabajos⁷², pero no se observó correlación con la activación de la vía.

La sobreexpresión de los factores inductores es otro mecanismo descrito en la activación de la vía MEK/ERK, en diferentes tumores como el cáncer renal o el cáncer de pulmón^{38,76,77}. Decidimos estudiar la expresión de los factores inductores que más frecuentemente están sobreexpresados y con mayor relevancia clínica: VEGF, EGFR y HER2.

El VEGF estaba sobreexpresado en el 27.7% de los casos analizados. Esta frecuencia es algo menor de la publicada en otras series de CG⁷⁸. En esas series existe una tendencia a la asociación con tumores bien diferenciados o intestinales, lo que explicaría la menor frecuencia encontrada en nuestra serie, que está formada mayoritariamente por tumores difusos y/o pobremente diferenciados. En nuestra serie, no detectamos una correlación con la expresión de pERK nuclear, lo que concuerda con que la expresión de VEGF no se relacione con la supervivencia en nuestro trabajo. Esto coincide con otros trabajos publicados que intentaban valorar el posible valor pronóstico en el CG de VEGF. Los resultados de estos estudios son contradictorios, pareciendo existir una correlación con mal pronóstico en algunas series asiáticas⁷⁹, pero sin encontrarse relación con la supervivencia en series occidentales^{49 78}

En el estudio que realizamos de EGFR, encontramos una sobreexpresión en el 63.8% de los casos mayoritariamente citoplasmática, así como una amplificación en el 17% sin relación³⁶ con las demás características clínicas ni clara relación entre la expresión y la amplificación. Estos resultados están en línea con lo publicado en otras series.⁴⁵⁻⁴⁷

No encontramos tampoco una correlación con la expresión de ERK ni pRK y por lo tanto tan poco con la supervivencia. Si bien cuando la expresión de ERK era principalmente membranosa, la frecuencia era inferior del 11.1% que concuerda con los artículos más recientes en los que ahora así se mide la expresión de EFR por inmunohistoquímica⁸⁰. En esta publicación que analizó más de 400 pacientes afectos de CG resecados, con estadios similares a nuestra serie y que fueron aleatorizados a un tratamiento adyuvante con quimioterapia o quimio-radioterapia, tampoco encuentra una correlación de la expresión EGFR con la SLE como en nuestro trabajo. Sin

embargo, en nuestra serie sí que encontramos una correlación clara de la expresión con pERK nuclear ($p = 0.002$) y por eso planteamos que aunque la expresión EGFR membranosa no es un factor pronóstico independiente, sí que puede ser la causa de la activación de la vía al menos en un subgrupo de CG.

Detectamos un sólo caso de sobreexpresión de HER2 por IHQ en nuestra serie (1.5%) a pesar de utilizar el kit aprobado para dicha determinación y seguir las guías para la evaluación de la sobreexpresión en CG⁶⁶, que difieren de la valoración en cáncer de mama. No podemos encontrar una explicación a nuestra baja incidencia. La frecuencia en otras series de CG resecados está en torno al 10-12%^{81,82} pero estas series incluyen muchos pacientes metastásicos. Es por tanto difícil encontrar datos sobre la incidencia en tumores localizados, pero en el estudio recientemente publicado de dos esquemas de adyuvancia en CG, se analizan además el HER2 por IHQ encontrando un 7%⁸⁰.

Cuando analizamos los casos por amplificación por FISH, la frecuencia en nuestra serie es del 6.3% que concuerda con la serie que acabamos de comentar. Nosotros no hallamos una correlación con otras características clínicas, en concordancia con lo reflejado en la literatura^{80,82 83}. Sin embargo, sí que existía una tendencia en nuestra serie a correlacionarse con los tumores de tipo intestinal, o visto de otra manera en los que no presentaban células en anillo de sello siendo el porcentaje de HER2 positivos de 9% frente a 0%, así como con la localización, siendo más frecuente en los tumores de cardias. Esta asociación se debe a que ninguno de los tumores de cardias presentaban células en anillo de sello frente al 47% de los de cuerpo-antro que si las presentaban ($p = 0.13$). Esta correlación de expresión de HER2 y tumores de tipo intestinal (es decir sin células en anillo de sello) concuerda con lo observado en diferentes series^{82 83}.

No encontramos ninguna relación de la amplificación de HER2 con ERK, pERK ni pERK nuclear que va en línea con los hallazgos de nuestro trabajo al no detectar tampoco una asociación con las supervivencias. Esto último se observa también en otras series^{82,83}.

Dentro del objetivo de comprobar la activación de la vía MEK/ERK, nos propusimos valorar la expresión de MST2, que de manera indirecta nos mostraría si existía una activación de esta vía. Esperábamos que en caso de activación de la vía debía

disminuir su expresión. No disponíamos de datos en la literatura, de la expresión de este factor en CG.

Detectamos una alta expresión en tejido normal (94%) con alta intensidad, pero en el tumor la expresión seguía siendo alta, pero comprobamos disminuía su intensidad en el 69% de los casos. Además la expresión en tejido tumoral era menor en los estadios más avanzados con clara significación estadística ($p = 0.03$). Cuando valoramos la pérdida de expresión de MST2 en el tumor frente a su expresión en el tejido normal, encontramos que se correlacionaba de manera claramente significativa con la expresión de ERK en el tumor ($p = 0.01$). No se pudo correlacionar con pERK nuclear, posiblemente dado el pequeño número de casos. Los hallazgos observados de la pérdida de expresión de MST2, reflejan por tanto, la activación del vía MEK/ERK en el CG.

Dentro del objetivo 3 de nuestro trabajo, nos planteamos si la activación del vía se podía deber a una disminución de la expresión de los inhibidores de esta vía. Determinamos estudiar el inhibidor RKIP. Su expresión se daba en un tercio de los tumores, frecuencia similar a lo publicado por otro autor⁸⁴ No detectamos ninguna correlación con el estadio ni con ninguna otra característica a excepción del estado general. Los pacientes con estado más deteriorado (PS2) presentaban tumores con mayor expresión de RKIP sin que podamos encontrar una explicación a ello. Aunque el hallazgo más llamativo fue encontrar una correlación clara entre la expresión de RKIP y la expresión tanto de ERK ($p = 0.03$), pERK ($p = 0.05$) como p ERK nuclear ($p = 0.06$). Este hallazgo es inesperado puesto que a mayor expresión de RKIP era esperable un aumento de la inhibición de la vía de MEK/ ERK. Por tanto de nuestros resultados podemos deducir , que RKIP no se comporta como inhibidor de la vía en CG. Esto concuerda con otro trabajo reciente que analiza la expresión de pMEK, pERK y RKIP en 105 muestras de CG. Aunque encuentran que la ausencia de expresión de RKIP se correlaciona con el estadio y con una mayor supervivencia libre de recaída, no encuentran relación alguna con la expresión de pERK⁸⁵. Por ello podemos plantear que si RKIP tiene un papel en la progresión tumoral en el CG es por actuación a nivel de otras vías intracelulares independientes como las que han sido propuestas: NfKB^{84, 86} o STAT^{87, 88}. La ausencia de correlación con la supervivencia en nuestra serie, a pesar de su clara relación con pERK nuclear que muestra ser factor pronóstico independiente, también sugiere que en CG su actuación es independiente de la vía de MEK/ERK.

8- Conclusiones

Para emitir las conclusiones del estudio, pasaremos a detallarlas siguiendo cada objetivo planteado.

CONCLUSIÓN del OBJETIVO 1: Comprobar que la forma activa de ERK (pERK) y su expresión nuclear (p ERK nc) se sobre expresan en los tumores más avanzados

La expresión de ERK y su forma activa p ERK parecen ser más frecuentes en estadios más iniciales que en los avanzados, pero la expresión nuclear de pERK es más frecuente en tumores más avanzados, si bien estas diferencias no alcanzan la significación estadística

CONCLUSIÓN del OBJETIVO 2: Determinar si la sobre expresión de pERK y/ o de su expresión nuclear (pERK nc) se correlaciona con una peor supervivencia

Hemos mostrado que la expresión por IHQ del ERK activado (p ERK) cuando su expresión es nuclear, conlleva una menor SLE, SE y supervivencia global con una clara significación estadística. El análisis multivariado indica que es un factor de mal pronóstico independiente. Los resultados por IF apoyan esta observación.

CONCLUSIÓN del OBJETIVO 3: Evaluar la relación de la expresión de pERK con la sobre expresión de VEGF, EGFR o HER2, con la mutación de KRAS o BRAF, con la pérdida de expresión de MST2 y con la sobreexpresión de RKIP:

En nuestro análisis, no hemos encontrado que la expresión de VEGF ni la amplificación de HER2 se relacionen con la expresión de pERK nucleado y por lo tanto estimulen la activación de la vía de señalización. Si bien la sobreexpresión de EGFR cuando esta es membranosa, se correlacionan con p ERK nuclear y la amplificación del gen muestra una tendencia, por lo que nos permite deducir que EGFR actúa como activador de la vía de MEK/ERK en el cáncer gástrico.

La mutación del gen KRAS es muy infrecuente y no hemos detectado mutaciones de BRAF en nuestra serie, no pareciendo por tanto que las mutaciones de estos dos genes tenga una implicación en la activación de la vía MEK/ERK en CG.

La expresión de MST2 es muy alta en los tumores gástricos pero su pérdida de expresión no parece ser un indicador claro de la activación de la vía.

El estudio de RKIP, inhibidor putativo de la vía en diferentes tumores, está sobreexpresado en un 32% de los casos de CG. Si bien se correlaciona de manera positiva, con ERK activado y con pERK nuclear, por todo ello puede deducirse que en CG no actúa como inhibidor de la vía de señalización.

CONCLUSION del OBJETIVO 4: Determinar si la sobre expresión de los factores inductores de la vía (EGFR, VEGFR, HER2), las mutaciones de KRAS y BRAF o la expresión de los factores inhibidores de la vía (RKIP) o la expresión de MST2 se correlacionan con una peor supervivencia.

Los pacientes con tumores con sobreexpresión de VEGF, EGFR membranoso y amplificación de HER2, factores inductores de la vía de señalización, presentan una mediana de SLE, SE y SG menor que en los casos negativos. Si bien estas diferencias no son estadísticamente significativas.

La mutación de KRAS no se asocia de manera significativa ni con la SLE, SE. No se ha podido encontrar ninguna correlación de la expresión de MST2 con las supervivencias (SLE, SE, SG).

A pesar de encontrar una clara correlación positiva de RKIP con la activación de ERK y sus formas activas (PRK y pERK nuclear), su expresión no tiene ninguna relación con la supervivencia. Estos hallazgos parecen sugerir que su modo de actuación den CG no es de inhibidor, ni inductor de la vía y por tanto su acción es independiente de la vía de MEK/ERK.

9- Bibliografía

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A: Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62:10-29, 2012
2. Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, et al: Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* 355:11-20, 2006
3. Ferlay J SH, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008v2.0,cancer Incidence and Mortality worldwide:IARC cancer base nº 10, Lyon, France: international Agency for research on Cancer,2010
4. Jemal A, Bray F, Center MM, et al: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69-90, 2011
5. Brown LM, Devesa SS: Epidemiologic trends in esophageal and gastric cancer in the United States. *Surg Oncol Clin N Am* 11:235-56, 2002
6. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, et al: Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE--5-a population-based study. *Lancet Oncol* 15:23-34, 2014
7. Bosetti C, Bertuccio P, Malvezzi M, et al: Cancer mortality in Europe, 2005-2009, and an overview of trends since 1980. *Ann Oncol* 24:2657-71, 2013
8. Piazuelo MB, Epplein M, Correa P: Gastric cancer: an infectious disease. *Infect Dis Clin North Am* 24:853-69, vii, 2010
9. Wroblewski LE, Peek RM, Jr.: *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis: mechanisms. *Gastroenterol Clin North Am* 42:285-98, 2014
10. Wroblewski LE, Peek RM, Jr.: *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis: mechanisms. *Gastroenterol Clin North Am* 42:285-98
11. Gonzalez CA, Pera G, Agudo A, et al: Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer* 107:629-34, 2003

12. Camargo MC, Kim WH, Chiaravalli AM, et al: Improved survival of gastric cancer with tumour Epstein-Barr virus positivity: an international pooled analysis. *Gut* 63:236-43, 2014
13. Gonzalez CA, Agudo A: Carcinogenesis, prevention and early detection of gastric cancer: where we are and where we should go. *Int J Cancer* 130:745-53, 2012
14. Tramacere I, Pelucchi C, Bagnardi V, et al: A meta-analysis on alcohol drinking and esophageal and gastric cardia adenocarcinoma risk. *Ann Oncol* 23:287-97
15. El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, et al: Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 404:398-402, 2000
16. Persson C, Canedo P, Machado JC, et al: Polymorphisms in inflammatory response genes and their association with gastric cancer: A HuGE systematic review and meta-analyses. *Am J Epidemiol* 173:259-70, 2011
17. Pinheiro H, Oliveira C, Seruca R, et al: Hereditary diffuse gastric cancer - pathophysiology and clinical management. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 28:1055-68, 2014
18. Correa P, Fontham ET, Bravo JC, et al: Chemoprevention of gastric dysplasia: randomized trial of antioxidant supplements and anti-helicobacter pylori therapy. *J Natl Cancer Inst* 92:1881-8, 2000
19. de Vries AC, van Grieken NC, Looman CW, et al: Gastric cancer risk in patients with premalignant gastric lesions: a nationwide cohort study in the Netherlands. *Gastroenterology* 134:945-52, 2008
20. Bosman FT CF, Hruban RH, Theise ND, eds. : WHO Classification of tumors of the digestive system.,4th edition . Lyon, France, international Agency for research on Cancer, 2010
21. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition. *Gastric Cancer* 14:101-12, 2011
22. 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
23. Leslie Robin Mg: TNM. Classification of malignant Tumours, UICC (ed Seventh Edition), 2009
24. Kwon KJ, Shim KN, Song EM, et al: Clinicopathological characteristics and prognosis of signet ring cell carcinoma of the stomach. *Gastric Cancer* 17:43-53, 2014
25. Smalley SR, Benedetti JK, Haller DG, et al: Updated analysis of SWOG-directed intergroup study 0116: a phase III trial of adjuvant radiochemotherapy versus observation after curative gastric cancer resection. *J Clin Oncol* 30:2327-33, 2012

26. Qiu MZ, Cai MY, Zhang DS, et al: Clinicopathological characteristics and prognostic analysis of Lauren classification in gastric adenocarcinoma in China. *J Transl Med* 11:58, 2013
27. Miyahara R, Niwa Y, Matsuura T, et al: Prevalence and prognosis of gastric cancer detected by screening in a large Japanese population: data from a single institute over 30 years. *J Gastroenterol Hepatol* 22:1435-42, 2007
28. Lee IS, Yook JH, Kim TH, et al: Prognostic factors and recurrence pattern in node-negative advanced gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 39:136-40, 2013
29. Hartgrink HH, van de Velde CJ, Putter H, et al: Extended lymph node dissection for gastric cancer: who may benefit? Final results of the randomized Dutch gastric cancer group trial. *J Clin Oncol* 22:2069-77, 2004
30. Macdonald JS, Smalley SR, Benedetti J, et al: Chemoradiotherapy after surgery compared with surgery alone for adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction. *N Engl J Med* 345:725-30, 2001
31. Shah MA, Ajani JA: Gastric cancer--an enigmatic and heterogeneous disease. *JAMA* 303:1753-4, 2010
32. Cho JY: Molecular diagnosis for personalized target therapy in gastric cancer. *J Gastric Cancer* 13:129-35, 2013
33. Smalley SR, Benedetti JK, Williamson SK, et al: Phase III trial of fluorouracil-based chemotherapy regimens plus radiotherapy in postoperative adjuvant rectal cancer: GI INT 0144. *J Clin Oncol* 24:3542-7, 2006
34. Schneider BG, Peng DF, Camargo MC, et al: Promoter DNA hypermethylation in gastric biopsies from subjects at high and low risk for gastric cancer. *Int J Cancer* 127:2588-97
35. Shah MA, Khanin R, Tang L, et al: Molecular classification of gastric cancer: a new paradigm. *Clin Cancer Res* 17:2693-701, 2011
36. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 513:202-9, 2014
37. Shah MA, Khanin R, Tang L, et al: Molecular classification of gastric cancer: a new paradigm. *Clin Cancer Res* 17:2693-701
38. Gollob JA, Wilhelm S, Carter C, et al: Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway. *Semin Oncol* 33:392-406, 2006
39. Caraglia M, Tassone P, Marra M, et al: Targeting Raf-kinase: molecular rationales and translational issues. *Ann Oncol* 17 Suppl 7:vii124-7, 2006

40. Lowe SW, Cepero E, Evan G: Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432:307-15, 2004
41. Barron DA, Kagey JD: The role of the Hippo pathway in human disease and tumorigenesis. *Clin Transl Med* 3:25, 2014
42. O'Neill EE, Matallanas D, Kolch W: Mammalian sterile 20-like kinases in tumor suppression: an emerging pathway. *Cancer Res* 65:5485-7, 2005
43. Zhao B, Li L, Lei Q, et al: The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes Dev* 24:862-74, 2010
44. Harvey KF, Zhang X, Thomas DM: The Hippo pathway and human cancer. *Nat Rev Cancer* 13:246-57, 2013
45. Kim JS, Kim MA, Kim TM, et al: Biomarker analysis in stage III-IV (M0) gastric cancer patients who received curative surgery followed by adjuvant 5-fluorouracil and cisplatin chemotherapy: epidermal growth factor receptor (EGFR) associated with favourable survival. *Br J Cancer* 100:732-8, 2009
46. Matsubara J, Yamada Y, Hirashima Y, et al: Impact of insulin-like growth factor type 1 receptor, epidermal growth factor receptor, and HER2 expressions on outcomes of patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res* 14:3022-9, 2008
47. Liang Z, Zeng X, Gao J, et al: Analysis of EGFR, HER2, and TOP2A gene status and chromosomal polysomy in gastric adenocarcinoma from Chinese patients. *BMC Cancer* 8:363, 2008
48. Kim MA, Lee HS, Lee HE, et al: EGFR in gastric carcinomas: prognostic significance of protein overexpression and high gene copy number. *Histopathology* 52:738-46, 2008
49. Lee SJ, Kim JG, Sohn SK, et al: No association of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and VEGF-C expression with survival in patients with gastric cancer. *Cancer Res Treat* 41:218-23, 2009
50. Ma J, Zhang L, Ru GQ, et al: Upregulation of hypoxia inducible factor 1alpha mRNA is associated with elevated vascular endothelial growth factor expression and excessive angiogenesis and predicts a poor prognosis in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 13:1680-6, 2007
51. Gao ZL, Zhang C, Du GY, et al: Clinical significance of changes in tumor markers, extracellular matrix, MMP-9 and VEGF in patients with gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 54:1591-5, 2007

52. Tanner M, Hollmen M, Junttila TT, et al: Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol* 16:273-8, 2005
53. Yonemura Y, Ohoyama S, Kimura H, et al: The expression of proliferative-associated nuclear antigen p105 in gastric carcinoma. *Cancer* 67:2523-8, 1991
54. Ross JS, McKenna BJ: The HER-2/neu oncogene in tumors of the gastrointestinal tract. *Cancer Invest* 19:554-68, 2001
55. Kono K, Takahashi A, Ichihara F, et al: Impaired antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by herceptin in patients with gastric cancer. *Cancer Res* 62:5813-7, 2002
56. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D: RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat Rev Cancer* 11:761-74, 2011
57. Hunt JD, Mera R, Strimas A, et al: KRAS mutations are not predictive for progression of preneoplastic gastric lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:79-80, 2001
58. Wu M, Semba S, Oue N, et al: BRAF/K-ras mutation, microsatellite instability, and promoter hypermethylation of hMLH1/MGMT in human gastric carcinomas. *Gastric Cancer* 7:246-53, 2004
59. Trakul N, Rosner MR: Modulation of the MAP kinase signaling cascade by Raf kinase inhibitory protein. *Cell Res* 15:19-23, 2005
60. Yeung K, Seitz T, Li S, et al: Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* 401:173-7, 1999
61. Al-Mulla F, Hagan S, Behbehani AI, et al: Raf kinase inhibitor protein expression in a survival analysis of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 24:5672-9, 2006
62. Fu Z, Kitagawa Y, Shen R, et al: Metastasis suppressor gene Raf kinase inhibitor protein (RKIP) is a novel prognostic marker in prostate cancer. *Prostate* 66:248-56, 2006
63. Hagan S, Al-Mulla F, Mallon E, et al: Reduction of Raf-1 kinase inhibitor protein expression correlates with breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 11:7392-7, 2005
64. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C, et al: TNM classification of malignant tumours, (ed 7th). Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ, Wiley-Blackwell
65. Karni-Schmidt O, Castillo-Martin M, Shen TH, et al: Distinct expression profiles of p63 variants during urothelial development and bladder cancer progression. *Am J Pathol* 178:1350-60, 2011
66. Hofmann M, Stoss O, Shi D, et al: Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 52:797-805, 2008

67. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al: Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 97:643-55, 2005
68. van Grieken NC, Aoyama T, Chambers PA, et al: KRAS and BRAF mutations are rare and related to DNA mismatch repair deficiency in gastric cancer from the East and the West: results from a large international multicentre study. *Br J Cancer* 108:1495-501, 2013
69. Lidke DS, Huang F, Post JN, et al: ERK nuclear translocation is dimerization-independent but controlled by the rate of phosphorylation. *J Biol Chem* 285:3092-102, 2010
70. Taylor AP, Leon E, Goldenberg DM: Placental growth factor (PlGF) enhances breast cancer cell motility by mobilising ERK1/2 phosphorylation and cytoskeletal rearrangement. *Br J Cancer* 103:82-9, 2010
71. Palanisamy N, Ateeq B, Kalyana-Sundaram S, et al: Rearrangements of the RAF kinase pathway in prostate cancer, gastric cancer and melanoma. *Nat Med* 16:793-8, 2010
72. Okines AF, Gonzalez de Castro D, Cunningham D, et al: Biomarker analysis in oesophagogastric cancer: Results from the REAL3 and TransMAGIC trials. *Eur J Cancer* 49:2116-25, 2013
73. Lee SH, Lee JW, Soung YH, et al: BRAF and KRAS mutations in stomach cancer. *Oncogene* 22:6942-5, 2003
74. Kim IJ, Park JH, Kang HC, et al: Mutational analysis of BRAF and K-ras in gastric cancers: absence of BRAF mutations in gastric cancers. *Hum Genet* 114:118-20, 2003
75. Okines AF, Gonzalez de Castro D, Cunningham D, et al: Biomarker analysis in oesophagogastric cancer: Results from the REAL3 and TransMAGIC trials. *Eur J Cancer* 49:2116-25, 2013
76. Shibata T, Hanada S, Kokubu A, et al: Gene expression profiling of epidermal growth factor receptor/KRAS pathway activation in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 98:985-91, 2007
77. Bardos JI, Ashcroft M: Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. *Bioessays* 26:262-9, 2004
78. Lastraioli E, Boni L, Romoli MR, et al: VEGF-A clinical significance in gastric cancers: immunohistochemical analysis of a wide Italian cohort. *Eur J Surg Oncol* 40:1291-8, 2014
79. Chen J, Tang D, Wang S, et al: High expressions of galectin-1 and VEGF are associated with poor prognosis in gastric cancer patients. *Tumour Biol* 35:2513-9, 2014
80. Park SH, Sohn TS, Lee J, et al: Phase III Trial to Compare Adjuvant Chemotherapy With Capecitabine and Cisplatin Versus Concurrent Chemoradiotherapy in

Gastric Cancer: Final Report of the Adjuvant Chemoradiotherapy in Stomach Tumors Trial, Including Survival and Subset Analyses. *J Clin Oncol* 33:3130-6, 2015

81. Tang D, Liu CY, Shen D, et al: Assessment and prognostic analysis of EGFR, HER2, and HER3 protein expression in surgically resected gastric adenocarcinomas. *Onco Targets Ther* 8:7-14, 2015

82. Sheng WQ, Huang D, Ying JM, et al: HER2 status in gastric cancers: a retrospective analysis from four Chinese representative clinical centers and assessment of its prognostic significance. *Ann Oncol* 24:2360-4, 2013

83. Kunz PL, Mojtahed A, Fisher GA, 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

84. Wang J, Yang YH, Wang AQ, et al: Immunohistochemical detection of the Raf kinase inhibitor protein in nonneoplastic gastric tissue and gastric cancer tissue. *Med Oncol* 27:219-23, 2010

85. Fujimori Y, Inokuchi M, Takagi Y, et al: Prognostic value of RKIP and p-ERK in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 31:30, 2012

86. Yeung KC, Rose DW, Dhillon AS, et al: Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 21:7207-17, 2001

87. Chatterjee D, Sabo E, Tavares R, et al: Inverse association between Raf Kinase Inhibitory Protein and signal transducers and activators of transcription 3 expression in gastric adenocarcinoma patients: implications for clinical outcome. *Clin Cancer Res* 14:2994-3001, 2008

88. Zhang XM, Zhou C, Gu H, et al: Correlation of RKIP, STAT3 and cyclin D1 expression in pathogenesis of gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 7:5902-8, 2014